



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0046833
(43) 공개일자 2024년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2024-7005288

(22) 출원일자(국제) 2022년07월18일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년02월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2022/073862

(87) 국제공개번호 WO 2023/288338

국제공개일자 2023년01월19일

(30) 우선권주장

63/222,954 2021년07월16일 미국(US)

63/282,961 2021년11월24일 미국(US)

(71) 출원인

사나 바이오테크놀로지, 인크.

미국 워싱턴 (우편번호 98102) 시애틀 이스트 블레인 스트리트 188 스위트 400

(72) 발명자

마티아스, 알버트 루조

미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188

두들, 윌리엄

미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박장원

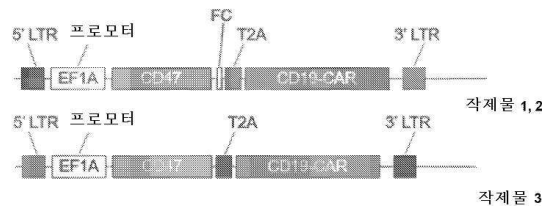
전체 청구항 수 : 총 332 항

(54) 발명의 명칭 세포 기반 요법을 위한 다이스트론성 벡터

(57) 요약

하나 이상의 관용원성 인자, 하나 이상의 CAR 및 선택적으로 하나 이상의 안전 스위치의 공동 발현을 위한 다이스트론성 벡터뿐만 아니라 이를 포함하는 조성물, 이를 포함하는 세포 및 해당 세포를 생성하는 방법, 및 암, 당뇨병 및 신경학적 질환과 같은 질환을 치료하기 위해 개시된 벡터, 조성물 및 세포를 이용하는 방법이 제공된다.

대표도



도 1A

(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464412 (2023.05)
C07K 14/70503 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 9/22 (2013.01)

(72) 발명자

탐, 엘레오노어

미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188

엘먼, 제시카 에스.

미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188

존슨, 애덤

미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188

명세서

청구범위

청구항 1

다시스트론성(polycistronic) 벡터로서, (a) 관용원성 인자(tolerogenic factor)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하되, 상기 제1 발현 카세트는 5'에서 3' 순서에서 상기 제2 발현 카세트 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, CR1, DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121 및 Mfge8로 이루어진 군으로부터 선택된, 다시스트론성 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 CD47은 인간 CD47인, 다시스트론성 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인간 CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 6

제3항에 있어서, CD47을 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 129 내지 134 중 어느 하나에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일한, 다시스트론성 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, CD47을 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화된, 다시스트론성 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, CD47을 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 135에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일한, 다시스트론성 벡터.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 CAR은 CD19 CAR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 CD19 CAR은 신호 펩타이드, CD19에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서, CD19에 특이적인 상기 세포외 결합 도메인은 scFv를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 scFv는 FMC63의 상기 경쇄 가변 영역(V_L) 및 상기 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 21 내지 23 및 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 21 내지 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 17

제10항에 있어서, 상기 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 18

제10항에 있어서, 상기 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 19

제10항에 있어서, 상기 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 20

제10항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 21

제10항에 있어서, 상기 CD19 CAR은 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한, 다시스트론성 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 CD19 CAR을 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 116에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 서열번호 116에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일한, 다시스트론성 벡터.

청구항 23

제10항에 있어서, 상기 CD19 CAR은 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한, 다시스트론성 벡터.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 CD19 CAR을 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일한, 다시스트론성 벡터.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 CAR은 CD20 CAR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 CD20 CAR은 신호 펩타이드, CD20에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 CD20에 특이적인 상기 세포외 결합 도메인은 scFv를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 scFv는 Leu16의 V_L 및 V_H 를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 39 내지 41 및 43 내지 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 39 내지 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 32

제28항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 43 내지 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 33

제26항에 있어서, 상기 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 34

제26항에 있어서, 상기 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 35

제26항에 있어서, 상기 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 36

제26항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

터.

청구항 37

제1항에 있어서, 상기 CAR은 CD22 CAR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 CD22 CAR은 신호 펩타이드, CD22에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 40

제38항에 있어서, CD22에 특이적인 상기 세포외 결합 도메인은 scFv를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 scFv는 m971의 V_H 및 V_L 을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 47 내지 49 및 51 내지 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 47 내지 49에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 44

제40항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 51 내지 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 45

제40항에 있어서, 상기 scFv는 m971-L7의 V_H 및 V_L 을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 46

제40항에 있어서, scFv는 서열번호 56 내지 58 및 60 내지 62에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 47

제40항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 56 내지 58에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 48

제40항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 60 내지 62에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 49

제38항에 있어서, 상기 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지

-CH2-CH3 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 50

제38항에 있어서, 상기 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 51

제38항에 있어서, 상기 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 52

제38항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 53

제1항에 있어서, 상기 CAR은 BCMA CAR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 BCMA CAR은 신호 펩타이드, BCMA에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 56

제54항에 있어서, BCMA에 특이적인 상기 세포외 결합 도메인은 scFv를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 scFv는 C11D5.3의 V_L 및 V_H 를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 58

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 65 내지 67 및 69 내지 71에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 59

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 65 내지 67에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 60

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 69 내지 71에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 61

제56항에 있어서, 상기 scFv는 C12A3.2의 V_L 및 V_H 를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 62

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 74 내지 76 및 78 내지 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의

CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 63

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 74 내지 76에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 64

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 78 내지 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 65

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 118에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 66

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 120 내지 122 및 124 내지 126에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 67

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 120 내지 122에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 68

제56항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 124 내지 126에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 69

제54항에 있어서, BCMA에 특이적인 상기 세포외 결합 도메인은 완전 인간 중쇄 가변 도메인(FHvH)을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 70

제65항에 있어서, 상기 FHvH는 FHvH33을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 71

제65항에 있어서, FHvH는 서열번호 82 내지 84에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 72

제54항에 있어서, 상기 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 73

제54항에 있어서, 상기 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 74

제54항에 있어서, 상기 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 75

제54항에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1개 이상의 절단 부위는 자기-절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 자기-절단 부위는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 2A 부위는 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 79

제77항에 있어서, 상기 1개 이상의 절단 부위는 프로테아제 부위를 더 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 프로테아제 부위는 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 퓨린 부위는 FC1, FC2 또는 FC3 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 82

제79항에 있어서, 상기 프로테아제 부위는 5'에서 3' 순서에서 상기 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제 3 발현 카세트를 더 포함하되, 상기 제3 발현 카세트는 상기 제1 발현 카세트 및/또는 상기 제2 발현 카세트로부터 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리된, 다시스트론성 벡터.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 안전 스위치는 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자무과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9), 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9), CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, RQR8 및 CD47-SIRP α 차단제로 이루어진 군으로부터 선택된, 다시스트론성 벡터.

청구항 85

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터를 더 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 프로모터는 구성적 프로모터인, 다시스트론성 벡터.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 구성적 프로모터는 EF1 α , CMV, SV40, PGK, UBC 또는 CAG 프로모터인, 다시스트론성 벡터.

청구항 88

제85항에 있어서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터인, 다시스트론성 벡터.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 유도성 프로모터는 Tet-On, Tet-Off, AlcA, LexA 또는 Cre 프로모터인, 다시스트론성 벡터.

청구항 90

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 게놈 좌위에 상동 유도 수선 (homology directed repair: HDR)-매개 삽입을 위한 상기 발현 카세트에 측접하는 상동성 아암을 더 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 91

제90항에 있어서, 상기 HDR은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제(site-directed nuclease)를 사용하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 92

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 93

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하되, 상기 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 상기 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 상기 제3 발현 카세트는 상기 제1 발현 카세트 및/또는 상기 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된, 다시스트론성 벡터.

청구항 95

다시스트론성 벡터로서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하되, 상기 CD19 CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 96

제95항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 97

다시스트론성 벡터로서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하되, 상기 CD19 CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, IgG4 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 99

다시스트론성 벡터로서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하되, 상기 CD19 CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 101

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 102

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하되, 상기 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 103

제101항 또는 제102항에 있어서, (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 상기 제3 발현 카세트는 상기 제1 발현 카세트 및/또는 상기 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된, 다시스트론성 벡터.

청구항 104

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 105

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하되, 상기 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 106

제104항 또는 제105항에 있어서, (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 상기 제3 발현 카세트는 상기 제1 발현 카세트 및/또는 상기 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된, 다시스트론성 벡터.

청구항 107

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트 및 (d) 임의의 2개의 이웃하는 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함

하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 108

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트 및 (d) 임의의 2개의 이웃하는 발현 카세트를 분리시키는 퓨린 부위 및 2A 부위를 포함하되, 상기 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 상기 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 109

제107항 또는 제108항에 있어서, (e) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제4 발현 카세트를 더 포함하되, 상기 제4 발현 카세트는 상기 제1 발현 카세트, 상기 제2 발현 카세트 및/또는 상기 제3 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된, 다시스트론성 벡터.

청구항 110

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 111

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하되, 상기 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 상기 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 112

제110항 또는 제111항에 있어서, (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 상기 제3 발현 카세트는 상기 제1 발현 카세트 및/또는 상기 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된, 다시스트론성 벡터.

청구항 113

다시스트론성 벡터로서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하되, 상기 BCMA CAR은 BB2121 결합체, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 114

다시스트론성 벡터로서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하되, 상기 BCMA CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, CT103A scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 BCMA는 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 116

제113항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 117

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터.

청구항 118

다시스트론성 벡터로서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 상기 제1 발현 카세트와 상기 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하되, 상기 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있는, 다시스트론성 벡터.

청구항 119

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는, 바이러스.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 또는 파지인, 바이러스.

청구항 121

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 122

제121항에 있어서, 상기 숙주 세포는 자가(autologous) 세포인, 숙주 세포.

청구항 123

제121항에 있어서, 상기 숙주 세포는 동종이계(allogeneic) 세포인, 숙주 세포.

청구항 124

제121항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 배아 줄기 세포(ESC) 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)인, 숙주 세포.

청구항 125

제121항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된, 숙주 세포.

청구항 126

제121항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1차 세포인, 숙주 세포.

청구항 127

제125항 또는 제126항에 있어서, 상기 숙주 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포 또는 자연 살해 T(NKT) 세포인, 숙주 세포.

청구항 128

제117항 또는 제118항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 129

제128항에 있어서, 상기 숙주 세포는 자가 세포인, 숙주 세포.

청구항 130

제128항에 있어서, 상기 숙주 세포는 동종이계 세포인, 숙주 세포.

청구항 131

제128항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC인, 숙주 세포.

청구항 132

제128항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된, 숙주 세포.

청구항 133

제128항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1차 세포인, 숙주 세포.

청구항 134

제132항 또는 제133항에 있어서, 상기 숙주 세포는 β 섬 세포인, 숙주 세포.

청구항 135

제132항 또는 제133항에 있어서, 상기 숙주 세포는 신경아교 전구체 세포(GPC)인, 숙주 세포.

청구항 136

제121항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다이스트론성 벡터 또는 이의 단편은 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위(safe harbor locus)로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 숙주 세포의 특정 게놈 좌위에 삽입된, 숙주 세포.

청구항 137

제136항에 있어서, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, 숙주 세포.

청구항 138

제136항 또는 제137항에 있어서, 상기 삽입은 HDR에 의하는, 숙주 세포.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 HDR은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제를 사용하는, 숙주 세포.

청구항 140

제121항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1개 이상의 MHC I 분자 및/또는 1개 이상의 MHC II 분자의 감소된 발현을 갖도록 변형되되, 선택적으로, 상기 1개 이상의 MHC I 분자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C로 이루어진 군으로부터 선택되고, 선택적으로, 상기 1개 이상의 MHC II 분자는 HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM 및 HLA-DO로 이루어진 군으로부터 선택된, 숙주 세포.

청구항 141

제140항에 있어서, 상기 숙주 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 갖는, 숙주 세포.

청구항 142

제141항에 있어서, 숙주 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는, 숙주 세포.

청구항 143

제142항에 있어서, 상기 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자 둘 다에서 일어나는, 숙주 세포.

청구항 144

제140항에 있어서, 상기 숙주 세포는 MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현을 갖는, 숙주 세포.

청구항 145

제144항에 있어서, 숙주 세포는 MIC-A 및/또는 MIC-B 녹아웃을 갖는, 숙주 세포.

청구항 146

제145항에 있어서, 상기 MIC-A 및/또는 MIC-B 녹아웃은 대립유전자 둘 다에서 일어나는, 숙주 세포.

청구항 147

다시스트론성 백터 또는 이의 단편을 포함하는 T 세포로서, 상기 다시스트론성 백터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함하는, T 세포.

청구항 148

다시스트론성 백터 또는 이의 단편을 포함하는 T 세포로서, 상기 다시스트론성 백터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함하고, 상기 T 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는, T 세포.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자 둘 다에서 일어나는, T 세포.

청구항 150

제147항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다시스트론성 백터 또는 이의 단편은 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된 T 세포의 특정 게놈 좌위에 삽입된, T 세포.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, T 세포.

청구항 152

제147항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR 또는 BCMA CAR을 포함하는, T 세포.

청구항 153

제152항에 있어서, 상기 CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 CD19 CAR인, T 세포.

청구항 154

제152항에 있어서, 상기 CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, IgG4 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 CD19 CAR인, T 세포.

청구항 155

제152항에 있어서, 상기 CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 CD19 CAR인, T 세포.

청구항 156

제152항에 있어서, 상기 CAR은 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CD19 CAR이거나, 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한, T 세포.

청구항 157

제152항에 있어서, 상기 CAR은 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD19 CAR인, T 세포.

청구항 158

제152항에 있어서, 상기 CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, CT103A scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 BCMA CAR인, T 세포.

청구항 159

제152항에 있어서, 상기 CAR은 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 BCMA CAR이거나, 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한, T 세포.

청구항 160

HDR에 의해 변형된 게놈 좌위를 갖는 세포로서, 상기 게놈 좌위는 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포.

청구항 161

제160항에 있어서, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, 세포.

청구항 162

제160항 또는 제161항에 있어서, 상기 HDR은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제를 사용하는, 세포.

청구항 163

iPSC-유래 β 섬 세포로서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) 안전 항만 좌위에 삽입된 안전 스위치 및 CD47을 포함하는 이식유전자를 갖되, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, iPSC-유래 β 섬 세포.

청구항 164

iPSC-유래 β 섬 세포로서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) CLYBL 상동성 아암에 측접된 CD47 및 HSVtk를 포함하는 이식유전자를 갖되, 상기 이식유전자는 상기 CLYBL 좌위에 삽입된, iPSC-유래 β 섬 세포.

청구항 165

제163항 또는 제164항에 있어서, 상기 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는, iPSC-유래 β 섬 세포.

청구항 166

제165항에 있어서, 상기 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자 둘 다에서 일어나는, iPSC-유래 β 섬

세포.

청구항 167

ESC-유래 GPC로서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) 안전 항만 좌위에 삽입된 안전 스위치 및 CD47을 포함하는 이식유전자를 갖되, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, ESC-유래 GPC.

청구항 168

ESC-유래 GPC로서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) CLYBL 상동성 아암에 측접된 CD47 및 HSVtk를 포함하는 이식유전자를 갖되, 상기 이식유전자는 CLYBL 좌위에 삽입된, ESC-유래 GPC.

청구항 169

제167항 또는 제168항에 있어서, 상기 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는, ESC-유래 GPC.

청구항 170

제169항에 있어서, 상기 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자 둘 다에서 일어나는, ESC-유래 GPC.

청구항 171

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터를 포함하는, 조성물.

청구항 172

제119항 또는 제120항의 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 173

제121항 내지 제170항 중 어느 한 항의 숙주 세포 또는 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 174

가이드 RNA(gRNA)로서, B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된 게놈 좌위의 이식유전자의 HDR-매개 삽입에서 사용하기 위한, 가이드 RNA(gRNA).

청구항 175

제174항에 있어서, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, gRNA.

청구항 176

제174항 또는 제175항에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA 및 선택적으로 tracrRNA를 포함하는, gRNA.

청구항 177

제176항에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA 및 tracrRNA를 2개의 별개의 분자로서 포함하는, gRNA.

청구항 178

제176항에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA 및 tracrRNA를 단일 가이드 RNA(sgRNA)로서 포함하는, gRNA.

청구항 179

제178항에 있어서, sgRNA는 상보적 영역, crRNA 반복부 영역, 테트라루프 및 tracrRNA를 포함하는, gRNA.

청구항 180

제179항에 있어서, 상기 crRNA 반복부 영역은 서열번호 95, 서열번호 99, 서열번호 103 또는 서열번호 108에 제

서열 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, gRNA.

청구항 181

제179항 또는 제180항에 있어서, 상기 테트라루프는 서열번호 96 또는 서열번호 107에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, gRNA.

청구항 182

제179항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA는 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 105 또는 서열번호 106에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, gRNA.

청구항 183

제176항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA는 AAVS1, CLYBL 또는 CCR5 좌위의 영역에 특이적인 상보적 영역을 포함하는, gRNA.

청구항 184

제183항에 있어서, 상기 영역은 암호화 서열(CDS), 엑손, 인트론, 엑손의 일부 및 인접한 인트론의 일부에 걸쳐 있는 서열, 또는 조절 영역인, gRNA.

청구항 185

제183항 또는 제184항에 있어서, 상기 상보적 영역은 서열번호 110, 서열번호 111 또는 서열번호 112에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, gRNA.

청구항 186

게놈 좌위에 이식유전자의 HDR-매개 삽입에서 사용하기 위한 gRNA로서, 상기 게놈 좌위는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, gRNA.

청구항 187

제186항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 19: 55,115,674에 또는 염색체 19: 55,115,674의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치에 위치된, gRNA.

청구항 188

게놈 좌위에 이식유전자의 HDR-매개 삽입에서 사용하기 위한 gRNA로서, 상기 게놈 좌위는 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, gRNA.

청구항 189

제188항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 13: 99,822,980에 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치에 위치된, gRNA.

청구항 190

게놈 좌위에 이식유전자의 HDR-매개 삽입에서 사용하기 위한 gRNA로서, 상기 게놈 좌위는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, gRNA.

청구항 191

제190항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 3: 46,373,180에 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치에 위치된, gRNA.

청구항 192

제174항 내지 제191항 중 어느 한 항의 gRNA를 포함하는, 조성물.

청구항 193

제192항에 있어서, 부위-지정 뉴클레아제 또는 부위-지정 뉴클레아제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, 조성물.

청구항 194

제193항에 있어서, 상기 부위-지정 뉴클레아제는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된, 조성물.

청구항 195

제192항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 세포에 전달을 위해 제형화된, 조성물.

청구항 196

제174항 내지 제191항 중 어느 한 항의 gRNA를 포함하는, 세포.

청구항 197

제196항에 있어서, 부위-지정 뉴클레아제 또는 부위-지정 뉴클레아제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, 세포.

청구항 198

제197항에 있어서, 상기 부위-지정 뉴클레아제는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된, 조성물.

청구항 199

게놈 좌위에의 이식유전자의 HDR-매개 삽입 방법으로서, gRNA, 부위-지정 뉴클레아제 또는 부위-지정 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 상동성 아암에 측접되는 이식유전자를 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하되, 상기 부위-지정 뉴클레아제는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 200

제199항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 201

제200항에 있어서, 상기 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 202

제199항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA 및 선택적으로 tracrRNA를 포함하는, 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA 및 tracrRNA를 2개의 별개의 분자로서 포함하는, 방법.

청구항 204

제202항에 있어서, 상기 gRNA는 crRNA 및 tracrRNA를 단일 가이드 RNA(sgRNA)로서 포함하는, 방법.

청구항 205

제204항에 있어서, 상기 sgRNA는 상보적 영역, crRNA 반복부 영역, 테트라루프 및 tracrRNA를 포함하는, 방법.

청구항 206

제205항에 있어서, 상기 crRNA 반복부 영역은 서열번호 95, 서열번호 99, 서열번호 103 또는 서열번호 108에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, 방법.

청구항 207

제205항 또는 제206항에 있어서, 상기 테트라루프는 서열번호 96 또는 서열번호 107에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, 방법.

청구항 208

제205항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 tracrRNA는 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 105 또는 서열번호 106에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, 방법.

청구항 209

제202항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 crRNA는 AAVS1, CLYBL 또는 CCR5 좌위의 영역에 특이적인 상보적 영역을 포함하는, 방법.

청구항 210

제209항에 있어서, 상기 영역은 암호화 서열(CDS), 엑손, 인트론, 엑손의 일부 및 인접한 인트론의 일부에 걸쳐 있는 서열, 또는 조절 영역인, 방법.

청구항 211

제209항 또는 제210항에 있어서, 상기 상보적 영역은 서열번호 110, 서열번호 111 또는 서열번호 112에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 이로 본질적으로 이루어진, 방법.

청구항 212

제199항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, 방법.

청구항 213

제212항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 19: 55,115,674에 또는 염색체 19: 55,115,674의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치에 위치된, 방법.

청구항 214

제199항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, 방법.

청구항 215

제214항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 13: 99,822,980에 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20,

30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치에 위치된, 방법.

청구항 216

제199항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, 방법.

청구항 217

제216항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 3: 46,373,180에 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치에 위치된, 방법.

청구항 218

제199항 내지 제217항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자는 (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트 및/또는 (d) 상기 제1 발현 카세트, 상기 제2 발현 카세트 및/또는 상기 제3 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 방법.

청구항 219

이식유전자의 HDR-매개 삽입을 위한 새로운 게놈 좌위를 확인하는 방법으로서, (a) 알려진 gRNA에 기반하여 게놈 좌위를 위치시키는 단계; 및 (b) PAM 서열에 대해 게놈 좌위의 측면 중 하나 상에서 약 500 내지 4000 bp의 영역을 스캐닝하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 220

제219항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796, 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860, 또는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된, 방법.

청구항 221

제220항에 있어서, 상기 게놈 좌위는 염색체 19: 55,115,674 또는 염색체 19: 55,115,674; 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치, 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치; 및 염색체 3: 46,373,180, 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치된, 방법.

청구항 222

질환 치료를 필요로 하는 대상체의 질환 치료 방법으로서, 제121항 내지 제168항 중 어느 한 항의 숙주 세포 또는 세포, 또는 제173항의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 223

제222항에 있어서, 상기 질환은 암인, 방법.

청구항 224

제223항에 있어서, 상기 암은 CD19, CD20, CD22 및/또는 BCMA 발현과 연관된, 방법.

청구항 225

제223항에 있어서, 상기 암은 혈액 악성종양인, 방법.

청구항 226

제225항에 있어서, 상기 혈액 악성종양은 골수성 신생물, 골수형성 이상증후군(MDS), 골수증식성/골수형성 이상증후군, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈

병(CML), B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), T 세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), T 세포 림프종 및 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 227

제222항에 있어서, 상기 질환은 자가면역질환인, 방법.

청구항 228

제227항에 있어서, 상기 자가면역질환은 루푸스, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 궤양성 대장염, 에디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염 및 쉐리악 병으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 229

제222항에 있어서, 상기 질환은 진성 당뇨병인, 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 상기 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨병 전증 및 임신성 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 231

제222항에 있어서, 상기 질환은 신경학적 질환인, 방법.

청구항 232

제231항에 있어서, 상기 신경학적 질환은 강경증, 뇌전증, 뇌염, 뇌수막염, 편두통, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 펠리제우스-메르쯔바하병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 233

조성물로서, 제1 다시스트론성 벡터 및 제2 다시스트론성 벡터를 포함하되,

상기 제1 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고;

상기 제2 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 234

제233항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자 및 상기 제2 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, CR1, DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121 및 Mfge8로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된, 조성물.

청구항 235

제234항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자 및 상기 제2 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 조성물.

청구항 236

제235항에 있어서, 상기 CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 237

제233항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 CAR과 상기 제2 CAR은 상이하고, CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR 및 BCMA CAR로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된, 조성물.

청구항 238

제233항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 CAR 및/또는 상기 제2 CAR은 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한, 조성물.

청구항 239

제233항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 CAR은 CD19 CAR이고, 상기 제2 CAR은 CD22 CAR인, 조성물.

청구항 240

제233항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1개 이상의 절단 부위는 자기-절단 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 241

제240항에 있어서, 상기 자기-절단 부위는 2A 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 242

제241항에 있어서, 상기 2A 부위는 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 243

제241항에 있어서, 상기 1개 이상의 절단 부위는 프로테아제 부위를 더 포함하는, 조성물.

청구항 244

제243항에 있어서, 상기 프로테아제 부위는 푸린 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 245

제244항에 있어서, 상기 푸린 부위는 FC1, FC2 또는 FC3 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 246

제243항에 있어서, 상기 프로테아제 부위는 5'에서 3' 순서에서 상기 2A 부위 앞에 있는, 조성물.

청구항 247

조성물로서, 제1 다시스트론성 벡터를 포함하는 제1 바이러스 및 제2 다시스트론성 벡터를 포함하는 제2 바이러스를 포함하되,

상기 제1 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고;

상기 제2 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 248

제247항에 있어서, 상기 제1 바이러스 및/또는 제2 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로 바이러스, 렌티바이러스 또는 파지인, 조성물.

청구항 249

제247항 또는 제248항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자 및 제2 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, CR1, DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1,

Serpinb9, CC121 및 Mfge8로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된, 조성물.

청구항 250

제249항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자 및 제2 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 조성물.

청구항 251

제250항에 있어서, 상기 CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 252

제247항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 CAR과 상기 제2 CAR은 상이하고, CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR 및 BCMA CAR로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된, 조성물.

청구항 253

제247항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 CAR 및/또는 상기 제2 CAR은 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한, 조성물.

청구항 254

제247항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 CAR은 CD19 CAR이고, 상기 제2 CAR은 CD22 CAR인, 조성물.

청구항 255

제247항 내지 제254항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1개 이상의 절단 부위는 자기-절단 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 256

제255항에 있어서, 상기 자기-절단 부위는 2A 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 257

제256항에 있어서, 상기 2A 부위는 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 258

제256항에 있어서, 상기 1개 이상의 절단 부위는 프로테아제 부위를 더 포함하는, 조성물.

청구항 259

제258항에 있어서, 상기 프로테아제 부위는 퓨린 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 260

제259항에 있어서, 상기 퓨린 부위는 FC1, FC2 또는 FC3 부위를 포함하는, 조성물.

청구항 261

제258항에 있어서, 상기 프로테아제 부위는 5'에서 3' 순서에서 상기 2A 부위 앞에 있는, 조성물.

청구항 262

숙주 세포의 이중성 집단의 생성 방법으로서, 제233항 내지 제261항 중 어느 한 항의 조성물을 상기 숙주 세포의 집단에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 263

제262항의 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 이중성 집단.

청구항 264

제263항에 있어서, 상기 숙주 세포는 자가 세포인, 숙주 세포의 집단.

청구항 265

제263항에 있어서, 상기 숙주 세포는 동종이계 세포인, 숙주 세포의 집단.

청구항 266

제263항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC인, 숙주 세포의 집단.

청구항 267

제263항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된, 숙주 세포의 집단.

청구항 268

제263항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1차 세포인, 숙주 세포의 집단.

청구항 269

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 숙주 세포는 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포인, 숙주 세포의 집단.

청구항 270

제263항 내지 제269항 중 어느 한 항의 숙주 세포의 집단을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 271

질환의 치료를 필요로 하는 대상체의 질환 치료 방법으로서, 제263항 내지 제269항 중 어느 한 항의 숙주 세포의 집단 또는 제270항의 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 272

제271항에 있어서, 상기 질환은 암인, 방법.

청구항 273

제272항에 있어서, 상기 암은 CD19, CD20, CD22 및/또는 BCMA 발현과 연관된, 방법.

청구항 274

제272항에 있어서, 상기 암은 혈액 악성종양인, 방법.

청구항 275

제274항에 있어서, 상기 혈액 악성종양은 골수성 신생물, 골수형성 이상증후군(MDS), 골수증식성/골수형성 이상증후군, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), T 세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), T 세포 림프종 및 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 276

제271항에 있어서, 상기 질환은 자가면역질환인, 방법.

청구항 277

제276항에 있어서, 상기 자가면역질환은 루푸스, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 궤양성 대장염, 에디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염 및 쉐리악

병으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 278

제271항에 있어서, 상기 질환은 진성 당뇨병인, 방법.

청구항 279

제278항에 있어서, 상기 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨병 전증 및 임신성 당뇨병으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 280

제271항에 있어서, 상기 질환은 신경학적 질환인, 방법.

청구항 281

제280항에 있어서, 상기 신경학적 질환은 강경증, 뇌전증, 뇌염, 뇌수막염, 편두통, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 펠리제우스-메르즈바하병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된, 방법.

청구항 282

숙주 세포로서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖되, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반되는, 숙주 세포.

청구항 283

제282항에 있어서, MHC 클래스 I 분자의 감소된 발현은 B2M의 감소된 발현에 의하는, 숙주 세포.

청구항 284

제282항에 있어서, MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현은 CIITA의 감소된 발현에 의하는, 숙주 세포.

청구항 285

제282항에 있어서, MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 상기 감소된 발현은 MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현에 의하는, 숙주 세포.

청구항 286

제282항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 녹아웃을 갖는, 숙주 세포.

청구항 287

제282항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는, 숙주 세포.

청구항 288

제282항에 있어서, 상기 숙주 세포는 MHC 클래스 I 분자, MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는, 숙주 세포.

청구항 289

제286항 내지 제288항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 녹아웃은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN),

전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제의 사용에 의하는, 숙주 세포.

청구항 290

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 291

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 하나 이상의 관용원성 인자이고, CD24를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 292

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 293

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 PD-L1을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 294

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24, CD47 및 PD-L1을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 295

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 296

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD55를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 297

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD59를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 298

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 C1 저해제를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 299

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 300

제282항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 301

제282항 내지 제300항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 다능성 줄기 세포(PSC)인, 숙주 세포.

청구항 302

제301항에 있어서, 상기 PSC는 ESC 또는 iPSC인, 숙주 세포.

청구항 303

제282항 내지 제300항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된, 숙주 세포.

청구항 304

제282항 내지 제300항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙주 세포는 1차 세포인, 숙주 세포.

청구항 305

제303항 또는 제304항에 있어서, 상기 숙주 세포는 T 세포, NK 세포, NKT 세포, β 섬 세포 또는 GPC인, 숙주 세포.

청구항 306

제282항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다시스트론성 벡터는 추가 외인성 구성성분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, 숙주 세포.

청구항 307

제306항에 있어서, 상기 추가 외인성 구성성분은 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자무과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9) 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된 안전 스위치인, 숙주 세포.

청구항 308

T 세포로서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖되, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반되는, T 세포.

청구항 309

NK 세포로서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖되, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반되는, NK 세포.

청구항 310

섬 세포로서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖되, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반되는, 섬 세포.

청구항 311

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 클래스 I 분자의 상기 감소된 발현은 B2M의 감소된 발현에 의하는, 세포.

청구항 312

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 클래스 II 분자의 상기 감소된 발현은 CIITA의 감소된 발현에 의하는, 세포.

청구항 313

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 상기 감소된 발현은 MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현에 의하는, 세포.

청구항 314

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A, 및/또는 MIC-B의 녹아웃을 갖는, 세포.

청구항 315

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는, 세포.

청구항 316

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 MHC 클래스 I 분자, MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는, 세포.

청구항 317

제314항 내지 제316항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 녹아웃은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제의 사용에 의하는, 세포.

청구항 318

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E를 포함하는, 세포.

청구항 319

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 하나 이상의 관용원성 인자이고, CD24를 포함하는, 세포.

청구항 320

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 세포.

청구항 321

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 PD-L1을 포함하는, 세포.

청구항 322

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24, CD47 및 PD-L1을 포함하는, 세포.

청구항 323

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46을 포함하는, 세포.

청구항 324

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD55를 포함하는, 세포.

청구항 325

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD59를 포함하는, 세포.

청구항 326

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 C1 저해제를 포함하는, 세포.

청구항 327

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함하는, 세포.

청구항 328

제308항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함하는, 세포.

청구항 329

제308항 내지 제328항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된, 세포.

청구항 330

제308항 내지 제328항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 1차 세포인, 세포.

청구항 331

제308항 내지 제330항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다시스트론성 벡터는 추가 외인성 구성성분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는, 세포.

청구항 332

제331항에 있어서, 상기 추가 외인성 구성성분은 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자무과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9) 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된 안전 스위치인, 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2021년 7월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/222,954호, 및 2021년 11월 24일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/282,961호의 유익을 주장한다. 이들 가출원의 각각의 내용은 이들의 전문이 참조에 의해 인용된다.

발명의 내용

[0003]

입양 세포 전달(adoptive cell transfer: ACT)로 불리는 최근 생겨난 세포 요법 접근은 인간 질환 치료 현장을 빠르게 변화시키고 있다. ACT는 환자(자가) 또는 건강한 공여자(동종이계)로부터 세포를 수집하고, 이러한 세포를 적용하고, 세포를 환자에 전달하여 질환과 싸우는 것을 수반한다. 대부분의 임상적 성공을 획득한 ACT는 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포 요법이되, 종양-연관 항원에 특이적인 CAR-변형된 T 세포가 생성되고, 환자의 신체에 주입되어 이들의 표면 상에 항원을 보유하는 암 세포를 인식하고 사멸시킨다. 임상 개발에서 가장 멀리 떨어진 CAR-T 세포 요법은 분화 클러스터 19(Cluster of Differentiation 19: CD19)로 불리는 B 세포 상에서 발견된 항원을 표적화하고, 거대 B 세포 림프종의 치료용으로 승인되었다(예를 들어, 티사젠렉루셀(tisagenlecleucel), 리소캅타진 마라루셀(lisocabtagene maraleucel), 브렉수캅타진 오토루셀(brexucabtagene autoleucel), 액시캅타진 실로루셀(axicabtagene ciloleucel) 참조).

[0004]

자가 세포 기반 전략과 비교하여, 표준 재고(off-the-shelf) 동종이계 세포는 환자에 대한 개선된 접근, 품질관리뿐만 아니라 치료 지연의 회피, 악성 오염 및 세포 기능장애를 포함하는 여러 이점을 제공한다. 그러나, 동종

이제 세포는 심각한 이식편대숙주 효과를 야기하고, 숙주 면역계에 의해 빠르게 제거될 수 있다. 따라서 면역 부적합(immune incompatibility)은 ACT의 임상 적용에 대한 유의미한 장벽이며, 환자의 면역계를 회피하기 위한 이식된 세포의 능력은 동종이계 세포 요법의 성공 요인이다. 따라서, 세포-기반 요법을 생산하기 위한 신규한 접근, 조성물 및 방법에 대한 요구가 있다.

[0005] 본 기술은 하나 이상의 관용원성 인자(tolerogenic factor), 하나 이상의 CAR 및 선택적으로 하나 이상의 안전 스위치의 공동 발현을 위한 다시스트론성(polycistronic) 벡터뿐만 아니라 암, 당뇨병 및 신경학적 질환과 같은 질환을 치료하기 위한 조성물 및 이를 이용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어, CD47, HLA-E, HLA-G, PD-L1, CTLA-4 등) 및 CAR(예를 들어, CD19 CAR, CD22 CAR, BCMA CAR 등)의 공동발현을 위한 이시스트론성(bicistronic) 벡터뿐만 아니라 질환을 치료하기 위한 조성물 및 이를 이용하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어, CD47, HLA-E, HLA-G, PD-L1, CTLA-4 등), CAR(예를 들어, CD19 CAR, CD22 CAR, BCMA CAR 등) 및 안전 스위치의 공동 발현을 위한 삼시스트론성 벡터뿐만 아니라 질환을 치료하기 위한 조성물 및 이를 이용하는 방법을 제공한다.

[0006] 일부 양상에서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되며, 제1 발현 카세트는 5'에서 3' 순서에서 제2 발현 카세트 앞에 있다.

[0007] 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, CR1, DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121 및 Mfge8로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47, 예를 들어, 인간 CD47을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간 CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 129 내지 134 중 어느 하나에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, CD47은 코돈 최적화된다. 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 135에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다.

[0008] 일부 실시형태에서, CAR은 CD19 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR은 신호 펩타이드, CD19에 특이적인 세포외(extracellular) 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내(intracellular) 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19에 특이적인 세포외 결합 도메인은 scFv, 예를 들어, FMC63의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 21 내지 23 및 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 21 내지 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR은 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 116에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 서열번호 116에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR은 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다.

[0009] 일부 실시형태에서, CAR은 CD20 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD20 CAR은 신호 펩타이드, CD20에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호

펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD20에 특이적인 세포외 결합 도메인은 scFv, 예를 들어, Leu16의 V_L 및 V_H 를 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 39 내지 41 및 43 내지 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 39 내지 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 43 내지 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함한다.

[0010]

일부 실시형태에서, CAR은 CD22 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD22 CAR은 신호 펩타이드, CD22에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD22에 특이적인 세포외 결합 도메인은 scFv, 예를 들어, m971의 V_H 및 V_L 를 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 47 내지 49 및 51 내지 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 47 내지 49에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 51 내지 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD22에 특이적인 세포외 결합 도메인은 scFv, 예를 들어, m971-L7의 V_H 및 V_L 를 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 56 내지 58 및 60 내지 62에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 56 내지 58에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 60 내지 62에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함한다.

[0011]

일부 실시형태에서, CAR은 BCMA CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR은 신호 펩타이드, BCMA에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드 또는 GMCSFR- α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, BCMA에 특이적인 세포외 결합 도메인은 scFv, 예를 들어, C11D5.3의 V_L 및 V_H 를 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 65 내지 67 및 69 내지 71에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 65 내지 67에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 69 내지 71에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, BCMA에 특이적인 세포외 결합 도메인은 scFv, 예를 들어, C12A3.2의 V_L 및 V_H 를 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 74 내지 76 및 78 내지 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 74 내지 76에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 78 내지 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 CT103A scFv의 V_L 및 V_H 를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 120 내지 122 및 124 내지 126에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 120 내지 122에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, scFv는 서열번호 124 내지 126에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시형태에서, BCMA에 특이적인 세포외 결합 도메인은 완전 인간 중쇄 가변 도메인(FHvH), 예를 들어, FHvH33을 포함한다. 일부 실시형태에서, FHvH는 서열번호 82 내지 84에 제시된 아미노산 서열을 갖는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인 또는 IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막관통은 CD8 α 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인 또는 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함한다.

- [0012] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 절단 부위는 자기-절단 부위, 예를 들어, 2A 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 2A 부위는 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 부위를 포함한다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 절단 부위는 프로테아제 부위, 예를 들어, 퓨린 부위를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 퓨린 부위는 FC1, FC2 또는 FC3 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로테아제 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리된다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자무과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9), 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9), CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, RQR8 및 CD47-SIRP α 차단제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 프로모터를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 구성적 프로모터, 예를 들어, EF1 α , CMV, SV40, PGK, UBC 또는 CAG 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터, 예를 들어, Tet-On, Tet-Off, AlcA, LexA 또는 Cre 프로모터이다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 게놈 좌위에, 예를 들어, Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제(site-directed nuclease)의 사용에 의해, 상동 유도 수선(homology directed repair: HDR)-매개 삽입을 위한 발현 카세트에 측접하는 상동성 아암을 추가로 포함한다.
- [0017] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된다.
- [0018] 일부 양상에서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, CD19 CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47을 포함한다.
- [0019] 일부 양상에서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, CD19 CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, IgG4 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47을 포함한다.
- [0020] 일부 양상에서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, CD19 CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47을 포함한다.
- [0021] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드

드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된다.

[0022] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된다.

[0023] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트 및 (d) 임의의 2개의 이웃하는 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트 및 (d) 임의의 2개의 이웃하는 발현 카세트를 분리시키는 퓨린 부위 및 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (e) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제4 발현 카세트를 더 포함하되, 제4 발현 카세트는 제1 발현 카세트, 제2 발현 카세트 및/또는 제3 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된다.

[0024] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위에 의해 분리된다.

[0025] 일부 양상에서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, BCMA CAR은 BB2121 결합제, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47을 포함한다.

[0026] 일부 양상에서, (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, BCMA CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, CT103A scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, BCMA는 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47을 포함한다.

[0027] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다.

- [0028] 일부 양상에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따라 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는 바이러스가 제공된다. 일부 실시형태에서, 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 또는 파지이다.
- [0029] 일부 양상에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따라 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 자가 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 동종이계 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 배아 줄기 세포(ESC) 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1차 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포 또는 자연 살해 T(NKT) 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 β 섬 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 신경아교 전구체 세포(GPC)이다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편은 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위(safe harbor locus)로 이루어진 군으로부터 선택된 숙주 세포의 특정 게놈 좌위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 삽입은 상동 유도 수선(HDR), 예를 들어, Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제를 이용하는 것에 의한다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1개 이상의 MHC I 분자 및/또는 1개 이상의 MHC II 분자의 감소된 발현을 갖도록 변형되되, 선택적으로, 1개 이상의 MHC I 분자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C로 이루어진 군으로부터 선택되고, 선택적으로, 1개 이상의 MHC II 분자는 HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM 및 HLA-DO로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 갖는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자에서 일어난다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현을 갖는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 MIC-A 및/또는 MIC-B 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, MIC-A 및/또는 MIC-B 녹아웃은 대립유전자에서 일어난다.
- [0032] 일부 양상에서, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는 T 세포가 제공되되, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함한다. 일부 양상에서, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 포함하는 T 세포가 제공되되, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함하고, T 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자에서 일어난다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편은 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된 T 세포의 특정 게놈 좌위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, CAR은 CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR 또는 BCMA CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 CD19 CAR이다. 일부 실시형태에서, CAR은 GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, IgG4 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 CD19 CAR이다. 일부 실시형태에서, CAR은 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 CD19 CAR이거나, 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, CAR은 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD19 CAR이다. 일부 실시형태에서, CAR은 CD8 α 신호 펩타이드, CT103A scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 BCMA CAR이다. 일부 실시형태에서, CAR은 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 BCMA CAR이거나, 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다.

- [0033] 일부 양상에서, HDR에 의해 변형된 게놈 좌위를 갖는 세포가 제공되며, 게놈 좌위는 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, HDR은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제를 사용한다.
- [0034] 일부 양상에서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) 안전 항만 좌위에 삽입된 안전 스위치 및 CD47을 포함하는 이식유전자를 갖는 iPSC-유래 β 섬 세포가 제공되며, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양상에서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) CLYBL 상동성 아암에 축적된 CD47 및 HSVtk를 포함하는 이식유전자를 갖는, iPSC-유래 β 섬 세포가 제공되며, 이식유전자는 CLYBL 좌위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, iPSC-유래 β 섬 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자에서 일어난다.
- [0035] 일부 양상에서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) 안전 항만 좌위에 삽입된 안전 스위치 및 CD47을 포함하는 이식유전자를 갖는 ESC-유래 GPC가 제공되며, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 양상에서, (1) MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현; 및 (2) CLYBL 상동성 아암에 축적된 CD47 및 HSVtk를 포함하는 이식유전자를 갖는, ESC-유래 GPC가 제공되며, 이식유전자는 CLYBL 좌위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, ESC-유래 GPC는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 대립유전자에서 일어난다.
- [0036] 일부 양상에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 다시스트론성 벡터를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 양상에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 바이러스를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 양상에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 숙주 세포 또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0037] 일부 양상에서, B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된 게놈 좌위에의 이식유전자의 HDR-매개 삽입에서 사용하기 위한 가이드 RNA(gRNA)가 제공된다. 일부 실시형태에서, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0038] 일부 실시형태에서, gRNA는 crRNA 및 선택적으로 tracrRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 2개의 별개의 분자로서 crRNA 및 tracrRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)로서 crRNA 및 tracrRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 상보적 영역, crRNA 반복부 영역, 테트라루프 및 tracrRNA를 포함한다.
- [0039] 일부 실시형태에서, crRNA 반복부 영역은 서열번호 95, 서열번호 99, 서열번호 103 또는 서열번호 108에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 테트라루프는 서열번호 96 또는 서열번호 107에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, tracrRNA는 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 105 또는 서열번호 106에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.
- [0040] 일부 실시형태에서, crRNA는 AAVS1, CLYBL 또는 CCR5 좌위의 영역에 특이적인 상보적 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 영역은 암호화 서열(CDS), 엑손, 인트론, 엑손의 일부 및 인접한 인트론의 일부에 걸쳐있는 서열, 또는 조절 영역이다. 일부 실시형태에서, 상보적 영역은 서열번호 110, 서열번호 111 또는 서열번호 112에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진다.
- [0041] 일부 양상에서, 게놈 좌위에 이식유전자의 HDR-매개 삽입에서 사용하기 위한 가이드 RNA(gRNA)가 제공되며, 게놈 좌위는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796, 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860 또는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된다. 특정 이들 실시형태에서, 좌위는 염색체 19:

55,115,674, 염색체 13: 99,822,980, 또는 염색체 3: 46,373,180의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내이다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674, 염색체 13: 99,822,980, 또는 염색체 3: 46,373,180에서, 또는 염색체 19: 55,115,674, 염색체 13: 99,822,980 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50개의 뉴클레오타이드 이내에서 절단 부위를 생산하도록 구성된다.

[0042] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 gRNA를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 부위-지정 뉴클레아제 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 부위-지정 뉴클레아제 단백질질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함한다.

[0043] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 gRNA를 포함하는 조성물은 세포에 전달을 위해 제형화된다. 일부 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 부위-지정 뉴클레아제 단백질질을 암호화하는 부위-지정 뉴클레아제 또는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함한다.

[0044] 일부 양상에서, gRNA, 부위-지정 뉴클레아제 또는 부위-지정 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 상동성 아암에 측접되는 이식유전자를 숙주 세포에 도입하는 단계를 포함하는 게놈 좌위의 이식유전자의 HDR-매개 삽입 방법이 제공되되, 부위-지정 뉴클레아제는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 게놈 좌위는 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위, MIC-A 좌위, MIC-B 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 안전 항만 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0045] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본 기술의 다양한 실시형태에 따라 gRNA에 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 게놈 좌위는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796, 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860, 또는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된다. 특정 이들 실시형태에서, 좌위는 염색체 19: 55,115,674, 염색체 13: 99,822,980, 또는 염색체 3: 46,373,180의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내이다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674, 염색체 13: 99,822,980, 또는 염색체 3: 46,373,180에서, 또는 염색체 19: 55,115,674, 염색체 13: 99,822,980 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50개의 뉴클레오타이드 이내에서 절단 부위를 생산하도록 구성된다.

[0046] 일부 실시형태에서, 이식유전자는 (a) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트, 및/또는 (d) 제1 발현 카세트, 제2 발현 카세트 및/또는 제3 발현 카세트를 분리시키는 1개 이상의 절단 부위를 포함한다.

[0047] 일부 양상에서, (a) 알려진 gRNA에 기반하여 게놈 좌위를 위치시키는 단계; 및 (b) PAM 서열에 대해 게놈 좌위의 측면 중 하나 상에서 약 500 내지 4000 bp의 영역을 스캐닝하는 단계를 포함하는, 이식유전자의 HDR-매개 삽입을 위한 새로운 게놈 좌위를 확인하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 게놈 좌위는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796, 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860, 또는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 좌위의 4000 bp 이내에 위치된다. 일부 실시형태에서, 게놈 좌위는 염색체 19: 55,115,674 또는 염색체 19: 55,115,674; 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치, 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치; 및 염색체 3: 46,373,180, 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오타이드 이내의 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 위치된다.

[0048] 일부 양상에서, 숙주 세포 또는 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 세포, 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환 치료를 필요로 하는 대상체의 질환 치료 방법이 제공된다.

[0049] 일부 실시형태에서, 질환은 암, 예를 들어, CD19, CD20, CD22 및/또는 BCMA 발현과 연관된 암이다. 일부 실시형태에서, 암은 혈액 악성종양이다. 일부 실시형태에서, 혈액 악성종양은 골수성 신생물, 골수형성 이상증후군

(MDS), 골수증식성/골수형성 이상증후군, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), T 세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), T 세포 림프종 및 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 혈액 악성종양은 B 림프구-유래 악성종양이다.

[0050] 일부 실시형태에서, 질환은, 예를 들어, 루푸스, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 궤양성 대장염, 에디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염 및 쉐리악병을 포함하는 자가면역질환이다.

[0051] 일부 실시형태에서, 질환은, 예를 들어, I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨병 전증 및 임신성 당뇨병을 포함하는 진성 당뇨병이다.

[0052] 일부 실시형태에서, 질환은, 예를 들어, 강경증, 뇌전증, 뇌염, 뇌수막염, 편두통, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 펠리제우스-메르쯔바하병 및 다발성 경화증을 포함하는 신경학적 질환이다.

[0053] 일부 양상에서, 제1 다시스트론성 벡터 및 제2 다시스트론성 벡터를 포함하는 조성물이 제공되되, 제1 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 제2 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 관용원성 인자 및 제2 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, CR1, DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121 및 Mfge8로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, 제1 관용원성 인자 및 제2 관용원성 인자는 CD47을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR과 제2 CAR은 상이하고, CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR 및 BCMA CAR로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR 및/또는 제2 CAR은 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR은 CD19 CAR이고, 제2 CAR은 CD22 CAR이다.

[0054] 일부 양상에서, 제1 다시스트론성 벡터를 포함하는 제1 바이러스 및 제2 다시스트론성 벡터를 포함하는 제2 바이러스를 포함하는 조성물이 제공되되, 제1 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제1 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 제2 다시스트론성 벡터는, 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되는, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 제2 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 바이러스 및/또는 제2 바이러스는 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 또는 파지이다. 일부 실시형태에서, 제1 관용원성 인자 및 제2 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, CR1, DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121 및 Mfge8로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, 제1 관용원성 인자 및 제2 관용원성 인자는 CD47을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR과 제2 CAR은 상이하고, CD19 CAR, CD20 CAR, CD22 CAR 및 BCMA CAR로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR 및/또는 제2 CAR은 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 32, 34, 36, 117, 128 및 136 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR은 CD19 CAR이고, 제2 CAR은 CD22 CAR이다.

[0055] 일부 양상에서, 숙주 세포의 집단에 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 조성물을 도입하는 단계를 포함하는, 숙주 세포의 이중 집단을 생성하는 방법이 제공된다. 일부 양상에서, 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 이중 집단이 제공된다. 일부 양상에서, 기재된 바와 같은 숙주 세포의 집단을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 양상에서, 기재된 바와 같은 숙주 세포의 집단 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환 치료를 필요로 하는 대상체의 질환 치료 방법이 제공된다.

[0056] 일부 양상에서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상

의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖는 숙주 세포가 제공되되, 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반된다.

[0057] 일부 실시형태에서, MHC 클래스 I 분자의 감소된 발현은 B2M의 감소된 발현에 의한다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현은 CIITA의 감소된 발현에 의한다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현은 MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현에 의한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A, 및/또는 MIC-B의 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 MHC 클래스 I 분자, MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, 녹아웃은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제의 사용에 의한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 PD-L1을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24, CD47 및 PD-L1을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD55를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD59를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 C1 저해제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함한다.

[0059] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 다능성 줄기 세포(PSC)이다. 일부 실시형태에서, PSC는 ESC 또는 iPSC이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1차 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 T 세포, NK 세포, NKT 세포, β 섬 세포 또는 GPC이다.

[0060] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 추가 외인성 구성성분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가 외인성 구성성분은 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9) 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된 안전 스위치이다.

[0061] 일부 양상에서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖는 T 세포가 제공되되, 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반된다.

[0062] 일부 양상에서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖는 NK 세포가 제공되되, 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반된다.

[0063] 일부 양상에서, 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현 및 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 갖는 섬 세포가 제공되되, 하나 이상의 관용원성 인자는 제1항 내지 제118항 중 어느 한 항의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편에 의해 운반된다.

[0064] 일부 실시형태에서, MHC 클래스 I 분자의 감소된 발현은 B2M의 감소된 발현에 의한다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현은 CIITA의 감소된 발현에 의한다. 일부 실시형태에서, MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현은 MIC-A 및/또는 MIC-B의 감소된 발현에 의한다. 일부 실시형태에서, 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A, 및/또는 MIC-B의 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포는 1개 이상의 MHC 클래스 I 분자, 1개 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B의 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포는 MHC 클래스 I 분자, MHC 클래스 II 분자, MIC-A 및 MIC-B

의 Nickase를 갖는다. 일부 실시형태에서, Nickase는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효소기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-연관 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제의 사용에 의한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 PD-L1을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24, CD47 및 PD-L1을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD55를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD59를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 C1 저해제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59 및 C1 저해제를 포함한다.

[0066] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1차 세포이다.

[0067] 일부 실시형태에서, 다이스트론성 벡터는 추가 외인성 구성성분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가 외인성 구성성분은 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자무과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9) 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된 안전 스위치이다.

도면의 간단한 설명

[0068] **도 1A 내지 도 1C**는 본 기술의 특정 실시형태에 따른 이시스트론성 벡터의 설계 및 대안의 설계를 나타내는 개략도이다. **도 1A**는 벡터가 EF1 α 프로모터, CD47에 대한 암호화 서열, 절단 부위, 및 CD19 CAR에 대한 암호화 서열을 갖는 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터의 일반적 설계를 나타낸다. 절단 부위는 선택적으로 2A 부위(상단) 또는 2A 부위 단독(하단)에 추가로 퓨린 부위를 가질 수 있다. **도 1B**는 세포를 형질도입하기 위해 CD19 CAR 및 CD47을 각각 암호화하는 2개의 렌티바이러스 벡터를 이용하는 공동-형질도입 설계를 나타낸다. **도 1C**는 CD47 및 CD19 CAR의 5'에서 3' 순서가 반전되는, 즉, CD19 CAR을 제1 발현 카세트에 위치시키고 CD47을 이시스트론성 벡터의 제2 발현 카세트에 위치시키는 CD19 CAR-CD47 벡터의 대안의 설계를 나타낸다. FC, 퓨린 절단 부위.

도 2는 표시된 바와 같은 벡터 작제물(들)로 형질감염된 1차 T 세포에서 CD47(수직 척도) 및 CD19 CAR(수평 척도)의 발현 수준을 나타내는 유세포분석 플롯이다. LV, 렌티바이러스; *co, 코돈 최적화; Koz, Kozak 공통서열.

도 3는 표시된 바와 같은 상이한 벡터 작제물로 형질도입된 세포에서의 CD47의 발현 수준을 나타낸다.

도 4는 표시된 바와 같은 상이한 벡터 작제물로 형질도입된 세포에서의 CD19 CAR의 발현 수준을 나타낸다.

도 5는 표시된 바와 같은 상이한 벡터 작제물로 형질도입된 HIP CAR-T 세포(B2M 및 CIITA 결실에 의한 HLA-I/II Nickase(KO)이 있음)에서의 총 CD47 분자의 양을 나타낸다.

도 6는 CD47-CD19 CAR-형질도입된 HIP CAR-T 세포에서의 자연살해(NK) 및 대식세포 사멸의 시험관내 xCELLigence 분석 결과를 나타낸다. KO, Nickase; copt, 코돈 최적화.

도 7A는 CD47 및 안전 스위치의 공동 발현을 위한 이시스트론성 벡터의 설계를 나타내는 개략도이다. 이시스트론성 벡터는 CAG 프로모터, CD47에 대한 암호화 서열, 및 안전 스위치(예를 들어, 사이토신 데아미나제(CyD), 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk))에 대한 암호화 서열, 다음에 HA 태그를 갖는 작제물을 포함한다. CD47에 대한 암호화 서열 및 안전 스위치에 대한 암호화 서열은 2A 부위에 의해 분리된다. 5'에서 3' 순서에서, 안전 스위치에 대한 암호화 서열은 CD47에 대한 암호화 서열(상단)에 앞설 수 있거나, 그 반대이다(하단). 작제물은 상동 유도 수선(HDR)을 통해 유도된 삽입을 위한 CLYBL 안전 항만 좌위에 측접하는 영역과 상보적인 좌측 및 우측 상동성 아암(LHA, RHA)에 측접된다. **도 7B**는 본 기술의 특정 실시형태에 따른 CD47과 CyD의 공동 발현을 위한 이시스트론성 벡터의 설계를 나타낸다. 이시스트론성 벡터는 CAG 프로모터를 갖는 작제물, CyD에 대한 암호화 서열 다음에 HA 태그, 2A 부위, 및 CD47에 대한 암호화 서열을 포함한다. 작제물은 CLYBL 안전 항만 좌위에 부위-지정 삽입을 위해 CLYBL LHA 및 RHA에 측접된다. **도 7C**는 본 기술의 특정 실시형태에 따른 CD47과

HSVtk의 공동 발현을 위한 다른 이시스트론성 벡터의 설계를 나타낸다. 이시스트론성 벡터는 CAG 프로모터, CD47에 대한 암호화 서열, 2A 부위, 및 HSVtk에 대한 암호화 서열 다음에 HA 태그를 갖는 작제물을 포함한다. 작제물은 CLYBL 안전 항만 좌위에 부위-지정 삽입을 위해 CLYBL LHA 및 RHA에 측정된다.

도 8은 CyD-CD47 형질도입(클론 2-G11을 대표적인 것으로 도시함) iPSC 및 분화 후에 대한 야생형(WT)에서의 CD47 발현 수준을 나타낸다.

도 9는 상이한 농도(μM)의 5-플루오로사이토신(5-FC)의 존재하의 클론 2-G09 및 2-G11에서의 세포 계수에 의해 측정된 바와 같은 CyD 사멸 곡선을 나타낸다. 흰색 삼각형은 iPSC를 나타내고; 검정 삼각형은 분화 세포를 나타낸다.

도 10은 2주에 걸친 CD47-HSVtk 클론 1-B10, 1-C02, 2-F09 및 1-H04에서의 CD47 발현 수준을 나타낸다.

도 11은 CD47-HSVtk 클론 1-B10, 1-C02, 2-F09 및 1-H04, 대조군으로서 CyD-CD47 클론 2-G09에서 WT에 대한 CD47 배수 과발현을 나타낸다.

도 12는 상이한 농도(μM)의 간시클로버(GCV)의 존재하에 CD47-HSVtk 클론 1-B10, 1-C02, 2-F09, 1-G10 및 1-H04에서의 살아있는 세포 계수%에 의해 측정된 바와 같은 HSVtk 사멸 곡선을 나타낸다. 각 클론에 대한 계산된 IC50 및 R 제곱(R^2) 값을 또한 나타낸다.

도 13은 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터(상단) 및 CD47-CD22 CAR 이시스트론성 벡터(하단)의 설계를 나타낸다.

도 14는 CD47-CD19 CAR, CD47-CD22 CAR(PLAS2199) 및 CD22 CAR-CD47 (PLAS2218) 렌티바이러스의 물리적 및 기능적 분석을 나타낸다. 좌측 패널, 게놈 정량화 분석(GQA); 중간 패널, 기능적 역가 분석; 우측 패널, 입자 대 감염성 분석.

도 15는 CD47-CD19 CAR 및 CD47-CD22 CAR/CD22 CAR-CD47 렌티바이러스를 이용하는 이중 형질도입 접근의 흐름도를 나타낸다.

도 16은 CD47, CD19 CAR 및 CD22 CAR 발현 수준을 시험하기 위한 형질도입 T 세포의 유세포분석의 예시적 개폐 전략을 나타낸다.

도 17은 표시된 바와 같은 렌티바이러스(들)에 의해 형질도입된 CD4+(상단 패널) 및 CD8+(하단 패널) T 세포에서의 CD19 CAR(수직 척도) 및 CD22 CAR(수평 척도)의 발현 수준을 나타내는 유세포분석 플롯이다.

도 18은 상이한 공여자 및 바이러스 로트에 걸쳐 CAR-발현 세포의 백분율로 나타내는 바와 같은 단일 및 이중 형질도입 접근 효율을 나타낸다. 상단 패널은 총 생성물 집단의 백분율을 나타내고; 하단 패널은 총 형질도입 세포의 백분율을 나타낸다. 각 기호의 색은 각각 독립적 공여자, CD19 CAR 바이러스 또는 CD22 CAR 바이러스를 나타낸다.

도 19는 표시된 바와 같은 렌티바이러스(들)로 형질도입된 공여자 세포에서의 CD47, CD19 CAR, 및 CD22 CAR 발현 수준의 중간 형광 강도(MFI)를 나타낸다.

도 20은 표시된 바와 같은 렌티바이러스(들)로 형질도입된 공여자 세포에서의 QiFi(Agilent) 분석 및 벡터 복제 수(VCN)에 의해 정량화된 바와 같은 CD47 발현 수준을 나타낸다.

도 21A는 표시된 바와 같은 렌티바이러스(들)를 이용하는 단일 및 이중 형질도입 접근의 VCN을 시험하는 분석의 흐름도를 나타낸다. 도 21B는 이중 및 단일 형질도입 세포로부터의 VCN을 나타낸다.

도 22는 표시된 바와 같이 CD47-CD19 CAR로 단일 형질도입된 T 세포(CD19 CAR-T 세포), CD47-CD22 CAR로 단일 형질도입된 T 세포(CD22 CAR-T 세포) 또는 CD47-CD19 CAR/CD47-CD22 CAR로 이중 형질도입된 T 세포(CD19×CD22 CAR-T 세포)로 처리된 적색 형광 단백질(RFP)-표지 대조군 NALM, NALM CD19 녹아웃(KO), 및 NALM CD22 KO 세포의 세포독성(IncuCyte®, 상단 패널) 및 사이토카인(Meso Scale Discovery, 하단 패널) 분석 결과를 나타낸다. 세포독성은 시간에 따른 RFP의 총 통합 강도에 의해 측정되었다.

도 23은 표시된 바와 같이 다양한 효과기(E) 대 표적(T)(E:T) 비에서 다양한 NALM 및 RAJI 종양 세포에 대해 (1) 모의; (2) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스 단독; (3) CD22 CAR-CD47 렌티바이러스 단독; (4) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스 및 CD22 CAR-CD47 렌티바이러스 혼합물(CD47-CD19 CAR×CD22 CAR-CD47); 및 (5) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스 및 CD47-CD22 CAR 렌티바이러스 혼합물(CD47-CD19 CAR×

CD47-CD22 CAR)로 형질도입된 T 세포의 루시페라제 분석에 의해 측정된 바와 같은 세포독성을 나타낸다. E:T 비는 T 세포수 대 NALM 또는 RAJI 세포수의 비로서 정의되었다.

도 24는 단일 또는 이중 형질도입된 CAR-T 세포의 생산, 분류 및 시험의 흐름도를 나타낸다. CAR 선택 1은 CD19 CAR에 대한 항-이디오타입-바이오틴 및 항-바이오틴 마이크로비드 및 CD22 CAR에 대한 이중 형질도입된 T 세포 및 가용성 CD22-바이오틴을 수반하고; CAR 선택 2는 이중 형질도입된 집단에서 CD22 CAR에 대한 가용성 CD22-바이오틴을 수반한다.

도 25는 분류 전(상단 패널) 및 분류 후(하단 패널) 표시된 바와 같은 렌티바이러스(들)에 의해 형질도입된 CD4+(좌측 패널) 및 CD8+(우측 패널) T 세포에서의 CD19 CAR(수직 척도) 및 CD22 CAR(수평 척도)의 발현 수준을 나타내는 유세포분석 플롯이다.

도 26는 표시된 바와 같이 모의, CD19 CAR-T, CD22 CAR-T 또는 CD19×CD22 CAR-T 세포로 처리된 RFP-표지된 NALM 세포의 세포독성 곡선을 나타낸다. 세포독성은 시간에 따른 RFP의 총 통합 강도에 의해 측정되었다. E:T 비는 각 그래프의 하단 좌측 모서리에 표시되어 있고, CAR-발현 T 세포수 대 NALM 세포수의 비에 기반하였다.

도 27는 표시된 바와 같이 모의, CD19 CAR-T, CD22 CAR-T 또는 CD19×CD22 CAR-T 세포로 처리된 RFP-표지된 CD19 KO NALM 세포의 세포독성 곡선을 나타낸다. 세포독성은 시간에 따른 RFP의 총 통합 강도에 의해 측정되었다. E:T 비는 각 그래프의 하단 좌측 모서리에 표시되어 있고, CAR-발현 T 세포수 대 NALM 세포수의 비에 기반하였다.

도 28는 표시된 바와 같이 모의, CD19 CAR-T, CD22 CAR-T 또는 CD19×CD22 CAR-T 세포로 처리된 RFP-표지된 CD22 KO NALM 세포의 세포독성 곡선을 나타낸다. 세포독성은 시간에 따른 RFP의 총 통합 강도에 의해 측정되었다. E:T 비는 각 그래프의 하단 좌측 모서리에 표시되어 있고, CAR-발현 T 세포수 대 NALM 세포수의 비에 기반하였다.

도 29는 표시된 바와 같은 다양한 E:T 비(수평 척도)에서 모의, CD19 CAR-T, CD22 CAR-T, 또는 CD19×CD22 CAR-T 세포로 처리된 대조군 NALM, CD19 KO NALM, 및 CD22 KO NALM 세포의 사이토카인 수준(수직 척도)을 나타낸다.

도 30는 CD19 KO NALM 종양 생착 마우스 모델에서 종양 성장을 제어하는 CD22 CAR-T 및 이중 형질도입된 CD19×CD22 CAR-T 세포의 능력을 시험하는 연구 설계를 나타낸다.

도 31 내지 도 34는 종양 세포의 생물발광(**도 31, 도 33**) 및 전체 마우스 영상화(**도 32, 도 34**)에 의해 측정된 바와 같은 CD19 KO NALM(**도 31 내지 도 32**) 및 RAJI(**도 33 내지 도 34**) 마우스 모델에서의 CD22 CAR-T 및 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포에 의한 종양 성장의 효과적인 저해를 나타낸다.

도 35는 이중 형질도입된, 또는 이중 형질도입 및 분류된, CD19×CD22 CAR-T 세포가 종양 성장을 제어하는 능력과 NALM 종양 생착 마우스 모델에서 CD19 CAR- 및 CD22 CAR-T 세포의 조합물의 능력을 비교하는 연구 설계를 나타낸다.

도 36는 종양 세포의 생물발광에 의해 측정된 바와 같이 NALM 마우스 모델에서의 단일 형질도입된 CAR-T 세포의 혼합물에 비해서 이중 형질도입된, 또는 이중 형질도입 및 분류된, CD19×CD22 CAR-T 세포에 의한 종양 성장의 더 효과적인 저해를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069]

본 개시내용은 다양한 세포 기반 요법에 대해 숙주 세포에서 하나 이상의 관용원성 인자(예를 들어, CD47, HLA-E, HLA-G, PD-L1, CTLA-4 등), 하나 이상의 CAR(예를 들어, CD19 CAR, CD22 CAR, BCMA CAR 등) 및 선택적으로 하나 이상의 안전 스위치의 공동 발현을 위한 다시스트론성 벡터를 제공한다. 본 명세서에 설명되는 바와 같이, 예를 들어, 동종이계 세포에서 그리고 종종 다른 유전적 변형(예를 들어, B2M 및 CIITA 녹아웃)에 추가로 관용원성 인자의 과발현은 얻어진 세포의 저면역원성(hypoimmunogenicity)을 개선시킬 수 있고, 따라서 수용자에게 이식될 때 면역 거부되지 않을 것이고, 따라서 세포-기반 요법의 유효성을 증가시킬 것이다. 다른 한편으로 다시스트론성 벡터에서 안전 스위치의 포함은 수용자에 대한 세포독성 또는 다른 음성 결과의 경우에 세포의 제어된 사멸을 가능하게 하며, 따라서 관용원성 인자를 이용하는 것을 포함하는 세포 기반 요법의 안전성을 증가시킨다.

[0070]

본 개시내용은 다양한 형태로 구현될 수 있지만, 아래의 여러 실시형태의 설명은 본 개시내용이 본 발명의 예시

로 간주되고 본 발명을 예시된 구체적 실시형태로 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 이해에 의해 이루어진다. 표제는 단지 편의를 위해 제공되며, 본 발명을 임의의 방식으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 임의의 표제 하에 예시된 실시형태는 임의의 다른 표제 하에 예시된 실시형태와 조합될 수 있다.

- [0071] 본 출원에 명시된 다양한 정량적 값에서의 수치적 값의 사용은, 달리 명확하게 표시되지 않는 한, 근사치로 언급되지만, 언급된 범위 내의 최소값과 최대값은 둘 다 "약"이라는 단어가 앞에 있다. 항상 명확하게 언급되는 것은 아니지만, 모든 수치적 표기는 "약"이라는 용어가 앞에 있는 것으로 이해될 것이다. 이러한 범위 형식은 편리함 및 간결함을 위해 사용되며 범위의 제한으로서 분명하게 명시되는 수치적 값을 포함하기 위해 유연하게 이해되어야 할 뿐만 아니라, 각각의 수치적 값 및 하위 범위가 분명하게 명시되는 것과 같이 해당 범위 내에 포괄되는 모든 개개의 수치적 값 또는 하위 범위를 포함한다는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, 약 1 내지 약 200 범위의 비는 약 1 및 약 200의 열거된 제한을 분명하게 포함할 뿐만 아니라, 개개 비, 예컨대, 약 2, 약 3, 및 약 4, 및 하위범위, 예컨대, 약 10 내지 약 50, 약 20 내지 약 100 등을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한 항상 분명하게 언급되지는 않지만, 본 명세서에 기재된 시약은 단지 예시적이며, 이러한 것의 균등물이 당업계에 알려져 있다는 것이 이해되어야 한다.
- [0072] 본 명세서에 참조에 의해 인용되는 임의의 물질이 본 개시내용과 상충되는 정도로, 본 개시내용을 조절한다.
- [0073] 정의
- [0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "약"은 양 또는 농도 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때, 명시된 양의 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 또는 심지어 0.1%의 변동을 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0075] 용어 "항체"는 천연 항체에 추가로, 키메라 항체, 인간 항체, 인간화된 항체 또는 합성 항체를 포함하는, 면역글로불린 또는 이의 일부의 유전자 조작된 또는 달리 변형된 형태를 나타내기 위해 사용된다. 항체는 단클론성 또는 다클론성 항체일 수 있다. 항체가 면역글로불린 분자의 면역적으로 활성인 부분인 해당 실시형태에서, 항체는 단일쇄 가변 단편 항체(scFv), 이황화연결된 Fv, 단일 도메인 항체(sdAb), VHH 항체, 항원-결합 단편(Fab), Fab', F(ab')₂ 단편 또는 다이어바드를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. scFv 항체는 짧은 링커 펩타이드를 갖는 면역글로불린의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역을 연결함으로써 항체로부터 유래된다. 유사하게, 이황화연결된 Fv 항체는 도메인간 이황화결합을 이용하여 V_H 및 V_L을 연결함으로써 생성될 수 있다. 반면에, sdAb는 중쇄 또는 경쇄 중 하나로부터의 가변 영역만으로 이루어지고, 보통 항체의 가장 작은 항원-결합 단편이다. VHH 항체는 중쇄 단독의 항원 결합 단편이다. 다이어바드는 작은 펩타이드 링커에 의해 비공유 연결되거나 또는 서로 공유 결합된 V_H 및 V_L 영역으로 이루어진 scFv 단편의 이량체이다. 면역글로불린 분자의 면역적으로 활성인 일부를 포함하는 것을 포함하는 본 명세서에 개시된 항체는 특정 항원에 결합하는 능력을 보유한다.
- [0076] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원"은 면역 반응을 유발할 수 있는 분자를 지칭한다. 항원은 세포, 세포 추출물, 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 다당류, 다당류 접합체, 다당류 및 다른 분자의 펩타이드 및 비-펩타이드 모방체, 소분자, 지질, 당지질, 탄수화물, 바이러스 및 바이러스 추출물 및 다세포 유기체, 예컨대, 기생충 및 알레르겐을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 항원이라는 용어는 숙주 면역계에 의해 이물질인 것으로 인식되는 임의의 유형의 분자를 광범위하게 포함한다.
- [0077] 용어 "자가면역질환", "자가면역 장애", "염증성 질환" 또는 "염증 장애"는 대상체가 그 자신의 조직 및/또는 세포에 대한 면역 반응을 시작하는 임의의 질환 또는 장애를 지칭한다. 자가면역 장애는 신경, 위장 및 내분비계뿐만 아니라 피부 및 기타 결합조직, 눈, 혈액 및 혈관의 장애를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 대상체 (예를 들어, 인간)에서의 거의 모든 기관계에 영향을 미칠 수 있다. 자가면역질환의 예는 하시모토 갑상선염, 전신 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 그레이브스병, 경피증, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 중증 근무력증 및 당뇨병을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0078] "결합 영역"으로도 지칭되는 "결합 도메인"은 표적과 특이적 및 비공유적으로 회합, 연합 또는 조합되는 능력을 갖는 항체 또는 이의 일부를 지칭한다. 결합 도메인은 생물학적 분자, 분자 복합체 또는 관심의 다른 표적에 대한 임의의 천연 유래, 합성, 반합성 또는 재조합적으로 생산된 결합 상태를 포함한다. 예시적인 결합 도메인은 수용체 엑토도메인, 리간드, scFv, 이황화연결된 Fv, sdAb, VHH 항체, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, 다이어바드, 또는 생물학적 분자, 분자 복합체 또는 관심의 다른 표적에 결합하는 이들의 특이적 능력을 위해 선택된 다른 합성 폴리펩타이드를 포함한다.

- [0079] 키메라 T 세포 수용체 또는 인공 T 세포 수용체로도 알려진 "키메라 항원 수용체(CAR)"라는 용어는 항원-결합과 T 세포 활성화 기능을 둘 다 조합하는 인공적으로 조작된 수용체를 지칭한다. CAR은 결합 도메인을 포함하는 세포의 부분, 예컨대, 항체(예를 들어, scFv)로부터 얻거나 유래된 것을 포함할 수 있다. 세포의 부분은 막관통 도메인을 통해 하나 이상의 세포내 신호전달 또는 효과기 도메인에 연결될 수 있다. CAR은 선택적으로 세포내 공자극 도메인(들)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sadelain et al., Cancer Discov., 3(4):388-398 (2013)] 참조; 또한 문헌[Harris & Kranz, Trends Pharmacol. Sci., 37(3):220-230 (2016); Stone et al., Cancer Immunol. Immunother., 63(11):1163-1176 (2014)] 참조. CAR은 T 세포 표면 상에서 발현되도록 도입될 수 있고, 따라서, T 세포는 CAR이 결합하도록 설계된 항원을 발현시키는 표적 세포(예를 들어, 암 세포)를 표적화 및 사멸시킬 수 있다.
- [0080] 용어 "코돈 최적화된" 또는 "코돈 최적화"는 뉴클레오타이드 서열을 지칭할 때, 암호화 뉴클레오타이드에서 동의어 코돈(synonymous codon)(즉, 동일한 아미노산을 암호화하는 코돈)의 발생 빈도가 상이한 종에서 편향된다는 발견에 기반한다. 이러한 코돈 축중은 동일한 폴리펩타이드가 다양한 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되는 것을 가능하게 한다. 코돈 최적화는 얻어진 폴리펩타이드 서열을 변화시키는 일 없이 숙주 세포의 선호도에 기반하여 암호화 뉴클레오타이드 서열에서의 특정 코돈을 동의어 코돈으로 치환하는 과정을 지칭한다. 다양한 코돈 최적화 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 적어도 미국 특허 제5,786,464호 및 제6,114,148호에 개시된 방법을 포함한다.
- [0081] 용어 "상보성 결정 영역(CDR)"은 "초가변 영역" 또는 "HVR"과 동의어이고, 일반적으로, 항원 특이성 및/또는 결합 친화도를 부여하고 1차 구조에서 프레임워크 서열에 의해 서로로부터 분리되는 항체 가변 영역 내의 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 알려져 있다. 일부 경우에, 프레임워크 아미노산은 또한 결합에 기여할 수 있다. 일반적으로, 각 가변 영역에 3개의 CDR이 있다. 가변 도메인 서열은 넘버링 체계(예를 들어, Kabat, EU, international ImMunoGeneTics information system®(IMGT®), 및 Aho)로 정렬될 수 있고, 이는 항체 넘버링 및 항원 수용체 분류(Antibody Numbering and Antigen Receptor Classification: ANARCI) 소프트웨어 도구 (2016, Bioinformatics 15:298-300)를 이용해서 동등한 잔기 위치에 주석이 달리고 상이한 분자가 비교되게 할 수 있다.
- [0082] 용어 "작제물"은 재조합 핵산 분자를 포함하는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 작제물은 벡터(예를 들어, 박테리아 벡터, 바이러스 벡터)에 존재할 수 있거나, 게놈에 통합될 수 있다. "벡터"는 특정 핵산 서열을 세포에 또는 다른 핵산 서열에 도입할 수 있거나 또는 다른 핵산 분자를 수송하는 수단으로서의 핵산 분자이다. 벡터는, 예를 들어, 염색체, 비-염색체, 반합성 또는 합성 핵산 분자를 포함할 수 있는 플라스미드, 코스미드, 바이러스, RNA 벡터 또는 선형 또는 원형 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 예시적인 벡터는 폴리뉴클레오타이드를 세포 게놈(예를 들어, 바이러스 벡터)에 전달할 수 있거나, 또는 이들이 연결된 핵산 분자(발현 벡터)를 발현시킬 수 있는 자율 복제할 수 있는 것(에피솜 벡터)이다.
- [0083] 용어 "에피토프"는 동족 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 T 세포 수용체, 또는 다른 결합 분자, 도메인, 또는 단백질에 의해 인식되고 특이적으로 결합된 임의의 분자, 구조, 아미노산 서열 또는 단백질 결정소를 포함한다.
- [0084] 용어 "발현"은 폴리펩타이드가 유전자와 같은 핵산 분자의 암호화 서열에 기반하여 생산되는 과정을 지칭한다. 과정은 전사, 전사 후 제어, 전사 후 변형, 번역, 번역 후 제어, 번역 후 변형, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 발현된 핵산 분자는 전형적으로 발현 제어 서열(예를 들어, 프로모터)에 작동 가능하게 연결된다.
- [0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 관심 단백질 또는 폴리펩타이드의 발현을 위해 뉴클레오타이드 서열을 지니는 작제물 또는 벡터를 도입함으로써 유전자 변형을 하도록 표적화된 세포 또는 미생물을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 발현될 단백질이 CAR을 포함할 때, 숙주 세포는 보통 T 세포이다.
- [0086] 용어 "낮은 면역원성", "낮은 면역원성의", "저면역원성의", "저면역성" 또는 "저면역"은 세포가 이식되는 대상체에 의한 면역 거부 경향이 적은 세포를 기재하기 위해 상호 호환적으로 사용된다. 예를 들어, 비변형 또는 비변형 야생형 세포에 대해, 이러한 낮은 면역원성의 세포는, 이러한 세포가 이식되는 대상체에 의한 면역 거부 경향이 약 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상 더 적을 수 있다. 본 명세서에 기재된 일부 예에서, 게놈 편집 기술은 MHC I 및 MHC II 유전자의 발현을 조절하고, 그에 따라 낮은 면역원성 세포를 생성하기 위해 사용된다. 본 명세서에 기재된 다른 예에서, 관용원성 인자는 세포에 도입되고, 발현될 때 숙주 면역계에 의해 인식될 세포의 능력을 조절하거나 영향을 미칠 수 있고, 따라서, 낮은 면역원성을 부여한다. 세포의 저면역원성은 적응 및 선천성 면역 반응을 유발하는 세포의 능력을 평가함으로써 결정

될 수 있다. 이러한 면역 반응은, 예를 들어, T 세포 증식, T 세포 활성화, T 세포 사멸, NK 세포 증식, NK 세포 활성화 및 대식세포 활성화에 대한 낮은 면역원성의 효과를 측정함으로써, 당업자에 의해 인식되는 분석을 이용하여 측정될 수 있다. 낮은 면역원성 세포는 대상체에 투여 시 T 세포 및/또는 NK 세포에 의해 감소된 사멸을 겪을 수 있거나, 비변형 또는 야생형 세포에 비해 감소된 대식세포 포식(engulfment)을 나타낸다. 일부 경우에, 낮은 면역원성의 세포는 대응하는 비변형 야생형 세포에 비해 수용자 대상체에서 감소된 또는 줄어든 면역 반응을 유발한다. 일부 경우에, 낮은 면역원성의 세포는 비면역원성이거나 수용자 대상체에서 면역 반응을 유발하지 못한다. 낮은 면역원성 세포, 이를 생산하는 방법 및 이를 이용하는 방법의 상세한 설명은 2015년 5월 9일자로 출원된 W02016183041; 2018년 1월 14일자로 출원된 W02018132783; 2018년 3월 20일자로 출원된 W02018176390; 2019년 7월 17일자로 출원된 W02020018615; 2019년 7월 17일자로 출원된 W02020018620; 2020년 7월 31일자로 출원된 W02021022223; 2020년 7월 31일자로 출원된 W02021022223; 2020년 8월 24일자로 출원된 W02021041316; 2021년, 2020년 4월 27일자로 출원된 W02021222285; 및 2021년 4월 27일자로 출원된 W02021222285에서 찾을 수 있으며, 실시예, 서열목록 및 도면을 포함하는 개시내용은 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0087] "세포내 신호전달 도메인" 또는 "효과기 도메인"은 적절한 신호를 수신할 때 세포에서 생물학적 또는 생리학적 반응을 직접 또는 간접적으로 촉진시킬 수 있는 CAR 또는 수용체의 세포내 부분 또는 도메인이다. 특정 실시형태에서, 효과기 도메인은 표적 또는 동족 분자에 결합할 때, 또는 단백질 또는 이의 일부 또는 단백질 복합체가 표적 또는 동족 분자에 직접 결합되고 효과기 도메인으로부터의 신호를 촉발시킬 때 신호를 수신하는 단백질 또는 이의 일부 또는 단백질 복합체로부터 유래된다.

[0088] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 천연 소단위(예를 들어, 퓨린 또는 피리미딘 염기)를 포함하는 공유 결합된 뉴클레오타이드를 포함하는 중합체 화합물을 지칭한다. 퓨린 염기는 아데닌 및 구아닌을 포함하고, 피리미딘 염기는 유라실, 티민 및 사이토신을 포함한다. 핵산 분자는 폴리리보핵산(RNA) 및 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하는 폴리데옥시리보핵산(DNA)을 포함하며, 이 중 하나는 단일- 또는 이중-가닥일 수 있다. 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자는 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0089] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 단일 핵산 단편 상에서의 2개 이상의 핵산 분자가 회합되어 하나의 기능이 다른 하나에 의해 영향받는 것을 지칭한다.

[0090] 용어 "환자"는 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포에 의한 예방 치료를 포함하는 치료가 제공되는 동물, 예를 들어, 인간을 지칭한다. 해당 감염, 인간 환자와 같은 특정 동물에 특이적인 병태 또는 질환의 치료를 위해, 환자라는 용어는 해당되는 특정 동물을 지칭한다. 용어 "환자"는 또한 포유류, 파충류, 양서류 및 어류를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 척추동물을 포괄한다. 그러나, 유리하게는, 환자는 인간과 같은 포유류, 또는 다른 포유류, 예컨대, 길들인 포유류, 예를 들어, 개, 고양이, 말 등 또는 생산 포유류, 예를 들어, 소, 양, 돼지 등이다.

[0091] 용어 "안전 항만" 또는 "안전 항만 좌위"는 이식유전자 또는 외인성 유전자의 안전한 발현을 가능하게 하는 유전자 좌위를 지칭한다. 이식유전자 또는 외인성 유전자는, 예를 들어, 안전 항만 좌위에서 인트론, 엑손 또는 암호화 서열 영역(CDS)을 포함하는 유전자의 안전한 발현을 가능하게 하는 안전 항만 좌위의 임의의 적합한 영역에 삽입될 수 있다.

[0092] 본 명세서에 사용되는 용어 "안전 스위치"는 하향조절 또는 상향조절될 때, 예를 들어, 숙주의 면역계에 의한 인식을 통해, 세포의 제거 또는 사멸을 야기하는 관심의 유전자 또는 단백질의 발현을 제어하기 위한 시스템을 지칭한다. 안전 스위치는 유해 임상 사건의 경우에 외인성 분자에 의해 촉발되도록 설계될 수 있다. 안전 스위치는 DNA, RNA 및 단백질 수준에 대해 발현을 조절함으로써 조작될 수 있다. 안전 스위치는 이상사례에 반응하여 세포 활성의 제어를 가능하게 하는 단백질 또는 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 비활성 상태로 발현되고 선택적인, 외부에서 제공되는 제제에 의해 스위치의 활성화 시 안전 스위치를 발현시키는 세포에 치명적인 '사멸 스위치'이다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치 유전자는 작체물에서 관심 유전자에 관해 시스-작용성이다. 안전 스위치의 활성화는 세포가 세포자멸사 또는 괴사를 통해 자기만을 또는 자기와 이웃하는 세포를 사멸시키게 한다.

[0093] 용어 "대상체"는 포유류 대상체, 바람직하게는 인간을 지칭한다. "~를 필요로 하는 대상체"는 질환으로 진단되거나, 질환이 발행할 상승된 위험에 있는 대상체를 지칭할 수 있다. 어구 "대상체" 및 "환자"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다.

[0094] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "치료적 유효량"은 질환을 치료하기 위해 대상체에서 목적하는 효과를 생산하는

양이다. 특정 실시형태에서, 치료적 유효량은 최대 치료 효과를 수득하는 양이다. 다른 실시형태에서, 치료적 유효량은 최대 치료 효과 미만인 치료 효과를 수득한다. 예를 들어, 치료적 유효량은 최대 치료 효과를 수득하는 투약량과 관련된 1가지 이상의 부작용을 피하면서 치료 효과를 생산하는 양일 수 있다. 특정 조성물에 대한 치료적 유효량은 치료 조성물의 특징(예를 들어, 활성, 약물동력학, 약력학 및 생체이용률), 대상체의 생리적 조건(예를 들어, 연령, 체중, 성별, 질환 유형 및 병기, 의학적 병력, 일반적 신체 조건, 주어진 투약량에 대한 반응 및 기타 존재하는 의약), 조성물 중 임의의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 보존제의 특성, 및 투여 경로를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 인자에 기반하여 다를 것이다. 임상 및 약학 분야의 당업자는 일상적 실험을 통해, 즉, 숙주 세포, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물 투여에 대한 대상체의 반응을 모니터링하고, 그에 따라 투약량을 조절함으로써, 치료적 유효량을 결정할 것이다. 추가적인 가이드를 위해, 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, London, 2012, 및 Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Edition, McGraw-Hill, New York, NY, 2011]을 참조하며, 이들의 전체 개시내용은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0095] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "관용원성 인자"는 저면역 인자, 보체 저해제, 및 투여, 이식 또는 생식 시 숙주 또는 수용자 대상체의 면역계에 의해 인식될 세포의 능력을 조절하거나 영향을 미치는 다른 인자를 포함한다.

[0096] "막관통 영역"은 세포막에 삽입하거나 걸쳐있을 수 있는 막관통 단백질의 일부이다.

[0097] 암과 관련하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 암을 부분적 또는 전체적으로 완화시키는 것; 암을 예방하는 것; 암의 발생 또는 재발 가능성을 감소시키는 것; 암의 진행 또는 발생을 늦추는 것; 암과 연관된 하나 이상의 증상의 발생을 제거, 감소 또는 늦추는 것; 또는 암의 무진행 또는 전체 생존을 증가시키는 것을 지칭한다. 예를 들어, "치료하는"은 존재하는 암이 더 크게 성장하는 것을 방지하거나 늦추는 것; 암의 형성 또는 전이를 예방하거나 늦추는 것; 및/또는 암의 특정 증상의 발생을 늦추는 것을 지칭할 수 있다. 일부 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 치료와 함께 투여되는 일 없이 대상체와 비교할 때 대상체의 암세포 수 또는 크기가 감소된 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 암의 한 가지 이상의 증상이 이러한 치료를 받지 않은 대상체와 비교할 때 본 명세서에 개시되고 기재된 바와 같은 치료를 받고 있는 대상체에서 완화된다는 것을 의미한다.

[0098] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항원 결합에 관련된 항체 중쇄 또는 경쇄의 일부를 지칭한다. 항체 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 도메인은 각각 4개의 일반적으로 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 일반적으로 포함한다. CDR이 프레임워크 영역 사이에 위치되도록 프레임워크 영역은 CDR을 분리시킨다.

[0099] "벡터"는 적합한 숙주에서 핵산 분자의 발현을 달성할 수 있는 적합한 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 핵산 분자를 함유하는 DNA 작제물을 지칭한다. 이러한 제어 서열은 전사를 달성하는 프로모터, 이러한 전사를 제어하는 선택적 작동자 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 암호화하는 서열 및 전사 및 번역의 종결을 제어하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 바이러스 또는 단순히 잠재적 게놈 삽입일 수 있다. 일단 적합한 숙주에 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 독립적으로 복제 및 기능할 수 있거나, 또는 일부 예에서, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[0100] 다시스트론성 벡터 및 이의 조성물

[0101] 일부 양상에서, 본 기술은 숙주 세포에서 관심의 둘 이상의 단백질의 공동 발현을 위해 둘 이상의 발현 카세트를 포함하는 다시스트론성 벡터를 제공한다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 2개의 발현 카세트를 포함하고, 즉, 이시스트론성이다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 3개의 발현 카세트를 포함하고, 즉, 삼시스트론성이다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 4개의 발현 카세트를 포함하고, 즉, 사시스트론성이다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 4개 초과 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이들 실시형태에서, 발현 카세트의 각각은 관심 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 발현 중인 둘 이상의 유전자는 단일 프로모터의 제어 하에 있으며, 하나의 전사체로부터 관심 단백질의 공동 발현을 달성하기 위해 하나 이상 절단 부위에 의해 서로로부터 분리된다. 다른 실시형태에서, 둘 이상의 유전자는 별개의 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.

[0102] 관용원성 인자

- [0103] 특정 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 각각 포함하는 1개 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 하나 이상의 발현 카세트에 의해 발현되는 관용원성 인자는 동일 또는 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, 보체 수용체(CR1), DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121, Mfge8, 및 상기 중 어느 것의 절단, 변형 또는 융합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다시스트론성 벡터가 2개 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 2개 이상의 발현 카세트를 포함하는 실시형태에서, 2개 이상의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD200, CCL22, CTLA4-Ig, C1 저해제, 보체 수용체(CR1), DUX4, FASL, H2-M3, IDO1, IL15-RF, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IL-10, IL-35, MANF, PD-1, PD-L1, Serpinb9, CC121, Mfge8, 상기 중 어느 것의 절단, 변형 또는 융합으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0104] 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 CD47이다. CD47은 백혈구 표면 항원이고, 세포 접착 및 인테그린의 조절에서 어떤 역할을 한다. 이는 세포(예를 들어, T 세포) 표면 상에서 발현되고, 세포를 식균하지 않는 순환 대식세포에 대한 신호를 전달한다. 따라서 CD47의 과발현은 접합될 때 세포의 면역원성을 감소시키고, 동종이계 수용자에서 면역보호를 개선시킬 수 있다. CD47은, 인간에서, CD47 유전자에 의해 암호화된 막관통 단백질이다. 이는 면역글로불린(Ig) 슈퍼패밀리의 구성원이다. CD47은 분자량이 대략 50kDa이다. 이는 글리코실화되고, 인간 신체에서 사실상 모든 세포에 의해 편재하여 발현된다. 이는 이의 N-말단에 단일 IgV-유사 도메인, 5개의 막에 걸쳐 있는 세그먼트가 있는 매우 소수성인 긴장부 및 C-말단에 교대로 스플라이싱된 세포질 꼬리를 갖는다. 또한, 이는 2개의 세포의 영역 및 이웃하는 막에 걸쳐 있는 세그먼트 사이의 2개의 세포내 영역을 갖는다. 신호 펩타이드는, CD47 아이소폼 상에 존재할 때, IgV-유사 도메인의 N-말단에 위치된다.
- [0105] CD47은 세포자멸사, 증식, 접착 및 이동을 포함하는 다양한 세포 과정에 관련된다. CD47은 다중 세포의 리간드, 예컨대, TSP-1, 인테그린, 기타 CD47 단백질 및 SIRP α 와 상호작용한다. CD47/SIRP α 상호작용은 다수의 신체 시스템, 예컨대, 림프구 항상성, 수지상 세포(DC) 성숙 및 활성화, 2차 림프구 기관에서의 특정 DC 소집단의 적절한 국재화 및 세포 이행(transmigration)을 조절하는 면역계에서의 세포내 상호작용 규모를 조절한다. 이식 또는 세포 요법 적용과 관련하여 공여자 세포 상을 비롯한 세포 상에서의 CD47은 "자기 마커"로서 작용할 수 있고, 저해성의 "나를 죽이지 말라"는 신호를 전달하기 위해 순환 면역 세포 표면 상의 SIRP α 에 결합함으로써 식세포작용을 조절한다. CD47-SIRP α 결합은 SIRP α 상에서의 면역수용체 타이로신-기반 저해 모티프(ITIM)의 인산화를 초래하는데, 이는 SHP1 및 SHP2 Src 상동성 포스파타제의 보충(recruitment)을 촉발시킨다. 이러한 포스파타제는 차례로 식세포 시냅스에서 마이오신 II의 축적을 저해하여, 식세포작용을 방지한다(Fujioka et al., Mol. Cell. Biol., 16:6887-6899 (1996)). 대식세포에 의한 표적 세포의 식세포작용은 활성화 신호(예를 들어, Fc γ R, CRT, LRP-1)와 저해 신호(예를 들어, SIRP α -CD47)의 균형에 의해 조절된다. CD47의 상승된 발현은 세포가 면역감시, 후속 파괴 및 선천성 면역 세포 사멸을 회피하게 할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 다른 정상 면역 반응의 병리학적 또는 바람직하지 않은 활성화가 있을 때, CD47은 면역관용을 유도하기 위해 관용원성 인자로서 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어, 환자가 동종이계 이식 또는 동종이계 세포 요법을 받은 후에 공여자 항원에 대해 면역 반응이 발생할 때, 또는 신체가 자가면역질환에 관련된 자기-항원에 부적절하게 반응할 때, 일어날 수 있다.
- [0106] 인간 CD47 유전자는 6개의 천연 발생 전사체를 갖고, 이 중 5개는 각각 CD47(Ensembl, 유전자: CD47, ENSG00000196776)의 단백질 아이소폼을 암호화한다. 6개의 전사체는 CD47-201, CD47-202, CD47-203, CD47-204, CD47-205 및 CD47-206으로 명명된다. 6개의 전사체의 암호화 DNA 서열(CDS)은 각각 서열번호 129 내지 134에 제시된 바와 같다. 5개의 단백질 아이소폼의 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 내지 5에 제시된 바와 같다(표 1 참조).
- [0107] 전사체 CD47-201(서열번호 129)은 305개의 아미노산을 갖는 아이소폼 CD47-201(서열번호 1)을 암호화한다. 아이소폼 CD47-201은 아이소폼 CD47-202로부터의 18개의 아미노산의 C-말단의 절단을 갖는다. CD47-201 전사체의 모든 스플라이스 접합은 적어도 1개의 비-의심(non-suspect) mRNA에 의해 뒷받침된다.
- [0108] 전사체 CD47-202(서열번호 130)은 323개의 아미노산을 갖는 아이소폼 CD47-202(서열번호 2)를 암호화한다. CD47-202는 인간 CD47 유전자의 가장 긴 전사체이다. 이는 Ensembl 데이터베이스에서 대표적인 전사체로 표기된다. 대표적인 전사체를 확인함에 있어서, Ensembl은 모든 것을 감안할 때 가장 큰 적용범위의 보존된 엑손, 가장 큰 발현, 가장 긴 암호화 서열을 갖고 NCBI 및 UniProt와 같은 다른 중요한 리소스에서 나타나는 전사체를 확인하는 것을 목적으로 한다. CD47-202 전사체의 모든 스플라이스 접합은 적어도 1개의 비-의심 mRNA에 의해

뒷받침된다. 아미노산 1 내지 18은 신호 펩타이드이다.

- [0109] 전사체 CD47-203(서열번호 131)은 86개의 아미노산을 갖는 아이소폼 CD47-203(서열번호 3)을 암호화한다. 전사체 모델에 대한 유일한 지지체는 단일 발현 서열 태그(EST)로부터 유래된다.
- [0110] 전사체 CD47-204(서열번호 132)는 단백질을 암호화하지 않는다. 이 전사체의 모든 스플라이스 접합은 적어도 1개의 비-의심 mRNA에 의해 뒷받침된다.
- [0111] 전사체 CD47-205(서열번호 133)은 109개의 아미노산을 갖는 아이소폼 CD47-205(서열번호 4)를 암호화한다. 아이소폼 205는 아이소폼 CD47-202로부터의 절단된 3개의 막관통 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다. 전사체 모델을 위한 가장 뒷받침하는 mRNA는 의심되는 것으로 표시되거나, 지지체는 다중 EST로부터 유래된다.
- [0112] 전사체 CD47-206(서열번호 134)은 183개의 아미노산을 갖는 아이소폼 CD47-206(서열번호 5)을 암호화한다. 아이소폼 206은 아이소폼 CD47-202로부터 유래된 절단된 세포외 도메인 및 5개의 막관통 도메인을 포함한다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47은 인간 CD47이고, 일부 실시형태에서, 인간 CD47은 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다). 일부 실시형태에서, 인간 CD47은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어지거나, 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다). 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 인간 CD47의 mRNA 서열에 상응한다. 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 129 내지 134 중 어느 하나에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다). 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 130에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다).
- [0114] 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 포유류 세포, 예를 들어, 인간 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 실시형태에서, 코돈-최적화된 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 135에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다).

표 1

CD47 의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
1	MWPLVAALLLSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGETIIEELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFA ILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIV GAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAI GLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISG LSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN	CD47-201 아미노산 서열
2	MWPLVAALLLSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTV VIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGALNK STVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGETIIEELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFA ILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIV GAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAI GLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISG LSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNA FKESKGMNDE	CD47-202 아미노산 서열
3	XWTESLYCGVYTNAWPSSDFRFEYLSSSTITWTSLEY ICGVQRDTYSQLKGKKRQASNQKTIQPPRKAVEEPLN AFKESKGMNDE	CD47-203 아미노산 서열
4	XKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAI GLTSFVIAILVIQ VIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGL VYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNE	CD47-205 아미노산 서열
5	MEAQNTTEVYVKWKFGRDIYTFDGALNKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELT REGETIIEELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQF GIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPG EYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVF	CD47-206 아미노산 서열
129	atgtggcccctggtagcggcgctgttctgggctcggcgctgcggatcag ctcagctactatttaataaaacaaaatctgtagaattcacgtttgtaatgaca ctgtcgtcattccatgctttgttactaatatggaggcacaaaacactactgaag tatacgtaaagtggaaatttaaggaagagatatattacaccttgatggagct ctaaacaagtccactgtccccactgacttttagtagtgcaaaaatgaagtctc acaattactaaaaggagatgcctcttgaagatggataagagtgtgctgtct cacacacaggaaactacactgtgaagtaacagaattaaccagagaagg tgaaacgatcatcgagctaaaatatcggtgtttcatggtttctccaaatgaa aatattctattgttatttccaaattttgtatactcctgtctggggacagttggt attaaaacacttaaatatagatccggtggtatggatgagaaaacaattgctt actgttgcggactagtgatcactgtcattgtcattgtggagccattctttcgtc ccaggatgaattcattaaagaatgctactggccttggttaattgtgactcta	CD47-201 CDS 뉴클레오타 이드 서열

[0115]

	cagggatattaataattacttactactatgtgttagtacagcgattggattaac ctccttcgtcattgccatattggttattcagggtatagcctatatcctcgtgtggt tggactgagtcctgtattgcggtgtataccaatgcattgcccctcttctgattt caggtttgagtatcttagctctagcacaattacttgactagtattatgaaattt gtggctccaatcagaagactatacaacctcctaggaataactga	
130	atgtggccctggtagcggcgctgtgtcgggctcggcgctgctgaggatcag ctcagctactatttaataaaacaaaatctgtagaattcacgttttgaatgaca ctgtcgtcattccatgctttgttactaatatggaggcacaacactactgaag tatacgtaaagtggaaatttaagggaagagatattacaccttgatggagct ctaaacaagtccactgtccccactgacttagtagtgcaaaaattgaagtctc acaattactaaaaggagatgctcctttgaagatggataagagtgtgctgtct cacacacaggaaactacactgtgaagtaacagaattaaccagagaagg tgaacgatcatcgagctaaaatatcgtgtgtttcatggttttctcaaatgaa aatattcttattgtttttcccaattttgtatactcctgttctggggacagttggt attaaacacttaaatatagatccggtggtatggatgagaaaacaattgcttt actgtgtgctgactagtgtcattgtcattgttgagccattctttcgtc ccagggtgaatatcattaaagaatgctactggccttggttaattgtgacttcta cagggatattaataattacttactactatgtgttagtacagcgattggattaac ctccttcgtcattgccatattggttattcagggtatagcctatatcctcgtgtggt tggactgagtcctgtattgcggtgtataccaatgcattgcccctcttctgattt caggtttgagtatcttagctctagcacaattacttgactagtattatgaaattt gtggctccaatcagaagactatacaacctcctaggaagctgttagaggaa cccctaattgcattcaagaatcaaagggaatgatgaatgatgaataa	CD47-202 CDS 뉴클레오타 이드 서열
131	tggactgagtcctgtattgcggtgtataccaatgcattgcccctcttctgattt caggtttgagtatcttagctctagcacaattacttgactagtattatgaaattt gtgggttcagagggacacctacagtcagtgaaaggcaagaagagaca agcttccaatcagaagactatacaacctcctaggaagctgttagaggaaac ccctaattgcattcaagaatcaaaagggaatgatgaatgatgaataa	CD47-203 CDS 뉴클레오타 이드 서열
132	agatattttctgttcaatttaaggagaggtaaatttggtatcaatagaaaaat gtttctgaaaaatttaaaccttgaaatgtattatggcatggagtcagatgttt caggagagagaagaacaaatcaagaagcattgcaagtatgctcatatgga atgcttaaggcttgggttaaaaaatatatatatggctgtcaatgtcttaggct catggttagcagcagaaatcgaataattctttgtcacatgggttatccatat tggagagaatttaactcagggtgaatttaactgtacactgtttggtttataatatt tagagggatcacaaactgactgatgtcccttgaagtaccattctcataaatctt tttttcagaatgggccagccaactgtgacatccctggatcgagatttaga actagaaagtattcttctacattattaggaagaaaaggagttactggcggt tagcaatatctattttgtttgttttagagacagggctcattatgttgacca ggctggcctcgagctcctgggtcaagcaatgctcccactcagcctcca agtagctgggactacaggcatgtgccaactacacctggcagtttattctgat aaatacatttatgagctcaaaaatgtaactctaaaacctatctctgaactcc atataccatcagaaatttagatagttgttagttctcttttctttagaacaatag atataaggcatggttcattgaagtcagttgtatatacatgtaactatcctgatgt tcccaataaagctctgtatttctgcttagttattgggagggtgctaaatgta gtgcatccaacccattttaccctgttctactttaaagagggtggcttctgttt ggatacaaggaccaagtcactccccagggtcctccacagtaaggagggc ctatttaaagccgcccactaacagaaactggactcctatgagctca gatacataactgggctcacaggggtgggacagtagtagtctaggaattg	CD47-204 CDS 뉴클레오타 이드 서열

[0116]

	gaaggatccattccatatcaaagaactgaagcatcgtgtgccctctcagca gcaagagtaaggtagtgcctctcagttatagttcctgagttcctctgtcttg attcttgcctattagccagctagctcaccctctgtttatgccactgtttttatcct attcatgcctctcacagacaactttttacctacagcttggactcatcctgtc tcctttctgtttcttttcactttccctcccatcaccaactttctgggtttttctgtttct tcttagagtcagtgccagggagaaaactgtcagtcagtcgtgtgccattttc ctgttgagaaagactcaccagcttttggctggctcacagattggcttccctgg gtcaggaccaccctttccctgccagcttgaagcttgacagaattcgagt gtgcagtggtgtgtaataaataaggaacacagagcagtcctggaggc gtgctccatctgctgatgagaaaatccagtgctgcatccagcccagggtcc cagcgggaatggcctctctgttcagtaggattccccctctgctgagtggttcat ggcatgttctgttcaacgctttccatctgtaggattcttattctgtattttgtttt ttgggtttttttttgagatggagtcctctgtcgtcccagggtggagtgca gtggcagcaccagctcgtgcagcctctgcctcccaggacgagggag atctcccactcagcctccacgtagctgggactacaggcatgcaccaca ggcatgcaccaccagccagctaattttgtattttgtagagacagggttgc atcatgttcccaggctggtctgaatgctgagctcaagcaatctattgcctt ggcctcccaaagtgtgtggattacaggcatgagccaccacggccagcctt ctcattgtttttataaggaagctatcttctccctcccaactagggtattct tttcccttctgtcacttgcctcatgtactgtattcctcaactcataatgaatccat ttggaagcagtgaaaaaggcaactcagaaaagctaagaagaaatagata gaggaatactcagagctatctgagttttcttagttttagcttcttgagctt gaaactggaaagaccaggagtgatgtggagaaagagactgagctgt aagacacaggagcagtgagctaaggagatggagtagtggggacaaat tctggcacattctgtctacactctggtagatagaggaggaggtggagc acccatggtgggggtatgttggtgacagcatttccaccagccagtgtaac aagtggctgattgggggaaagatggcataaacaatgagagaatgtgtt actattgtatgtagatgggttattgtctcattttcaaatcagtgatataatcaag aatattcagcatgtttgaatagactgtcagagctggaactcttccattaacatct ctggcacctttagttttagccctgaacattttatctaaaaatcaacattacaaa tgcttagtttatttcatattataaattatcttattttatttatatcagctccaat cagaagactatacaacctcctaggaataactgaagtgaagtgtgactcc gatttgagagtagtaagacgtgaaaggaatacactgtgtttaagcccat ggcctgtagtattcactgttggggagaaagaaagaaaagtaactggtgt cacctatgagaccctacgtgattgttagttaagtttttcaagcagctgta atttagtaataaaaataattatgatctatgtgttggccaattgagatccagttttt gtgttatttttaataattaggggcaatagtagaatggacaattccaagaat gatgccttcaggctcctagggcctctggcctctaggttaaccagtttaattggtt caggggtgataactacttagcactgcccgtgtgattaccagagatattatga aaaccagtggtcctcatcaaacctttgccaactcaggttcacagcagcttgg gcagttatggcagtagtgcatctagctgagaggtgtctgccactctgggtcaa tggaataataaaatgaagacaggcagggaattgttgggagcatctgtatga tctccgtatgatgtatattgatggagatagtggtcctcattctgggggtgcc attcccacattccccctcaacaacagtgtaacaggtcctccagatttag ggtagttttatgttgatattgtttcttttattcacataacccctgaaacccgt ctgtcctcctgttactgtctgtgtacaagatgtacaccttttctcctcttga acatggtctagtacacggtagcaccagtgtaggaaggagccagactgt tctcagagcactgtgtcacactttcagcaaaaatagctatggtgttaacatat gtattccctcctctgattgaaggcaaaaatctacagtggttctcactctttct	
--	---	--

[0117]

gatctggggcatgaaaaagcaagattgaaattgaactatgagtcctgc atggcaacaaaatgtgtgcaccatcaggccaacaggccagccctgaat ggggatttattactgtgtatctatgttgcatgataaacattcatcaccttccct gtagtcctgctctactcccctcccctatgattgaaaagtaacaaaacc acatttctatctgttagaagaaaattaatgtctgacagtgtgatcgctg gagtacttttagacttttagcattcgtttttacctgtttggatgtgtgtgtg catacgtatgagataggcacatgcatcttctgtatggacaaagggtgggtac ctacaggagagcaaaggtaatttgtgcttttagtaaaaaacattaaatacaa agtcttattgggtggaattatattgatgcaaatattgatcactaaaaacttta aaactttaggtaatttgccacgcttttgactgctaccaataccctgtaaaa atacgtaatcttctgtttgtgtaataagataattcataattgtagtgcattaataat agtatttcttagtccatcagatgtcccggtgctctttatgccaaattgattgt catatttcatgttggaccaagtagttgcccattggcaaacctaaattatgac ctgctgaggcctctcagaaaactgagcatactagcaagacagctcttctga aaaaaaaaatatgtatacacaataatatacgtatatctatatatacgtatgtat atacacacatgtatatttcttctgtattgtgtagctgccaataataacatat atagagggagctgtattcctttatacaaatctgatggctcctgcagcacttttc cttctgaaaataattacatttgcctaacctagttgttactttaaaaatcagtttgat gaaaggagggaagcagatggactgaaaaagatccaagctcctatta gaaaggatgaaaatctttagtaaaaattttataaaactaaagggtgacctt taatatgtagtaaaactctcatttattgggtgctcttggatctcatccatccatt gtgtctcttaaatgctgctgcttggaggcattcactgcccagacaatgcc ccagagatagtggggaaatgccagatgaaaccaactctgctcactag ttgctagcttctggaatgaccacagaagcaggagctcctgctggtggg catcattgggagcttcttcttaaatcagattgtaattggctccaaattcc atcacatcacatttaaatgacagacagtgtttgcacatcatgtatctgttcc cataatatgcttttactcctgatccagtttctgctgtgactctccattcagttt atttattgtgtgtctcacagtgacaccattgtcctttctgcaacaaccttcca gctactttggccaaattctattgtcttctcctcaaaacattctccttgacgttct cttcatctgtgtagctgcttcttcttaactaccattcctatagtactttatgc atctctgctagtctattagttttggcctgctctccttgattttaaattccttc tatagctagagcttttcttcttcttctcctgcagtgtttgcatacatcag aagctaggtacataagtaaatgattgagagtggctgtatttagattatcact tttaaatagggtgagctgagagtcttcttctgttttttttttttttttttt tttttttttttgactaatttcacatgctcaaaaacctcaagggtgattatttctc ctggaactccagggtccattctgttaaatccctaagaatgacagaattaaaat aacagggtatcccgttaattgaaatatttctttttcaggatgctatagtcaatt tagtaagtgaccaccaaattgtatttgcactaacaagctcaaaacacgat aagtttactcctcatctcagtaataaaaattagctgtaataacacctctaggt ttcttctgtctaaaatgggtattcaaaaatggggatctgtgtgtatgtatgga aacacatactccttaattacctgtgttggaactggagaaatgattgtcggg caaccgtttattttattgtattttattgttgagggtttttataaacagtttact tgtgtcatattttaaaattactaactgccatcacctgctgggtccttgttaggtc attttagtgactaatagggaataatccaggtaacttgaagagatgagcagtg agtgaccaggcagttttctgcttttagctttgacagttcttaattaagatcattg aagaccagcttctcataaattctcttttgaaaaaagaaagcattgtacta agctcctctgtaagacaacatcttaaatctaaaagtgtgtatcatgactggt gagagaagaaaacattttgttttataaatggagcattattacaaaagcc attgtgagaattagatcccacatcgtataaatatctattaaccattctaaataa	
--	--

[0118]

	agagaactccagtgtgctatgtgcaagatcctctctggagcttttgcatag caattaaagggtgtgctattgtcagtagccatttttgcagtgattgaagacca aagtggttttacagctgtgtaccgttaaagggttttttatatgtattaatcaat ttatcactgtttaaagccttgaatatctgcaatcttggcaaggtagctttttattaa aaaaaacataacttgaatatattaccctgtaattattatatacttaataaaa catttaagctat	
133	aagaatgctactggcctgggttaattgtgacttctacagggatattaattact tcactactatgtgttagtacagcgattggattaacctcctcgtcattgccatatt ggttattcaggtgatagcctatatacctcgtgtgttgactgagctctgtattg cggcgtgtataccaatgcacggccctctctgatttcaggttgagtatcttagct ctagcacaattactggactagttatatgaaattgtggctccaatcagaag actatacaacctcctaggaagctgtagagggaacccctaatgaataa	CD47-205 CDS 뉴클레오타 이드 서열
134	atggaggcacaacacactactgaagtatacgtaaagtggaaatttaaagg aagagatatattacaccttgatggagctctaaacaagtccactgtcccactg acttagtagtgcaaaaattgaagctcacaattactaaaaggagatgcctct ttgaagatggataagagtgatgtgtctcacacacaggaaactacactgtg aagtaacagaaattaaccagagaagggtgaaacgatcatcgactaaatat cgtgtgtttcatggttttctcaaatgaaaattcttattgttatttcccaattttg ctatactcctgttctggggacagtttggtattaaacactaaatatagatccg gtggtatggatgagaaaacaattgcttactgtgtgactagtgatcactgt cattgtcattgttgagccattctttctgccagtgaaattcattaaagaatg ctactggcctgtgttaattgtgacttctacagggatattaattacttactact atgtgttt	CD47-206 CDS 뉴클레오타 이드 서열
135	atgtggccctgtgctgcgcgcctgtgtgctgggctcggcatgctgcggatcag ctcagctactgtttaaaaaacaaaatctgtagaattcacgtttgtaacgaca ctgtcgtgatccatgctttgtactaatatggaggcacaacaccactgaa gtgtactgtgaagtggaaattcaaaggcagagacattacacctttgacggc gcccacaacaagtcaccgtgcccactgacttagtagcgcaaaaattgag gtcagccaattactaaaaggagatgcctctttgaagatggacaagagcgat gctgtcagccacacaggggaactacactgtgaagtaacagagtaacccg cgaagggtgaaacgatcatcgagctgaagatcagtggtgtcctgtgtttctc cgaacgagaataatccttatcgtaatttcccaatttctgctatcctcctgttctg ggcagtttggtatcaagacactcaaatatcggtccggtggatggatgag aagacaattgccctgtgtgtgctgactcgtgatcaccgtcatcgtagtttg gggccatcctttctgcccaggggagtacagcctgaagaatgctacgggcc tggttaattgtgacctctacagggatactatcctgcttactactatgtttc agtaccgcatggtgactgacctcctcgtcattgccatattggtgattcagggtg atagcctacatcctcgcgtgtgtgctgagctctgtatcgcggtgcata cccatgcatggccctctctgatttcaggggtgagtatcctcgactagcacag ttgctgggactggttatatgaaattgtggcctccaaccagaagactataca gcctcctaggaaggctgtagaggagccctgaatgcattcaaggaatcaa aaggcatgatgaatgatgaa	CD47 을 암호화하는 코돈- 최적화된 뉴클레오타 이드 서열

[0119]

[0120]

CAR

[0121]

특정 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CAR를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 각각 포함하는 1개 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. CAR(키메라 면역수용체, 키메라 T 세포 수용체, 또는 인공 T 세포 수용체로도 알려짐)은 특정 단백질을 표적화하는 새로운 능력을 제공하기 위해 숙주 세포(예를 들어, T 세포)에 대해 조작된 수용체 단백질이다. 수용체는 항원-결합과 T 세포 활성화 작용을 둘 다 단일 수용체에 조합하기 때문에 키메라이다. 본 기술의 다시스트론성 벡터는 다양한 표적 항원에 대해 세포-기반 요법에서 사용하기 위한 숙주 세포(예를 들어, T 세포)에서 하나 이상의 CAR을 발현시키는 데 사용될 수 있다. 하나 이상의 발현 카세트에 의해 발현되는 CAR은 동일 또는 상이할 수 있다. 이런 임의의 실시형태에서, CAR은 표적 항원, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인("결합제"로도 지칭됨)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, CAR은 하나 이상의 신호 펩타이드, 하나 이상의 세포외 힌지 도메인 및/또는 하나 이상의 세포내 공자극 도메인을 포함하는 하나 이상의 추가적인 구성요소를 추가로 포함할 수 있다. 도메인은 서로 바로 인접할 수 있거나, 도메인을 연결하는 하나 이상의 아미노산일 수 있다. CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 포유류 서열, 예를 들어, 마우스 서열, 영장류 서열, 인간 서열 또는 이들의 조합으로부터 유래될 수 있다. CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 비인간인 경우에, CAR의 서열은 인간화될 수 있다. CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 또한 포유류 세포, 예를 들어, 인간 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화된다. 임의의 이들 실시형태에서, CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본 명세서에 개시된 임의의 뉴클레오타이드 서열과

적어도 80% 동일(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)할 수 있다. 서열 변형은 코돈-최적화, 인간화, 제한 효소-기반 클로닝 흔적(scar), 및/또는 기능성 도메인을 연결하는 추가 아미노산 잔기 등으로 인한 것일 수 있다.

[0122]

특정 실시형태에서, CAR은 N-말단에서 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. 신호 펩타이드의 비제한적 예는 CD8 α 신호 펩타이드, IgK 신호 펩타이드, 및 과립구-대식세포 집락-자극 인자 수용체 서브유닛 알파(집락 자극 인자 2 수용체 서브유닛 알파(CSF2RA)로도 알려진 GMCSFR- α) 신호 펩타이드, 및 이들의 변이체, 아래의 표 2에 제공된 아미노산 서열을 포함한다.

표 2

신호 펩타이드의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
6	MALPVTALLPLALLHAARP	CD8 α 신호 펩타이드
7	METDTLLWVLLWVPGSTG	IgK 신호 펩타이드
8	MLLVTSLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR- α (CSF2RA) 신호 펩타이드

[0123]

[0124]

특정 실시형태에서, CAR은 결합체로도 지칭되는 세포외 결합 도메인을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 하나의 표적 항원 또는 다중 표적 항원에 특이적인 하나 이상의 항체를 포함할 수 있다. 항체는 항체 단편, 예를 들어, scFv, 또는 단일-도메인 항체 단편, 예를 들어, VHH일 수 있다. 특정 실시형태에서, scFv는 링커에 의해 연결된 항체의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함할 수 있다. V_H 및 V_L 은 V_H -링커- V_L 또는 V_L -링커- V_H 의 순서 중 하나로 연결될 수 있다. 링커의 비제한적 예는 Whitlow 링커, $(G_4S)_n$ (n 은 양의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 동일 수 있음) 링커, 및 이들의 변이체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원은 종양 세포 상에서 배타적으로 또는 우선적으로 발현된 항원 또는 자가면역 또는 염증 질환의 항원 특징일 수 있다. 예시적인 표적 항원은 B 세포 성숙 체제(BCMA), CA9, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD38, CD44, CD70, CD133, CD174, CD274, CD276, CEACAM5, CSPG4, EGFR, EGFRvIII, EPCAM, EPHA2, ERBB2, FAP, FOLH1, FOLR1, GD2, GPC3, GPNMB, IL1RAP, IL3BA, IL13RA2, Kappa, KDR, L1CAM, Lambda, MET, MS4A1, MSLN, MUC1, NCAM1, PDCD1, PSCA, ROR1, SDC1, SLAMF7, TEM1, TNFRSF8, TNFRSF17, ULBP1 ULBP2, G-단백질 결합 수용체 패밀리의 C 그룹 5 구성원 D(GPRC5D)(백혈병과 연관); CS1/SLAMF7, CD38, CD138, GPRC5D, TACI 및 BCMA(골수종과 연관); GD2, HER2, EGFR, EGFRvIII, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FR α , IL-13R α , 메소텔린, MUC1, MUC16 및 ROR1(고형 종양과 연관)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 이들 실시형태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다.

[0125]

특정 실시형태에서, CAR은 스페이스로도 지칭되는 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 용어 "힌지" 및 "스페이스"는 본 개시내용에서 상호 호환적으로 사용될 수 있다. 힌지 도메인의 비제한적 예는 CD8 α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인, IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인, 및 이들의 변이체를 포함하고, 이의 아미노산 서열은 아래의 표 3에 제공된다.

표 3

хин지 도메인의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
9	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACD	CD8 α 힌지 도메인
10	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP PLFPGPSKP	CD28 힌지 도메인
113	AAAEVYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHL CPSPLFPGPSKP	CD28 힌지 도메인
11	ESKYGPPCPPCP	IgG4 힌지 도메인
12	ESKYGPPCPSCP	IgG4 힌지 도메인
13	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인

[0126]

[0127]

특정 실시형태에서, CAR은 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타쇄, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 이들의 서열 각각의 인간 형태를 포함하는 이들의 기능적 변이체의 막관통 영역을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α , CD8 β , 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, Fc ϵ RI γ , CD16, OX40/CD134, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , TCR α , TCR β , TCR ζ , CD32, CD64, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS 및 FGFR2B, 또는 이들의 서열 각각의 인간 형태를 포함하는 이들의 기능적 변이체의 막관통 영역을 포함할 수 있다. 표 4는 몇 개의 예시적인 막관통 도메인의 아미노산 서열을 제공한다.

표 4

막관통 도메인의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
14	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8 α 막관통 도메인
15	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFW V	CD28 막관통 도메인
114	MFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIF WV	CD28 막관통 도메인

[0128]

[0129]

특정 실시형태에서, CAR은 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인은 B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, PDCD6, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB 리간드/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFSF13C, CD27/TNFSF7, CD27 리간드/TNFSF7, CD30/TNFSF8, CD30 리간드/TNFSF8, CD40/TNFSF5, CD40/TNFSF5, CD40 리간드/TNFSF5, DR3/TNFSF25, GITR/TNFSF18, GITR 리간드/TNFSF18, HVEM/TNFSF14, LIGHT/TNFSF14, 림포톡신-알파/TNF β , OX40/TNFSF4, OX40 리간드/TNFSF4, RELT/TNFSF19L, TACI/TNFSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF α , TNFRII/TNFSF1B, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, SLAM/CD150, CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1,

CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA 클래스 I, HLA-DR, Ikaros, 인테그린 알파 4/CD49d, 인테그린 알파 4 베타 1, 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, Dectin-1/CLEC7A, DPP4/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), NKG2C, CD3 ζ , 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(ITAM), CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드로부터 선택된 하나 이상의 신호전달 도메인, 및 이들의 서열 각각의 인간 형태를 포함하는 이들의 기능적 변이체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 도메인, ITAM, CD28 도메인, 4-1BB 도메인으로부터 선택된 하나 이상의 신호전달 도메인, 또는 이들의 기능적 변이체를 포함한다. 표 5는 소수의 예시적인 세포내 공자극 및/또는 신호전달 도메인의 아미노산 서열을 제공한다. 특정 실시형태에서, 아래에 기재하는 바와 같은 티사젠렉류셀의 경우와 같이, 서열번호 18의 CD3 ζ 신호전달 도메인은 14번 아미노산 위치에서 돌연변이, 예를 들어, 글루타민(Q)의 라이신(K)으로의 돌연변이를 가질 수 있다(서열번호 115 참조).

표 5

세포내 공자극 및/또는 신호전달 도메인의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
16	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB 공자극 도메인
17	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS	CD28 공자극 도메인
18	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR	CD3 ζ 신호전달 도메인
115	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR	CD3 ζ 신호전달 도메인 (14번 위치에서 Q의 K로의 돌연변이를 가짐)

[0130]

[0131]

특정 실시형태에서, 다시스트론성 벡터가 둘 이상의 CAR을 암호화하는 경우, 기재한 바와 같이 둘 이상의 CAR은 동일한 기능성 도메인 또는 하나 이상의 상이한 기능성 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 둘 이상의 CAR은 서열 유사성으로 인해 재조합 위험을 최소화하기 위해, 상이한 신호 펩타이드, 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또는 대안적으로, 둘 이상의 CAR은 동일한 기능적 도메인을 포함할 수 있다. 동일한 도메인(들) 및/또는 골격이 사용되는 경우에, 재조합 위험을 최소화하기 위해 뉴클레오타이드 서열 수준에서 코돈 발산(codon divergence)을 도입하는 것이 선택적이다.

[0132]

CD19 CAR

[0133]

일부 실시형태에서, CAR은 CD19 CAR이고, 이런 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR은 신호 펩타이드, CD19에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 일렬로 포함할 수 있다.

[0134]

일부 실시형태에서, CD19 CAR의 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 신호 펩타이드는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 IgK 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgK 신호 펩타이드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도

도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0135] 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD19, 예를 들어, 인간 CD19에 특이적이다. CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다.

[0136] 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커에 의해 연결되는 FMC63의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 FMC63 단클론성 항체(FMC63)로부터 유래된 scFv를 포함한다. FMC63 및 유래된 scFv는 문헌[Nicholson et al., Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997)] 및 PCT 출원 공개 번호 WO2018213337에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전문 내용은 본 명세서에 참조에 의해 인용된다. 일부 실시형태에서, 전체 FMC63-유래 scFv(FMC63 scFv로도 지칭됨)의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래의 표 6에 제공된다. 일부 실시형태에서, CD19-특이적 scFv는 서열번호 19, 20 또는 25에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 19, 20 또는 25에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, CD19-특이적 scFv는 서열번호 21 내지 23 및 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD19-특이적 scFv는 서열번호 21 내지 23에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD19-특이적 scFv는 서열번호 26 내지 28에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, CD19-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.

[0137] 일부 실시형태에서, scFv의 V_H 와 V_L 일부를 연결하는 링커는 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열을 갖는 Whitlow 링커이다. 일부 실시형태에서, Whitlow 링커는 상이한 링커, 예를 들어, $(G_4S)_n$ (n 은 양의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있음) 링커로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열을 갖는 상이한 FMC63-유래 scFv를 초래하는 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열을 갖는 $3xG_4S$ 링커이다. 특정 이들 실시형태에서, CD19-특이적 scFv는 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

표 6

항-CD19 scFv 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
19	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTK GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCT VSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDEAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	Whitlow 링커를 갖는 항-CD19 FMC63 scFv 전체 서열
20	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEIT	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 가변 영역
21	QDISKY	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 CDR1
22	HTS	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 CDR2

[0138]

23	QQGNTLPYT	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 CDR3
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	Whitlow 링커
25	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDEAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 가변 영역
26	GVSLPDYG	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 CDR1
27	IWGSETT	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 CDR2
28	AKHYYYGGSYAMDY	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 CDR3
29	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRA SQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTI SNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL GVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNS KSQVFLKMNSLQTDDEAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	3xG4S 링커를 갖는 항- CD19 FMC63 scFv 전체 서열
30	GGGGSGGGGSGGGGS	3xG4S 링커

[0139]

[0140]

일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, SJ25C1(Bejcek et al., Cancer Res.

55:2346-2351 (1995)), HD37(Pezutto et al., J. Immunol. 138(9):2793-2799 (1987)), 4G7(Meeker et al., Hybridoma 3:305-320 (1984)), B43(Bejcek (1995)), BLY3(Bejcek (1995)), B4(Freedman et al., 70:418-427 (1987)), B4 HB12b(Kansas & Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102(1991); Yazawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183 (2005); Herbst et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222 (2010)), BU12(Callard et al., J. Immunology, 148(10): 2983-2987 (1992)) 및 CLB-CD19(De Rie Cell. Immunol. 118:368-381(1989))를 포함하는, CD19에 특이적인 항체로부터 유래된다. 임의의 이들 실시형태에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H , V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0141] 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 힌지 도메인은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 힌지 도메인은 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지 도메인은 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0142] 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 막관통 도메인은 CD8 α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 막관통 도메인은 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0143] 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인을 포함한다. CD137로도 알려진 4-1BB는 강력한 공자극 신호를 T 세포로 전달하여, 분화를 촉진시키고 T 림프구의 장기간 생존을 향상시킨다. 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 도메인은 인간이다. 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 도메인은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 CD28 공자극 도메인을 포함한다. CD28은 T 세포 상의 다른 공자극 분자이다. 일부 실시형태에서, CD28 공자극 도메인은 인간이다. 일부 실시형태에서, CD28 공자극 도메인은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포내 공자극 도메인은 기재한 바와 같이 4-1BB 공자극 도메인 및 CD28 공자극 도메인을 포함한다.

[0144] 일부 실시형태에서, CD19 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함한다. CD3 ζ 는 T 세포 수용체(TCR)와 회합되어 신호를 생성하고 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. CD3 ζ 신호전달 도메인은 T 세포 활성화에 필수적인 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한 제타쇄의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기를 지칭한다. 일부 실시형태에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 인간이다. 일부 실시형태에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호

18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0145] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 19 또는 서열번호 29에 제시된 서열을 갖는 CD19-특이적 scFv, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD19 CAR을 포함하는, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이들 실시형태에서, CD19 CAR은 기재한 바와 같이 신호 펩타이드(예를 들어, CD8 α 신호 펩타이드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0146] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 19 또는 서열번호 29에 제시된 서열을 갖는 CD19-특이적 scFv, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 IgG4 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD19 CAR을 포함하는, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이들 실시형태에서, CD19 CAR은 기재한 바와 같이 신호 펩타이드(예를 들어, CD8 α 신호 펩타이드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0147] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 19 또는 서열번호 29에 제시된 서열을 갖는 CD19-특이적 scFv, 서열번호 10의 CD28 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 17의 CD28 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD19 CAR을 포함하는, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이들 실시형태에서, CD19 CAR은 기재한 바와 같이 신호 펩타이드(예를 들어, CD8 α 신호 펩타이드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0148] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 서열번호 116에 제시된 바와 같은 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하거나 또는 서열번호 116에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)하다(표 7 참조). 다음의 구성성분: CD8 α 신호 펩타이드, FMC63 scFv(V_L -Whitlow 링커- V_H), CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 갖는 암호화된 CD19 CAR은 서열번호 117에 제시된 대응하는 아미노산 서열을 갖거나, 또는 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다).

[0149] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD19 CAR의 상업적으로 입수 가능한 실시형태를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. T 세포에 의해 발현되고/되거나 암호화된 CD19 CAR의 상업적으로 입수 가능한 실시형태의 비제한적 예는 티사젠렉류셀, 리소캅타젠 마라류셀, 악시캅타젠 실로류셀 및 브렉수캅타진 오토류셀을 포함한다.

[0150] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 티사젠렉류셀을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 티사젠렉류셀은 다음의 구성성분: CD8 α 신호 펩타이드, FMC63 scFv(V_L -3xG₄S 링커- V_H), CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인과 함께 CD19 CAR을 포함한다. 티사젠렉류셀에서 CD19 CAR의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 표 7에 제공되며, 서열의 주석은 표 8에 제공된다.

[0151] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 리소캅타젠 마라류셀을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 리소캅타진 마라류셀은 다음의 구성성분: GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드, FMC63 scFv(V_L -Whitlow 링커- V_H), IgG4 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인과 함께 CD19 CAR을 포함한다. 리소캅타진 마라류셀에서 CD19 CAR의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 표 7에 제공되며, 서열의 주석은 표 9에 제공된다.

- [0152] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 악시캡타젠 실로류셀을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 악시캡타젠 실로류셀은 다음의 구성성분: GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드, FMC63 scFv(V_L -Whitlow 링커- V_H), CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인과 함께 CD19 CAR을 포함한다. 악시캡타젠 실로류셀에서 CD19 CAR의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 표 7에 제공되며, 서열의 주석은 표 10에 제공된다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 브렉수캡타젠 오토류셀을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 브렉수캡타젠 오토류셀은 다음의 구성성분: GMCSFR- α 신호 펩타이드, FMC63 scFv, CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인과 함께 CD19 CAR을 포함한다.
- [0154] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 바와 같은 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하거나 또는 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)하다. 암호화된 CD19 CAR은 각각 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 대응하는 아미노산 서열을 갖거나, 또는 각각 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일함).

표 7

CD19 CAR 의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
116	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttg ctgctccacgcccagggccggacatccagatgacacag actacatcctcctgctgctcctctctgggagacagagtcacc atcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaattttaaa ttggtatcagcagaaaaccagatggaaactgttaactcctga tctaccatacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagg ttcagtggcagtggtctggaacagattattctcaccatta gcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgcaa cagggttaatacgcttcctacacgttcggagggggggacc aagctggagatcacaggctccacctctggatccggcaag cccggatctggcgagggatcccaaggcgagggtgaa actgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcaca gagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacc cgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaag ggtctggagtggtgggagtaatatggggtagtgaacca catactataattcagctctcaaatccagactgacctatca aggacaactccaagagccaagttttctaaaaatgaacag tctgcaaaactgatgacacagccattactactgtgcaaac attattactacgggtgtagctatgctatggactactggggcc aaggaaacctcagtcacctctcctcaaccacgacgcccag cgccgcgaccaccaacacccggcgcccaccatcgctcg cagcccctgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcg gcggggggcgagtgacacgagggggctggacttcgc ctgtgatactcatctggcgcccttgccgggacttggtg ggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacgg ggcagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttat gagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtag ctgccgatttcagaagaagaagaaggaggatgtgaact gagagtgaagttcagcaggagcgagacgcccccgct accagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatc taggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagac gtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaag gaagaaccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcaga aagataagatggcgaggcctacagtgaattgggatga aaggcgagcgccggaggggcaaggggcagatggcct ttaccaggggtcagtagcagccaccaaggacacctacga cgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc	예시적인 CD19 CAR 뉴클레오타이드 서열
117	MALPVTALLPLALLHAARPDQMTQTTS SLASLGDRTVISCRAQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTRSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLP	예시적인 CD19 CAR 아미노산 서열

[0155]

	DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSV TVSSTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
31	atggcctaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttg ctgctccacgccgccaggccggacatccagatgacacag actacatcctccctgtctgctcctctggagacagagtcacc atcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaa ttggtatcagcagaaccagatggaactgttaactcctga tctaccatacatcaagattacactcaggagtcctcatcaagg ttcagtggcagtggtgctggaacagattattctcaccatta gcaacctggagcaagaagatattgccacttactttgcaa cagggtatacgccttcgtacacgttcggaggggggacc aagctggagatcacaggtggcggtgctcggcggtggt gggtcgggtggcgcggtatcaggtgaaactgcaggag tcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccg tcacatgactgtctcaggggtctcattaccgactatggtgt aagctggattgccagcctccacgaaagggtctggagtg gctgggagtaatatggggtagtgaaccacatactataatt cagctcctcaaatccagactgacctcatcaaggacaactc caagagccaagttttcttaaaatgaacagtcgtcaactg atgacacagccatttactactgtgccaacattattactacg gtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctc agtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcggcgacc accaacaccggcgccaccatcgctcgagccctgtc cctgcggccagaggcgtgcggccagcggcggggggc gcagtgcacacgagggggctggacttcgctgtgatact acatctggcgcccttgccgggactgtggggtccttctcc tgtcactggttatccctttactgcaaacggggcagaaag aaactcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagta caaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttc cagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaa gttcagcaggagcgcagacgcccccgctacaagcagg gccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaa gagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggcggg accctgagatgggggaaagccgagaaggagaacc tcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagat ggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagc gccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggt ctcagtcagccaccaaggacacctacgacgcccttcac atgcaggccctgccccctgc	티사젠렉류셀 CD19 CAR 뉴클레오타이드 서열

[0156]

32	MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQTTS SLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY GVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTYYN SALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTV SSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR PAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	티사젠렉류셀 CD19 CAR 아미노산 서열
33	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgctgagctgcc ccaccccgcccttctgctgatccccgacatccagatgaccc agaccacctccagcctgagcgccagcctggcgaccgg gtgaccatcagctgccggccagccaggacatcagcaa gtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgt caagctgctgatctaccacaccagccgctgcacagcgg cgtgccagccgggttagcggcagcggctccggcaccga ctacagcctgaccatctcaacctggaacaggaagatgc gccacctacttttgccagcagggaacacactgccctaca cctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagca cctccggcagcggcaagcctggcagcggcgaggcgag caccaagggcgagggtgaagctgcaggaaaagcggccct ggctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgc accgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagc tggatccggcagccccaggaaggcctggaatggctg ggctgctgctggggcagcgagaccactactacaacagc gccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacag caagagccagggtgtcctgaagatgaacagcctgcagac cgacgacaccgcatctactactgcgccaagcactactac tacggcggcagctacgccatggactactggggccagggc accagcgtgaccgtgagcagcgaatctaagtacggaccg cctgcccccttgccctatgtctgggtgctggtggtgctg gaggcgtgctggcctgtacagcctgctggtcaccgtggc cttcatcatctttgggtgaaacggggcagaaagaaactcc tgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaacta ctcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaaga agaagaaggaggatgtgaactgcgggtgaagttcagca gaagcggcagcggccctgcctaccagcagggccagaat cagctgtacaacgagctgaacctgggcagaagggaaga gtacgacgtcctggataagcggagaggccgggacccgtg agatggcgggcaagcctcggcggaagaacccccagga aggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccg	리소캅타진 마라류셀 CD19 CAR 뉴클레오타이드 서열

[0157]

	aggcctacagcgagatcgccatgaagggcgagcggag gcggggcaagggccacgacggcctgtatcagggcctgtc caccgccaccaaggatacctacgacgccctgcacatgca ggcctgcccccaagg	
34	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTS SLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQ KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSV TVSSESKYGPPCPPCPMFVWLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	리소칼타진 마라류셀 CD19 CAR 아미노산 서열
35	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccac accagcattcctcctgatcccagacatccagatgacaca gactacatcctccctgctgctcctctgggagacagagtca ccatcagttgcagggcaagtgcaggacattagtaaatatta aattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcct gatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaa ggttcagtggtcagtggtctggaacagattattctctacca ttagcaacctggagcaagaagatattgccacttactttgcc aacagggtaatacgttccgtacacgttcggagggggga ctaagttgaaataacagggtccacctctggtaccggcaa gcccgatctggcgagggatccaccaagggcgaggtga aactgcaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcac agagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattac ccgactatggtgtaagctggattgccagcctccacgaaa gggtctggagtggtgggagtaatatgggtagtgaaacc acatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatc aaggacaactccaagagccaagtttcttaaaaatgaaca gtctgcaaactgatgacacagccattactactgtgcaaaa cattattactacggtgtagctatgctatggactactgggtc aaggaacctcagtcaccgtctcctcagcgccgcaattga agttagtgcctcctccttacctagacaatgagaagagca atggaaccattatccatgtgaaagggaacacctttgtcca agtccctatttccggaccttctaagcccttttgggtgctggt ggtggtgggggagtcctggctgtatagctgttagtaac agtggccttattatttctgggtgaggagtaagaggagcag gctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgc cccgggcccaccgcaagcattaccagccctatgccc ccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagtca	악시칼타젠 실로류셀 CD19 CAR 뉴클레오타이드 서열

[0158]

	gcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggcca gaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagaga ggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggaccct gagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcagg aaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgg aggcctacagtgagattggatgaaaggcgagcgccgg aggggcaagggcacgatggcctttaccaggggtctcagt acagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcag gccctgccccctgc	
36	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTS SLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWYQQ KPDGTVKLLIYHTRSRLHSGVPSRFSGSGS GTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT FGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTY YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTV TVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPLPFGPSKPFWWLVVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	악시캡타겐 실로류셀 CD19 CAR 아미노산 서열

[0159]

표 8

티사젠렉류셀 CD19 CAR 서열의 주석

특징	뉴클레오타이드 서열 위치	아미노산 서열 위치
CD8α 신호 펩타이드	1-63	1-21
FMC63 scFv (V _L -3xG ₄ S 링커-V _H)	64-789	22-263
CD8α 힌지 도메인	790-924	264-308
CD8α 막관통 도메인	925-996	309-332
4-1BB 공자극 도메인	997-1122	333-374
CD3ζ 신호전달 도메인	1123-1458	375-486

[0160]

표 9

리소캡타진 마라류셀 CD19 CAR 서열의 주석

특징	뉴클레오타이드 서열 위치	아미노산 서열 위치
GMCSFR- α 신호 펩타이드	1-66	1-22
FMC63 scFv (V _L -Whitlow 링커-V _H)	67-801	23-267
IgG4 힌지 도메인	802-837	268-279
CD28 막관통 도메인	838-921	280-307
4-1BB 공자극 도메인	922-1047	308-349
CD3 ζ 신호전달 도메인	1048-1383	350-461

[0161]

표 10

악시캡타겐 실로류셀 CD19 CAR 서열의 주석

특징	뉴클레오타이드 서열 위치	아미노산 서열 위치
CSF2RA 신호 펩타이드	1-66	1-22
FMC63 scFv (V _L -Whitlow 링커-V _H)	67-801	23-267
CD28 힌지 도메인	802-927	268-309
CD28 막관통 도메인	928-1008	310-336
CD28 공자극 도메인	1009-1131	337-377
CD3 ζ 신호전달 도메인	1132-1467	378-489

[0162]

[0163]

일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 바와 같은 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하거나 또는 서열번호 31, 33 또는 35에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다). 특정 실시형태에서, 뉴클레오타이드 서열은 포유류 세포, 예를 들어, 인간 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 암호화된 CD19 CAR은 각각 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 대응하는 아미노산 서열을 갖거나, 각각 서열번호 32, 34 또는 36에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다).

[0164]

CD20 CAR

[0165]

일부 실시형태에서, CAR은 CD20 CAR이고, 이런 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. CD20은 프로-B 기 초기에 B 세포 표면 상에서 발견되고 B 세포 성숙까지 점진적으로 증가된 수준에서만 뿐만 아니라 대부분의 B-세포 신생물의 세포 상에서 발견되는 항원이다. CD20 양성 세포는 또한 때때로 호지킨 질환, 골수종 및 흉선종의 사례에서 발견된다. 일부 실시형태에서, CD20 CAR은 신호 펩타이드, CD20에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 일련로 포함할 수 있다.

[0166]

일부 실시형태에서, CD20 CAR의 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α

신호 펩타이드는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 IgK 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgK 신호 펩타이드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0167] 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD20, 예를 들어, 인간 CD20에 특이적이다. CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다.

[0168] 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, Leu16, IF5, 1.5.3, 리톡시맵, 오비누투주맵, 이브리투모맵, 오파투무맵, 토시투무맵, 오토로렉스타맵, 벨투주맵, 우블리톡시맵 및 오크렐리주맵을 포함하는 CD20에 특이적인 항체로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, CD20 CAR은, 예를 들어, MB-106(Fred Hutchinson Cancer Research Center, 문헌[Shadman et al., Blood 134(Suppl.1):3235 (2019)] 참조) UCART20(Collectis, www.cellbiomedgroup.com) 또는 C-CAR066(Cellular Biomedicine Group, 문헌[Liang et al., J. Clin. Oncol. 39(15) suppl:2508 (2021)] 참조)를 포함하는 CD20에 특이적인 CAR로부터 유래된다. 임의의 이들 실시형태에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H , V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0169] 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커에 의해 연결되는 Leu16의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 Leu16 단클론성 항체로부터 유래된 scFv를 포함한다. 문헌[Wu et al., Protein Engineering. 14(12):1025-1033 (2001)]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 링커는 $(G_4S)_n$ (n 은 양의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있음) 링커, 예를 들어, 3xG4S 링커이다. 다른 실시형태에서, 링커는 본 명세서에 기재된 바와 같은 Whitlow 링커이다. 일부 실시형태에서, 전체 Leu16-유래 scFv(Leu16 scFv로도 지칭됨)의 상이한 부분 및 이의 상이한 단백질의 아미노산 서열은 아래의 표 11에 제공된다. 일부 실시형태에서, CD20-특이적 scFv는 서열번호 37, 38 또는 42에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 37, 38 또는 42에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, CD20-특이적 scFv는 서열번호 39 내지 41 및 43 내지 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD20-특이적 scFv는 서열번호 39 내지 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD20-특이적 scFv는 서열번호 43 내지 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, CD20-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.

표 11

항-CD20 scFv 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
37	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRA SSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYA TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTI SRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFG GGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGST KGEVQLQQSGAELVKPGASVKMSC KASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGL EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADY YCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTT VTVSS	Whitlow 링커를 갖는 항-CD20 Leu16 scFv 전체 서열
38	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRA SSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYA TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTI SRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFG GGTKLEIK	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 가변 영역
39	RASSSVNYMD	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 CDR1
40	ATSNLAS	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 CDR2
41	QQWSFNPT	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 CDR3
42	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKA SGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWI GAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTA DKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYC ARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVT VSS	항-CD20 Leu16 scFv 중쇄
43	SYNMH	항-CD20 Leu16 scFv 중쇄 CDR1
44	AIYPGNGDTSYNQKFKG	항-CD20 Leu16 scFv 중쇄 CDR2

[0170]

[0171]

일부 실시형태에서, CD20 CAR의 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 힌지 도메인은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 힌지 도메인은 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지 도메인은 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3

도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0172] 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 막관통 도메인은 CD8 α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 막관통 도메인은 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0173] 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인, 예를 들어, 인간 4-1BB 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 도메인은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 CD28 공자극 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 공자극 도메인은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0174] 일부 실시형태에서, CD20 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζeta(ζ) 신호전달 도메인, 예를 들어, 인간 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0175] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 포함하는, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0176] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열번호 10의 CD28 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 포함하는, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0177] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 IgG4 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 포함하는, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0178] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는

적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 포함하는, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0179] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열번호 10의 CD28 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 포함하는, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0180] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 IgG4 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 포함하는, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0181] CD22 CAR

[0182] 일부 실시형태에서, CAR은 CD22 CAR이고, 이런 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 막관통 단백질인 CD22는 B 세포 수용체(BCR) 신호전달을 위한 저해 수용체로서 작용하는 성숙 B 세포 표면 상에서 대부분 발견된다. CD22는 B 세포 림프종 및 백혈병(예를 들어, B-만성 림프구성 백혈병, 틸세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 및 버킷 림프종)의 60 내지 70%에서 발견되고, B 세포 발생 초기에 세포 표면 상에 또는 줄기 세포 상에 존재하지 않는다. 일부 실시형태에서, CD22 CAR은 신호 펩타이드, CD22에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 일련으로 포함할 수 있다.

[0183] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 신호 펩타이드는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 IgK 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgK 신호 펩타이드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0184] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD22, 예를 들어, 인간 CD22에 특이적이다. CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다.

[0185] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, SM03, 이노투주맙, 에프라투주맙, 목세투모맙 및 피나투주맙을 포함하는 CD22에 특이적인 항체로부터 유래된다. 임의의 이들 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H , V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0186] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커에 의해 연결되는 m971의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 m971 단클론성 항체(m971)로부터 유래된 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커는 $(G_4S)_n$ (n은 양의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있음) 링커, 예를 들어, 3xG₄S 링커이다. 다른 실시형태에서, Whitlow 링커가 대신 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 전체 m971-유래 scFv(m971 scFv로도 지칭됨)의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래의 표 12에 제공된다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적

scFv는 서열번호 45, 46 또는 50에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 45, 46 또는 50에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 47 내지 49 및 51 내지 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 47 내지 49에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 51 내지 53에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.

[0187]

일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 모 항체 m971에 비해 유의미하게 개선된(약 2nM로부터 50pM보다 적게 개선됨) CD22 결합 친화도를 갖는 m971의 친화도 성숙 변이체인 m971-L7로부터 유래된 scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, m971-L7로부터 유래된 scFv는 $(G_4S)_n$ (n은 양의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있음) 링커, 예를 들어, $3 \times G_4S$ 링커에 의해 연결된 m971-L7의 V_H 및 V_L 을 포함한다. 다른 실시형태에서, Whitlow 링커가 대신 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 전체 m971-L7-유래 scFv(m971-L7 scFv로도 지칭됨)의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래의 표 12에 제공된다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 54, 55 또는 59에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 54, 55 또는 59에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 56 내지 58 및 60 내지 62에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 56 내지 58에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 서열번호 60 내지 62에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, CD22-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.

표 12

항-CD22 CAR, scFv, 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
45	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITI NPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTV VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITICRASQTIW SYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSL QSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISLQ AEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKL EIK	3xG4S 링커를 갖는 항-CD22 m971 scFv 전체 서열
46	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAIS GDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITI NPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTV VSS	항-CD22 m971 scFv 중쇄 가변 영역
47	GDSVSSNSAA	항-CD22 m971 scFv 중쇄 CDR1
48	TYYSRSKWYN	항-CD22 m971 scFv 중쇄 CDR2
49	AREVTGDLEDAFDI	항-CD22 m971 scFv 중쇄 CDR3
50	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRA SQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYA ASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLT SSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFG QGTKLEIK	항-CD22 m971 scFv 경쇄
51	QTIWSY	항-CD22 m971 scFv 경쇄 CDR1
52	AAS	항-CD22 m971 scFv 경쇄 CDR2
53	QQSYSIPQT	항-CD22 m971 scFv 경쇄 CDR3
54	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSTCAI SGDSVSSNSVAWNWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSTWYNDYAVSMKSRIT INPDNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY	3xG4S 링커를 갖는 항-CD22 m971-L7 scFv 전체 서열

[0188]

	YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMI QSPSSLSASVGDRVITICRASQTIW SYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQ SGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQA EDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLE IK	
55	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSTCAI SGDSVSSNSVAWNWIRQSPSRGLE WLGRTYYRSTWYNDYAVSMKSRIT INPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVT VSS	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 가변 영역
56	GDSVSSNSVA	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 CDR1
57	TYRSTWYN	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 CDR2
58	AREVTGDLEDAFDI	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 CDR3
59	DIQMIQSPSSLSASVGDRVITICRA SQTIWSYLNWYRQRPGEAPNLLIYA ASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTI SSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFG QGTKLEIK	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 가변 영역
60	QTIWSY	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 CDR1
61	AAS	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 CDR2
62	QQSYSIPQT	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 CDR3
136	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQL QQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSV SSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGR TYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDT SKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR EVTGDLEDAFDIWGQGTMTVTSSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRASQTIWSYLNWYQRPKGAPN LLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTD FTLTSSLQAEDFATYYCQQSYSIPQ TFGQGTKLEIKAAATTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL	예시적인 CD22 CAR 아미노산 서열

[0189]

SLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDRRRGRDPPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	
--	--

[0190]

[0191]

일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 면역독소 HA22 또는 BL22를 포함한다. 면역독소 BL22 및 HA22는 박테리아 독소에 융합된 CD22에 특이적인 scFv를 포함하는 치료제이고, 따라서 CD22를 발현시키는 암세포 표면에 결합하고 암세포를 사멸시킬 수 있다. BL22는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A의 38-kDa 절단된 형태에 융합된 항-CD22 항체인 RFB4의 dsFv를 포함한다(Bang et al., Clin. Cancer Res., 11:1545-50 (2005)).

HA22(CAT8015, 목세투모맵 파수도톡스(moxetumomab pasudotox))는 BL22의 돌연변이된, 보다 고친화도의 형태이다(Ho et al., J. Biol. Chem., 280(1): 607-17 (2005)). CD22에 특이적인 HA22 및 BL22의 항원 결합 도메인의 적합한 서열은, 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용된 미국 특허 제7,541,034호; 제7,355,012호; 및 제7,982,011호에 개시되어 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 힌지 도메인은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 힌지 도메인은 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지 도메인은 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0193] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 막관통 도메인은 CD8 α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 막관통 도메인은 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0194] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인, 예를 들어, 인간 4-1BB 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 도메인은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 CD28 공자극 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 공자극 도메인은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0195] 일부 실시형태에서, CD22 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인, 예를 들어, 인간 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0196] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 45 또는 서열번호 54에 제시된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 포함하는, CD22 CAR을 암호화하는

뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

- [0197] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 45 또는 서열번호 54에 제시된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열번호 10의 CD28 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 포함하는, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0198] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 45 또는 서열번호 54에 제시된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 IgG4 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 포함하는, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0199] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 45 또는 서열번호 54에 제시된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 포함하는, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0200] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 45 또는 서열번호 54에 제시된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열번호 10의 CD28 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 포함하는, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0201] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 서열번호 45 또는 서열번호 54에 제시된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 IgG4 힌지 도메인, 서열번호 15의 CD28 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 포함하는, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.
- [0202] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 서열번호 136에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 서열번호 136에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 발현 카세트를 포함하고, 다음의 구성성분을 갖는다: GMCSFR- α 신호 펩타이드, m971 scFv(V_H -G4S 링커- V_L), CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인(표 12).
- [0203] BCMA CAR
- [0204] 일부 실시형태에서, CAR은 BCMA CAR이고, 이런 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. BCMA는 말단 분화된 B 세포 또는 성숙 B 림프구 상에서 가장 높은 발현을 갖는 B 세포 계통의 세포 상에서 발현되는 종양 괴사 패밀리 수용체(TNFR)이다. BCMA는 장기간 체액성 면역을 유지하기 위한 형질세포의 생존을 매개하는 데 관련된다. BCMA의 발현은 최근에 다수의 암, 예컨대, 다발성 골수종, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 다양한 백혈병 및 교모세포종과 연관되었다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR은 신호 펩타이드, BCMA에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 일렬로 포함할 수 있다.
- [0205] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 신호 펩타이드는 CD8 α 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 신호 펩타이드는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동

일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 IgK 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgK 신호 펩타이드는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 신호 펩타이드는 GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, GMCSFR- α 또는 CSF2RA 신호 펩타이드는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0206] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 BCMA, 예를 들어, 인간 BCMA에 특이적이다. BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다.

[0207] 일부 실시형태에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, 벨란타맵, 엘란나타맵, 테클리스타맵, LCAR-B38M 및 실타캡타진을 포함하는 BCMA에 특이적인 항체로부터 유래된다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H , V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0208] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)]에 기재된 바와 같은 무린 단클론성 항체인 C11D5.3으로부터 유래된 scFv를 포함한다. 또한 PCT 출원 공개 WO2010104949를 참조한다. C11D5.3-유래 scFv는 Whitlow 링커에 의해 연결되는 C11D5.3의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함할 수 있으며, 이의 아미노산 서열은 아래의 표 13에 제공된다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 63, 64 또는 68에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 63, 64 또는 68에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 65 내지 67 및 69 내지 71에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 65 내지 67에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 69 내지 71에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한 (예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.

[0209] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)] 및 PCT 출원 공개 WO2010104949에 기재된 바와 같이 다른 무린 단클론성 항체인 C12A3.2로부터 유래된 scFv를 포함하며, 이의 아미노산 서열은 또한 아래의 표 13에 제공된다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 72, 73 또는 77에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 72, 73 또는 77에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 74 내지 76 및 78 내지 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 74 내지 76에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 78 내지 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한 (예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바

와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.

- [0210] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Friedman et al., Hum. Gene Ther. 29(5):585-601 (2018))]에서 BB2121로도 지칭되는 인간 BCMA에 대해 높은 특이성을 갖는 무린 단클론성 항체를 포함한다. 또한 PCT 출원 공개 WO2012163805를 참조한다.
- [0211] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 LCAR-B38M로도 지칭되는 문헌[Zhao et al., J. Hematol. Oncol. 11(1):141 (2018)]에 기재된 바와 같은 BCMA의 두 에피토프에 결합할 수 있는 두 중쇄의 단일 가변 단편을 포함한다. 또한 PCT 출원 공개 WO2018028647을 참조한다.
- [0212] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 FHVH33으로도 지칭되는 문헌[Lam et al., Nat. Commun. 11(1):283 (2020)]에 기재된 바와 같은 완전 인간 중쇄 가변 도메인(FHVH)을 포함한다. 또한 PCT 출원 공개 WO2019006072를 참조한다. FHVH33 및 이의 CDR의 아미노산 서열은 아래의 표 13에 제공된다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 81에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 81에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 82 내지 84에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.
- [0213] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 미국 특허 제11,026,975 B2호에 기재된 바와 같이 CT103A(또는 CAR0085)로부터 유래된 scFv를 포함하며, 이의 아미노산 서열은 아래의 표 13에 제공된다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 118, 119 또는 123에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 118, 119 또는 123에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 120 내지 122 및 124 내지 126에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 120 내지 122에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열번호 124 내지 126에 제시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA-특이적 scFv는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 확인된 임의의 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이것으로 이루어진다.
- [0214] 추가적으로, CAR 및 BCMA로 향하는 결합체는 미국 특허 출원 공개 제2020/0246381 A1호 및 제2020/0339699 A1호에 기재되어 있고, 이들 각각의 전문은 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

표 13

항-BCMA 결합제 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
63	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRA SESVSVIGAH LIHWYQQKPGQPPKL LIYLASNLETGV PARFSGSGSGTDF TLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRT FGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG STKGQIQLVQSGPELKKPGETVKIS CKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGL KWMGWINTETREPAYAYDFRGRFA FSLETSASTAYLQINNLYEDTATYF CALDYSYAMDYWGQGSVTVSS	Whitlow 링커를 갖는 항-BCMA C11D5.3 scFv 전체 서열
64	DIVLTQSPASLAMS LGKRATISCRA SESVSVIGAH LIHWYQQKPGQPPKL LIYLASNLETGV PARFSGSGSGTDF TLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRT FGGGTKLEIK	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 가변 영역
65	RASESVSVIGAH LIH	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 CDR1
66	LASNLET	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 CDR2
67	LQSRIFPRT	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 CDR3
68	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMG WINTETREPAYAYDFRGRFAFSLET SASTAYLQINNLYEDTATYFCALD YSYAMDYWGQGSVTVSS	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 가변 영역
69	DYSIN	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 CDR1
70	WINTETREPAYAYDFRG	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 CDR2
71	DYSYAMDY	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 CDR3
72	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRA SESVTILGSH LIYHWYQQKPGQPPTL LIQLASNVQTGV PARFSGSGSRTDF TLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRITPRT FGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG STKGQIQLVQSGPELKKPGETVKIS	Whitlow 링커를 갖는 항-BCMA C12A3.2 scFv 전체 서열

[0215]

	CKASGYTFRHYSMNWVKQAPGKG LKWMGRINTESGVPIYADDFKGRFA FSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYF CSNDYLYSLDFWGQGTALTSS	
73	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRA SESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTL LIQLASNVQTVGPARGSGSGSRTDF TLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRT FGGGTKLEIK	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 가변 영역
74	RASESVTILGSHLIY	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 CDR1
75	LASNVQT	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 CDR2
76	LQSRTIPRT	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 CDR3
77	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFRHYSMNWVKQAPGKGLKWM GRINTESGVPIYADDFKGRFAFSVE TSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSN DYLYSLDFWGQGTALTSS	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 가변 영역
78	HYSMN	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 CDR1
79	RINTESGVPIYADDFKG	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 CDR2
80	DYLYSLDF	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 CDR3
81	EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGDYIYYADSVKGRFTISR ISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK EGTGANSSLADYRGQGTALTSS	항-BCMA FHVH33 전체 서열
82	GFTFSSYA	항-BCMA FHVH33 CDR1
83	ISGSGDYI	항-BCMA FHVH33 CDR2
84	AKEGTGANSSLADY	항-BCMA FHVH33 CDR3
118	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGDFTLT SSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGG	Whitlow 링커를 갖는 항-BCMA CT103A scFv 전체 서열

[0216]

	GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTK GQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTV SGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSISYSGSTYYNPSLKSRTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR DRGDTILDVWGQGTMTVSS	
119	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGG GTKVEIK	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 가변 영역
120	QSISSY	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 CDR1
121	AAS	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 CDR2
122	QQKYDLLT	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 CDR3
123	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEW IGSISYSGSTYYNPSLKSRTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD RGDTILDVWGQGTMTVSS	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 가변 영역
124	GGSISSSSYY	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 CDR1
125	ISYSGST	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 CDR2
126	ARDRGDTILDV	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 CDR3

[0217]

[0218]

일부 실시형태에서, BCMA CAR의 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 힌지 도메인은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 힌지 도메인은 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지 도메인은 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0219]

일부 실시형태에서, BCMA CAR의 막관통 도메인은 CD8 α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8 α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD8 α 막관통 도메인은 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어

진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 막관통 도메인은 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0220] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포내 공자극 도메인은 4-1BB 공자극 도메인, 예를 들어, 인간 4-1BB 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 4-1BB 공자극 도메인은 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 세포내 공자극 도메인은 CD28 공자극 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 공자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28 공자극 도메인은 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0221] 일부 실시형태에서, BCMA CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인, 예를 들어, 인간 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3 ζ 신호전달 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 18 또는 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0222] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 기재된 바와 같은 임의의 BCMA-특이적 세포외 결합 도메인을 포함하는 BCMA CAR, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 16의 4-1BB 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는, BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA CAR은 기재한 바와 같이 신호 펩타이드(예를 들어, CD8 α 신호 펩타이드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0223] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 기재된 바와 같은 임의의 BCMA-특이적 세포외 결합 도메인을 포함하는 BCMA CAR, 서열번호 9의 CD8 α 힌지 도메인, 서열번호 14의 CD8 α 막관통 도메인, 서열번호 17의 CD28 공자극 도메인, 서열번호 18 또는 서열번호 115의 CD3 ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는, BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이들 실시형태에서, BCMA CAR은 추가로 기재한 바와 같이 신호 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0224] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 서열번호 127에 제시된 바와 같은 BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하거나 또는 서열번호 127에 제시된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 80% 동일(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)하다(표 14 참조). 다음의 구성성분: CD8 α 신호 펩타이드, CT103A scFv(V_L -Whitlow 링커- V_H), CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 갖는 암호화된 BCMA CAR은 서열번호 128에 제시된 대응하는 아미노산 서열을 갖거나, 또는 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일하다).

[0225] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 예를 들어, 이데캅타젠 비클류셀(bb2121로도 불리는 ide-cel)을 포함하는, BCMA CAR의 상업적으로 입수 가능한 실시형태를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 이데캅타젠 비클류셀을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 일부를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 이데캅타젠 비클류셀은 다음의 구성성분: BB2121 결합체, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 갖는 BCMA CAR을 포함한다.

표 14

BCMA CAR 의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
127	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgtggcctt gctgctccacgccgccaggccggacatccagatgacc agtctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtc accatcacttgccgggcaagttagagcattagcagctatt taaattggatcagcagaaaccagggaagcccctaag ctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtccc atcaagggtcagtggcagtgatctgggacagatttactc tcaccatcagcagctgcaacctgaagatttgcaacttac tactgtcagcaaaaatacgaacctcctcacttttgccggag ggaccaagggtgagatcaaaggcagcaccagcggctc cggcaagcctggctctggcgagggcagcacaaggga cagctgcagctgcaggagtcgggccagactggtgaa gccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtg gctccatcagcagtagtagttactactgggctggatccg ccagccccaggggaaggggctggagtggattgggagta tctctatagtgggagcacctactacaacccgtccctcaa gagtcgagtcaccatatccgtagacagtcgaagaacc agttctccctgaagctgagttctgtgaccgccgcagacac ggcgggtgactactgcgccagagatcgtggagacaccat actagacgtatggggtcagggtacaatggtcaccgtcag ctcattcgtgccgtgttctgcccgcgaacctaccacca cccctgcccctagacctcccacccagcccaacaatcg ccagccagcctctgtctctcgggccgaagcctgtagac ctgctgccggcggagccgtgcacaccagaggcctggac ttcgctgcgacatctacatctgggcccctctggccggca cctgtggcgtgctgctgctgagcctggtgatccctgtact gcaaccaccgggaacaacggggcagaaagaaactcc tgtatatattcaacaacatttatgagaccagtacaaact actcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaa gaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttca gcagatccgccgacgcccctgcctaccagcagggaca gaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcagacgg gaagagtacgacgtgctggacaagcggagaggccgg gaccccagatgggcggaaagcccagacggaagaac ccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaagaca agatggccgaggcctacagcgagatcgcatgaaggg cgagcggaggcgcggaaggccacgatggcctgtac cagggcctgagcaccgccaccaaggacacctacgacg ccctgcacatgcaggccctgccccccaga	예시적인 BCMA CAR 뉴클레오타이드 서열
128	MALPVTALLPLALLHAARPDIMTQSP SSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG	예시적인 BCMA CAR 아미노산 서열

[0226]

	SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQKYDLL TFGGGKTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTK GQLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGG SISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYS GSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARDRGDTILDVWGQGT MVTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHR NKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKDM AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	
--	--	--

[0227]

[0228]

안전 스위치

[0229]

특정 실시형태에서, 다시스트론성 박터는 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 각각 포함하는 1개 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포가 원치않는 방식으로 성장 및 분화되거나 숙주에 대한 과도한 독성을 야기하는 경우, 안전 스위치는 다시스트론성 박터를 함유하는 숙주 세포의 사멸 또는 세포자멸사를 유도하기 위해 본 기술의 다시스트론성 박터에서 사용될 수 있다. 따라서, 안전 스위치의 사용은 생체내에서 비정상 세포를 조건적으로 제거할 수 있게 하고, 임상에서 세포 요법의 적용을 위한 중요한 단계일 수 있다. 안

전 스위치 및 이들의 사용은, 예를 들어, 문헌[Düzgüneş, Origins of Suicide Gene Therapy (2019);

Düzgüneş (eds), Suicide Gene Therapy. Methods in Molecular Biology, vol. 1895 (Humana Press, New York, NY)(HSVtk, 사이토신 데아미나제, 나이트로환원효소, 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 및 겨자무과산화효소의 경우); Zhou and Brenner, Exp Hematol 44(11):1013-1019 (2016)(iCaspase9의 경우); Wang et al., Blood 18(5):1255-1263 (2001)(huEGFR의 경우); 미국 특허 출원 공개 제20180002397호(HER1의 경우); 및 문헌 [Philip et al., Blood124(8):1277-1287 (2014)(RQR8의 경우)]에 기재되어 있다.

[0230]

일부 실시형태에서, 안전 스위치는, 예를 들어, 약물 또는 프로드러그의 존재 하에 또는 선택적 외인성 화합물에 의한 활성화 시, 제어된 방식으로 세포사를 야기할 수 있다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치의 발현은 게놈 위치-독립적 전사 조절의 경우에 다시스트론성 박터의 프로모터에 의해, 또는 표적 유전자 좌위에 작제물의 부위-특이적 통합의 경우에 내인성 프로모터에 의해 조절된다.

[0231]

일부 실시형태에서, 안전 스위치는 "자살 유전자" 또는 "자살 스위치"를 포함한다. 자살 유전자는 세포의 사멸이 이들이 원치않는 방식으로 성장하고 분화되어야 한다는 것을 야기할 수 있다. 자살 유전자는 특정 화합물, 예를 들어, 비독성 화합물을 상당히 독성인 대사물질로 선택적으로 전환하는 효소에 의해 활성화될 때에만 세포 사멸을 초래하는 단백질을 암호화할 수 있다.

[0232]

일부 실시형태에서, 다시스트론성 박터의 안전 스위치는 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk), 사이토신 데아미나제(CyD), 나이트로환원효소(NTR), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(PNP), 겨자무과산화효소, 유도성 카스파제 9(iCasp9), 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9), CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA 및 RQR8로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0233]

일부 실시형태에서, 다시스트론성 박터의 안전 스위치는, 예를 들어, 세포 내에서 비독성 프로드러그를 독성 대사물질로 전환시킴으로써 약물 또는 프로드러그에 의해 활성화될 때 세포 사멸 능력을 갖는 생성물을 암호화하는 이식유전자일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 세포 사멸은 박터를 포함하는 세포를 약물 또는 프로드러그와 접촉시킴으로써 활성화된다. 일부 경우에, 안전 스위치는 HSVtk인데, 이는 간시클로버(GCV)를 GCV-트라이포스페이트로 전환시킴으로써, DNA 합성을 방해하고 분화 세포를 사멸시킨다. 일부 경우에, 안전 스위치는 CyD 또는 이의 변이체인데, 이는 사이토신의 유라실로의 가수분해 탈아미노화를 촉매함으로써 항진균 약물 5-플루오로사이토신(5-FU)을 세포독성 5-플루오로유라실(5-FU)로 전환시킨다. 5-FU는 세포 효소에 의해 강력한 항-대사물질(5-FdUMP, 5-FdUTP, 5-FUTP)로 추가로 전환된다. 이러한 화합물은 티미딜레이트 합성효소 및 RNA 및 DNA의 생산을 저해하여, 세포사를 초래한다. 일부 경우에, 안전 스위치는 NTR 또는 이의 변이체인데, 이는 증식 및 비증식

세포에서 독성인 반응성 N-하이드록실아민 중간체에 대한 나이트로기의 환원을 통해 프로드러그 CB1954 상에서 작용할 수 있다. 일부 경우에, 안전 스위치는 PNP 또는 이의 변이체인데, 이는 프로드러그 6-메틸퓨린 데옥시리보사이드 또는 플루다라빈을 증식 세포와 비증식 세포 둘 다에 대한 독성 대사로물로 전환시킬 수 있다. 일부 경우에, 안전 스위치는 겨자무과산화효소 또는 이의 변이체인데, 이는 인돌-3-아세트산(IAA)을 강력한 세포독소로 촉매할 수 있고 따라서 세포 사멸을 달성한다.

- [0234] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터의 안전 스위치는 iCasp9일 수 있다. 카스파제 9는 생리적 조건 하에서, 손상된 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C의 방출에 의해 활성화되는 고유한 미토콘드리아 세포자멸사 경로의 구성성분이다. 이어서, 활성화된 카스파제 9는 카스파제 3을 활성화시키고, 이는 말단 효과기 분자가 세포자멸사를 야기하는 것을 촉발한다. iCasp9는 절단된 카스파제 9를 (이의 생리적 이량체화 도메인 또는 카스파제 활성화 도메인 없이) FK506 결합 단백질(FKBP)인 FKBP12-F36V에 펩타이드 링커를 통해 융합시킴으로써 생성될 수 있다. iCasp9는 낮은 이량체-독립적 기본 활성을 갖고, 이들의 표현형, 기능 또는 항원 특이성을 손상시키는 일 없이 숙주 세포(예를 들어, 인간 T 세포)에서 안정하게 발현될 수 있다. 그러나, 이량체화(CID)의 화학적 유도제, 예컨대, 리미두시드 (AP1903), AP20187 및 라파마이신의 존재 하에, iCasp9는 유도성 이량체화를 거치고 하류의 카스파제 분자를 활성화시켜, iCasp9를 발현시키는 세포의 세포자멸사를 초래할 수 있다. 예를 들어, PCT 출원 공개 W02011/146862; 문헌[Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365:18 (2011); Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant 13:913-924 (2007)] 참조. 특히, 라파마이신-유도성 카스파제 9 변이체는 rapaCasp9로 불린다. 문헌[Stavrou et al., Mol. Ther. 26(5):1266-1276 (2018)] 참조. 따라서, iCasp9는 숙주 세포의 제어된 사멸을 달성하기 위해 본 다시스트론성 벡터에서 안전 스위치로서 사용될 수 있다.
- [0235] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터의 안전 스위치는 해당 단백질에 특정 항체의 투여 후에 세포 고갈을 가능하게 하는 막-발현 단백질일 수 있다. 이 범위의 안전 스위치는, 예를 들어, CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA 또는 RQR8을 포함할 수 있다. 이러한 단백질은 특정 항체에 의해 표적화될 수 있는 표면 에피토프를 가질 수 있다.
- [0236] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 CCR4를 포함하는데, 이는 항-CCR4 항체에 의해 인식될 수 있다. 적합한 항-CCR4 항체의 비제한적 예는 모가몰리주맵 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0237] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 CD16 또는 CD30을 포함하며, 이는 항-CD16 또는 항-CD30 항체에 의해 인식될 수 있다. 이러한 항-CD16 또는 항-CD30 항체의 비제한적 예는 AFM13 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0238] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-CD19 항체에 의해 인식될 수 있는 CD19를 포함한다. 이러한 항-CD19 항체의 비제한적 예는 MOR208 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0239] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-CD20 항체에 의해 인식될 수 있는 CD20을 포함한다. 이러한 항-CD20 항체의 비제한적 예는 오비누투주맵, 유블리툽시맵, 오카라투주맵, 리툽시맵, 리툽시맵-RL1b, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다. 따라서 안전 스위치를 발현시키는 세포는 CD20-양성이고, 기재한 바와 같이 항-CD20 항체의 투여를 통해 사멸에 대해 표적화될 수 있다.
- [0240] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-EGFR 항체에 의해 인식될 수 있는 EGFR을 포함한다. 이러한 항-EGFR 항체의 비제한적 예는 토무조툽시맵, R05083945(GA201), 세툽시맵, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0241] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-GD2 항체에 의해 인식될 수 있는 GD2를 포함한다. 이러한 항-GD2 항체의 비제한적 예는 Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 다이니툽시맵, c.60C3-RL1c, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0242] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-HER1 항체에 의해 인식될 수 있는 HER1을 포함한다. 이러한 항-HER1 항체의 비제한적 예는 세툽시맵 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0243] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-HER2 항체에 의해 인식될 수 있는 HER2를 포함한다. 이러한 항-HER2 항체의 비제한적 예는 마르케툽시맵, 트라스투주맵, TrasGEX, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0244] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-MUC1 항체에 의해 인식될 수 있는 MUC1을 포함한다. 이러한 항-MUC1 항체의 비제한적 예는 가티포투주맵 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0245] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-PSMA 항체에 의해 인식될 수 있는 PSMA를 포함한다. 이러한 항-PSMA 항체의 비제한적 예는 KM2812 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.

- [0246] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 항-RQR8 항체에 의해 인식될 수 있는 RQR8을 포함한다. 이러한 항-RQR8 항체의 비제한적 예는 리톡시맙 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.
- [0247] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 HSVtk 및 막-발현 단백질, 예를 들어, CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA 및 RQR8을 포함한다.
- [0248] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 변형된 세포 표면 상에서 발현된 하나 이상의 관용원성 인자를 인식하는 치료제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 CD47과 신호 조절 단백질 알파(SIRP α), 예를 들어, CD47-SIRP α 차단제의 상호작용을 저해 또는 차단하는 치료제를 포함한다. SIRP α 는 순환 면역 세포 상의 막관통 수용체 단백질이다. 외래 세포에 의해 발현되는 CD47이 SIRP α 에 결합할 때, 이는 저해성의 "나를 먹지 말라"는 신호를 수용자의 면역계에 전달하고, 따라서, 수용자의 면역계에 의한 거부를 피한다. 따라서, CD47-SIRP α 상호작용의 중단은 면역-보호 마스킹을 없애고, 수용자의 면역계에 의한 외래 세포의 제거를 초래한다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 CD47, SIRP α , 또는 둘 다의 세포 표면 발현을 중화시키거나, 차단하거나, 길항하거나 또는 방해하는 제제이다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 CD47, SIRP α 또는 둘 다의 상호작용을 저해하거나 차단한다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제(예를 들어, CD47-SIRP α 차단제, 저해제, 감소제, 길항제, 중화제 또는 간섭제)는 CD47에 결합하는 항체 또는 이의 단편, CD47에 결합하는 이중특이성 항체, CD47에 결합하는 면역사이토카인 융합 단백질, 융합 단백질을 함유하는 CD47, SIRP α 에 결합하는 항체 또는 이의 단편, SIRP α 에 결합하는 이중특이성 항체, SIRP α 에 결합하는 면역사이토카인 융합 단백질, 융합 단백질을 함유하는 SIRP α 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 제제를 포함한다.
- [0249] 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 CD47-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47-결합 도메인은 SIRP α 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 면역글로불린 G(IgG) Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG1 Fc 도메인은 인간 항체의 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 TTI-621, TTI-622 및 ALX148로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 TTI-621이다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 TTI-622이다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 ALX148이다. 일부 실시형태에서, IgG Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47-SIRP α 차단제는 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 MIAP410, B6H12 및 마그롤리맙(Magrolimab)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 항체는 MIAP410이다. 일부 실시형태에서, 항체는 B6H12이다. 일부 실시형태에서, 항체는 마그롤리맙이다. 일부 실시형태에서, 항체는 AO-176, IBI188(레타폴리맙), STI-6643 및 ZL-1201로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 항체는 AO-176(Arch)이다. 일부 실시형태에서, 항체는 IBI188(레타폴리맙)(Innovent)이다. 일부 실시형태에서, 항체는 STI-6643(Sorrento)이다. 일부 실시형태에서, 항체는 ZL-1201(Zai)이다.
- [0250] 일부 실시형태에서, CD47에 결합하는 유용한 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맙((Hu5F9-G4))(Forty Seven, Inc.; Gilead Sciences, Inc.), 우라브렐리맙, CC-90002 (Celgene; Bristol-Myers Squibb), IBI-188(Innovent Biologics), IBI-322(Innovent Biologics), TG-1801(TG Therapeutics; NI-1701로도 알려짐, Novimmune SA), ALX148(ALX Oncology), TJ011133(TJC4로도 알려짐, I-Mab Biopharma), FA3M3, ZL-1201 (Zai Lab Co., Ltd), AK117(Akesbio Australia Pty, Ltd.), AO-176(Arch Oncology), SRF231(Surface Oncology), GenSci-059(GeneScience), C47B157(Janssen Research and Development), C47B161(Janssen Research and Development), C47B167(Janssen Research and Development), C47B222 (Janssen Research and Development), C47B227(Janssen Research and Development), Vx-1004(Corvus Pharmaceuticals), HMBD004(Hummingbird Bioscience Pte Ltd), SHR-1603(Hengrui), AMMS4-G4(Beijing Institute of Biotechnology), RTX-CD47(University of Groningen) 및 IMC-002(Samsung Biologics; ImmuneOncia Therapeutics)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편은 CD47 결합에 대해 마그롤리맙, 우라브렐리맙, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47 및 IMC-002를 포함하는 군으로부터 선택된 항체와 경쟁하지 않는다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 단편은 CD47 결합에 대해 마그롤리맙, 우라브렐리맙, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47 및 IMC-002로부터 선택된 항체와 경쟁한다. 일부 실시형태에서, CD47에 결합하는 항체 또는 이의 단편은 CD47에 대한 단일쇄 Fv 단편(scFv), CD47에 대한 Fab, CD47에 대한 VHH 나노바디, CD47에 대한 DARPIn, 및 이들의 변이체를 포함하는 군으로부터 선택된다.

일부 실시형태에서, CD47에 대한 scFv, CD47에 대한 Fab, 및 이들의 변이체는 마그롤리맵, 우라브렐리맵, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47 및 IMC-002를 포함하는 군으로부터 선택된 임의의 항체의 항원 결합 도메인에 기반한다. CD47-SIRP α 차단제에 관한 추가적인 정보는 PCT 출원 공개 WO2022076928에서 찾을 수 있으며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0251] 특정 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 세포 요법, 예를 들어, 암 요법에서 사용하기 위한 관심 이상유전자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 각각 포함하는 1개 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리되어 있는 발현 카세트로, 하나 이상의 관용원성 인자, 하나 이상의 CAR, 1개 이상의 안전 스위치 및/또는 세포 요법을 위한 1개 이상의 다른 관심 이식유전자의 공동 발현을 가능하게 하도록 설계될 수 있다.

[0252] 구체적 예시적 실시형태

[0253] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위에 의해 분리된다.

[0254] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위에 의해 분리된다.

[0255] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위에 의해 분리된다.

[0256] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트, (c) CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트 및 (d) 임의의 2개의 이웃하는 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 (e) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제4 발현 카세트를 더 포함하되, 제4 발현 카세트는 제1 발현 카세트, 제2 발현 카세트 및/또는 제3 발현 카세트로부터 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위에 의해 분리된다.

[0257] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위 및 퓨린 부위를 포함하는, 다시스트론성 벡터가 제공되되, 퓨린 부위는 5'에서 3' 순서에서 2A 부위 앞에 있다. 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터

는 (d) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 더 포함하되, 제3 발현 카세트는 제1 발현 카세트 및/또는 제2 발현 카세트로부터 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위에 의해 분리된다.

[0258] 일부 양상에서, (a) CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, (b) 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 (c) 제1 발현 카세트와 제2 발현 카세트를 분리시키는 2A 부위, 또는 2A 및 퓨린 부위를 포함하는 다시스트론성 벡터가 제공된다.

[0259] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는, 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 분리된, CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함한다. 제1 및 제2 발현 카세트의 5'에서 3' 순서는 반전될 수 있고, 즉, CD47 유전자는 CD19 CAR 유전자 앞에 있거나 뒤에 있을 수 있다. 그러나, 실시예에 나타내는 바와 같이, CD19 CAR 유전자 앞에 CD47 유전자를 5'에서 3' 순서에 위치시키는 것은 선천성 면역 세포 사멸로부터 숙주 세포의 면역 보호를 개선시키기 위해 CD47의 발현을 증가시킬 수 있다. 특정 이들 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 제1 및/또는 제2 발현 카세트로부터 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 안전 스위치의 위치는, 예를 들어, 5'에서 3' 순서에서 CD47 및 CD19 CAR 카세트 앞, CD47과 CD19 CAR 카세트 사이, 또는 CD47과 CD219 CAR 카세트 뒤로 달라질 수 있다.

[0260] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 분리된 CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 제1 및/또는 제2 발현 카세트로부터 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 안전 스위치의 위치는, 예를 들어, 5'에서 3' 순서에서 CD47 및 CD20 CAR 카세트 앞, CD47과 CD20 CAR 카세트 사이, 또는 CD47과 CD20 CAR 카세트 뒤로 달라질 수 있다.

[0261] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 분리된 CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 제1 및/또는 제2 발현 카세트로부터 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 안전 스위치의 위치는, 예를 들어, 5'에서 3' 순서에서 CD47 및 CD22 CAR 카세트 앞, CD47과 CD22 CAR 카세트 사이, 또는 CD47과 CD22 CAR 카세트 뒤로 달라질 수 있다.

[0262] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트 및 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 포함하며, 이들 모두는 1개 이상의 기재된 바와 같은 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 서로로부터 분리된다. 이러한 다시스트론성 벡터는 숙주 세포에서 2개의 CAR(즉, CD22 CAR 및 CD19 CAR)의 동시 발현을 가능하게 한다. 서열 유사성으로 인한 재조합 위험을 최소화하기 위해, CD22 CAR 및 CD19 CAR은 1개 이상의 상이한 비항원 결합 도메인을 포함할 수 있고, 예를 들어, CAR은 상이한 힌지 도메인, 막관통 도메인, 공자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 혼입시킬 수 있다. 하나의 비제한적 예로서, 1개의 CAR은 1개의 막관통 도메인(예를 들어, CD28 막관통 도메인)을 포함할 수 있는 반면, 다른 CAR은 상이한 막관통 도메인(예를 들어, CD8 α 막관통 도메인)을 포함한다. 다른 비제한적 예로서, 1개의 CAR은 1개의 공자극 도메인(예를 들어, 4-1BB 공자극 도메인)을 포함할 수 있는 반면, 다른 CAR은 상이한 공자극 도메인(예를 들어, CD28 공자극 도메인)을 포함한다. 또는 대안적으로, CD22 CAR 및 CD19 CAR은 동일한 비-항원 결합 도메인을 포함할 수 있지만, 재조합 위험을 최소화하기 위해 뉴클레오타이드 서열 수준에서 도입된 코돈 발산(codon divergence)을 갖는다. 특정 이들 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 제1, 제2 및/또는 제3 발현 카세트로부터 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제4 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 안전 스위치의 위치는, 예를 들어, 5'에서 3' 순서에서 모든 다른 발현 카세트 앞에, 2개의 발현 카세트 사이에 또는 모든 다른 발현 카세트 뒤에서 달라질 수 있다.

[0263] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 분리된 BCMA CAR을

암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 기재한 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 제1 및/또는 제2 발현 카세트로부터 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제3 발현 카세트를 추가로 포함할 수 있다. 안전 스위치의 위치는, 예를 들어, 5'에서 3' 순서에서 CD47과 BCMA CAR 카세트 앞, CD47과 BCMA CAR 카세트 사이, 또는 CD47과 BCMA CAR 카세트 뒤에서 달라질 수 있다.

[0264] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함한다. 안전 스위치는 5'에서 3' 순서에서 CD47 앞에 오거나 뒤에 올 수 있다.

[0265] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 CD47을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 발현 카세트 및 기재된 바와 같은 1개 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위, 2A 및 퓨린 부위)에 의해 분리된 안전 스위치를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 발현 카세트를 포함하되, 안전 스위치는 HSVtk 및 막-발현 단백질(예를 들어, CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, RQR8 및 CD47-SIRP α 차단제)을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, CD47 및 안전 스위치 이식유전자는 숙주 세포의 명시된 좌위에, 예를 들어, 기재된 바와 같은 상동 유도 수선(HDR)-기반 접근에 의해 부위-지정 삽입(닉인)에서 사용하도록 상동성 아암에 측접된다. 예를 들어, 이식유전자는 숙주 세포, 예를 들어, β 섬 세포 또는 신경아교 전구체 세포(GPC)의 CLYBL 좌위에 삽입될 CLYBL 좌측 상동성 아암(LHA) 및 우측 상동성 아암(RHA)에 의해 측접될 수 있다.

[0266] 절단 부위

[0267] 특정 실시형태에서, 본 기술의 다시스트론성 벡터의 둘 이상의 발현 카세트는 1개 이상의 절단 부위에 의해 분리될 수 있다. 명칭이 시사하는 바와 같이, 다시스트론성 벡터는 숙주 세포에서 1개의 mRNA 전사체로부터의 2개 이상의 별개의 단백질의 동시 발현을 가능하게 한다. 절단 부위는 다중 유전자의 이러한 공동 발현을 달성하기 위해 다시스트론성 벡터의 설계에서 사용될 수 있다.

[0268] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 절단 부위는 1개 이상의 자기-절단 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 자기-절단 부위는 2A 부위를 포함한다. 2A 펩타이드는 피코르나바이러스에서 처음 발견된 18 내지 22개의 아미노산 길이 펩타이드 부류이고, 단백질의 번역 동안 리보솜 스키핑을 유도하여, 그에 따라 동일한 mRNA 전사체로부터 동일한 양의 다중 유전자를 생성할 수 있다. 2A 펩타이드는 리보솜이 글리신(G)과 프롤린(P) 잔기 사이의 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰게 함으로써 mRNA 전사체를 "절단"하는 작용을 하여, 2A 서열의 단부와 다음의 펩타이드 하류 사이의 분리로 이어진다. 분자 생물학에서 통상적으로 사용되는 4종의 2A 펩타이드, 즉, T2A, P2A, E2A 및 F2A가 있으며, 이들의 서열은 표 15에 요약한다. 글리신-세린-글리신(GSG) 링커는 절단 효율을 증가시키기 위해 2A 펩타이드의 N-말단에 선택적으로 첨가된다. 본 개시내용의 서열 주변에서 "("의 사용은 동봉된 서열이 선택적이라는 것을 의미한다.

표 15

2A 펩타이드의 서열

서열번호	아미노산 서열	2A 펩타이드
85	(GSG) EGRGSLTCDGVEENPGP	T2A
86	(GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
87	(GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
88	(GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

[0269]

[0270] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 절단 부위는 1개 이상의 프로테아제 부위를 추가로 포함한다. 1개 이상의 프로테아제 부위는 다시스트론성 벡터의 5'에서 3' 순서에서 자기-절단 부위(예를 들어, 2A 부위) 앞에 오거나 뒤에 올 수 있다. 프로테아제 부위는, 제1 발현 산물이 다음 발현 카세트의 번역 전에 방출되도록 전체 전사체의 번

역 후에 또는 각각의 발현 카세트의 번역 후에 프로테아제에 의해 절단될 수 있다. 이들 실시형태에서, 2A 부위에 추가로 프로테아제 부위를 갖는 것, 특히 5'에서 3' 순서에서 2A 부위에서 앞에 있는 것은 관심의 발현 단백질에 부착된 여분의 아미노산 잔기의 수를 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로테아제 부위는 짝지어진 염기성 아미노산 절단 효소(PACE) 부위로도 알려진 퓨린 부위를 포함한다. 적어도 3개의 퓨린 절단 서열, 즉, FC1, FC2 및 FC3, 표 16에 요약되는 아미노산 서열이 있다. 2A 부위와 유사하게, 절단 효율을 위해 하나 이상의 선택적인 글리신-세린-글리신(GSG) 서열이 포함될 수 있다.

표 16

퓨린 부위의 서열

서열번호	아미노산 서열	퓨린 부위
89	RRRR (GSG)	FC1
90	RKRR (GSG)	FC2
91	RKRR (GSG) TPDPW (GSG)	FC3

[0271]

[0272] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 절단 부위는 하나 이상의 자기-절단 부위, 1개 이상의 프로테아제 부위 및/또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, 절단 부위는 2A 부위 단독을 포함할 수 있다. 다른 예에 대해, 절단 부위는 FC2 또는 FC3 부위 다음에 2A 부위를 포함할 수 있다. 이들 실시형태에서, 하나 이상의 자기-절단 부위는 동일 또는 상이할 수 있다. 유사하게, 1개 이상의 프로테아제 부위는 동일 또는 상이할 수 있다.

[0273]

백터 및 이의 조성물

[0274]

일부 실시형태에서, 본 기술의 2개 이상의 단백질의 다이스트론성 발현을 위해 사용되는 백터는, 예를 들어, 플라스미드, 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 백터, 레트로바이러스 백터, 렌티바이러스 백터, 파지 및 상동 유도 수선(HDR)-기반 공여자 백터를 포함하는 숙주 세포에 뉴클레오타이드 서열을 도입하는 데 적합한 임의의 유형의 백터일 수 있다.

[0275]

일부 실시형태에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 발현 카세트 및 절단 부위를 포함하는 작제물은 백터의 특정 조절 구성요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 발현 백터는 전형적으로 이들이 작동 가능하게 연결된 암호화 서열의 발현 및 가공에 영향을 미치는 데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 조작된다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 가공 신호, 예컨대, 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열; 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 가능하게는 단백질 분비를 향상시키는 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 서열은, 이들이 관심 유전자, 및 관심 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 거리를 두고 작용하는 발현 제어 서열과 인접한다면, 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0276]

일부 실시형태에서, 프로모터는 포유류 세포에서 구성적 유전자 발현을 유도하는 것이다. 빈번하게 사용되는 것은, 예를 들어, 신장인자 1 알파 (EF1 α) 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 급초기 프로모터(Greenaway et al., Gene 18: 355-360 (1982)), 유인원 액포형성 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터(Fiers et al., Nature 273:113-120 (1978)), 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터, 포스포글리세르산 키나제(PGK) 프로모터(Adra et al., Gene 60(1):65-74 (1987)), 인간 베타 액틴 프로모터, 폴리유비퀴틴 C 유전자(UBC) 프로모터 및 CAG 프로모터(Nitoshi et al., Gene 108:193-199 (1991))를 포함한다. 포유류 세포(예를 들어, T 세포)에서 CAR 이식유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터의 예는 EF1 α 프로모터이다. 천연 EF1 α 프로모터는 신장인자-1 복합체의 알파 서브유닛의 발현을 유도하며, 이는 리보솜에 아미노아실 tRNA의 효소 전달을 초래한다. EF1 α 프로모터는 포유류 발현 플라스미드에서 광범위하게 사용되었고, 렌티바이러스 백터에 클로닝된 이식유전자로부터의 CAR 발현을 유도하는 데 효과적인 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌[Milone et al., Mol. Ther. 17(8):1453-1464 (2009)]을 참조한다.

[0277]

일부 실시형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 구성적 프로모터와 달리, 유도성 프로모터는 특정 자극(예를 들어, 화학적 제제, 온도, 빛)에 반응하여 온(on) 상태와 오프(off) 상태 사이를 전환시킬 수 있고, 조직 - 또는 세포-특이적 방식으로 조절될 수 있다. 빈번하게 사용되는 유도성 프로모터의 비제한적 예는 테트라사이

클린 온(Tet-On) 시스템 및 테트라사이클린 오프(Tet-Off) 시스템을 포함하고, 이는 최소 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터) 상류에 위치한 테트라사이클린 반응 구성요소(TRE)를 이용한다(Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(12):5547-5551 (1992)). TRE는 19-뉴클레오타이드 테트라사이클린 오퍼레이터(tetO) 서열의 7개의 반복부로 이루어지고, 테트라사이클린 리프레서(tetR)에 의해 인식될 수 있다. Tet-Off 시스템에서, 테트라사이클린-제어 트랜스활성화인자(tTA)는 단순포진 바이러스의 비리온 단백질 16의 활성화 도메인과 tetR을 융합시킴으로써 발생되었다. 테트라사이클린 또는 이의 유사체(예를 들어, 독시사이클린)의 부재 하에서, tTA는 TRE의 tetO 서열에 결합하고 발현을 유도할 것이며; 테트라사이클린의 존재 하에서, rTA는 테트라사이클린에 결합하고 TRE에는 결합하지 않아서, 감소된 유전자 발현을 초래할 것이다. 대조적으로, Tet-On 시스템에서, 역트랜스활성화인자(rtTA)는 테트라사이클린-의존적 리프레션에 중요한 아미노산 잔기의 돌연변이유발에 의해 생성되었고, rtTA는 TRE에서 결합하고, 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재 하에서 유전자 발현을 유도한다(Gossen et al., Science 268(5218):1766-1769 (1995)). 유도성 프로모터의 다른 예는, 예를 들어, AlcA, LexA 및 Cre를 포함한다.

[0278] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 제1 발현 카세트 전에 Kozak 공통 서열을 포함한다. Kozak 공통 서열은 대부분의 진핵 mRNA 전사체에서 단백질 번역 개시 부위로서 작용하고 리보솜 조립체 및 번역 개시를 매개하는 핵산 모티프이다. 일부 실시형태에서, Kozak 공통 서열은 서열번호 92에 제시된 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어지되, r은 퓨린(즉, a 또는 g): (gcc)gccrccatgg (서열번호 92)이다.

[0279] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 제2 발현 카세트 후에 우드척 간염 바이러스(WHV) 전사 후 조절 구성요소(WPRE)를 포함한다. WPRE는 전사될 때 발현을 향상시키는 3차 구조를 생성하는 DNA 서열이다. WPRE 서열은 바이러스 벡터에 의해 전달된 유전자의 발현을 증가시키기 위해 통상적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, WPRE 서열은 서열번호 93에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 93에 제시된 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이것으로 이루어진다:

```
aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcatcttctcctctgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgccaccactgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccgtgctggacaggggctcggtgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgctcctttccttggctgctcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcgggaccttccctccccgcggcctgctgccggctctgcggcctctccgcgtcttcgccttcgccttcagacgagtcggatctccctttggggccgctccccgc (서열번호 93).
```

[0280] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터는 숙주 세포, 예를 들어, 기재한 바와 같이 상동직접수선(HDR)-기반 접근에 의해 숙주 세포에서 명시된 좌위에 부위-직접 삽입(닉인)에 사용하기 위한 발현 카세트 및/또는 프로모터를 함유하는 단편에 직접하는 상동성 아암을 포함한다. 보통 적어도 발현 카세트를 함유하고 선택적으로 또한 프로모터를 함유하는 삽입될 다시스트론성 벡터의 단편은 표적 삽입 부위(즉, 좌측 상동성 아암(LHA) 및 우측 상동성 아암(RHA))의 바로 상류 및 하류의 상동성 서열에 직접될 것이다. 상동성 아암은 HDR에 대한 주형으로서 작용하도록 단편에 대한 표적 게놈 좌위에 대해 구체적으로 설계된다. 각각의 상동성 아암의 길이는 일반적으로 도입 중인 삽입의 크기에 따르며, 삽입이 클수록 더 긴 상동성 아암을 필요로 한다.

[0281] 일부 양상에서, 본 기술은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 다시스트론성 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0282] 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 일 실시형태에 따른 1개의 다시스트론성 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 2개 이상의 다시스트론성 벡터의 혼합물을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 2개 이상의 다시스트론성 벡터는 상이하고, 예를 들어, 관심의 상이한 단백질(예를 들어, 상이한 CAR)을 암호화하는 발현 카세트를 포함하며, 조성물은 숙주 세포의 이중성 집단을 생성하기 위해 형질감염 또는 형질도입을 위해 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 조성물은 2개의 다시스트론성 벡터를 포함할 수 있으며, 하나는 CD47 및 CD19 CAR을 암호화하고, 다른 하나는 CD47 및 CD22 CAR을 암호화한다.

[0283] 일부 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 보존제 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제"는 신체의 하나의 조직, 기관 또는 일부에서 신체의 다른 조직, 기관 또는 일부까지 관심 화합물을 운반 또는 수송하는데 관련된 약제학적으로 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭한다. 예를 들어, 담체 또는 부형제는 액체 또는 고체 충전제, 희석제,

부형제, 용매, 또는 캡슐화 물질 또는 이들의 일부 조합물일 수 있다. 담체 또는 부형제의 각 구성성분은 "약제학적으로 허용 가능"해야 하며, 즉, 제형의 다른 성분과 양립 가능하여야 한다. 또한 접할 수 있는 신체의 임의의 조직, 기관 또는 일부와의 접촉에 적합하여야 하는데, 이는 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성 또는 치료적 이점을 과도하게 초과하는 임의의 다른 합병증의 위험을 지니지 않아야 한다는 것을 의미한다. 적합한 부형제는 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 숙주 세포를 포함하는 조성물은 적합한 주입 매질을 더 포함한다.

[0284] 바이러스 및 이의 조성물

[0285] 일부 양상에서, 본 기술은 숙주 세포에 형질도입하기 위한 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 다시스 트론성 벡터를 포함하는 바이러스를 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 기술의 다시스 트론성 벡터는 바이러스의 형태로 또는 숙주 세포 형질도입을 위해 바이러스에 패키징될 수 있다. 바이러스는, 예를 들어, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 파지를 포함하는 숙주 세포에 형질도입하고 숙주 세포에 뉴클레오타이드 서열을 도입하는 데 적합한 임의의 유형의 바이러스일 수 있다.

[0286] 일부 양상에서, 본 기술은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따라 바이러스를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 일 실시형태에 따라 바이러스에 패키징된 다시스 트론성 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 2종 이상의 바이러스 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 제1 바이러스에 패키징된 제1 다시스 트론성 벡터 및 제2 바이러스에 패키징된 제2 다시스 트론성 벡터를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 실시형태에서, 2종 이상의 바이러스는 각각 서로 상이한 첫 번째에 패키징된 다시스 트론성 벡터를 갖고, 예를 들어, 관심의 상이한 단백질(예를 들어, 상이한 CAR)을 암호화하는 발현 카세트를 포함하고, 조성물은 이중성 집단을 생성하기 위해 숙주 세포를 형질도입하는 데 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 조성물은 2종의 바이러스를 포함할 수 있고, 하나는 CD47 및 CD19 CAR을 암호화하는 다시스 트론성 벡터를 포함하며, 다른 하나는 CD47 및 CD22 CAR을 암호화하는 다시스 트론성 벡터를 포함한다. 이어서, 조성물은 세포의 혼합물을 생성하기 위해 숙주 세포를 형질도입하는 데 사용될 수 있고, 일부는 CD47 및 CD19 CAR을 발현시키고, 일부는 CD47 및 CD22 CAR을 발현시키며, 일부는 CD47, CD19 CAR 및 CD22 CAR을 발현시킨다.

[0287] 숙주 세포, 및 이의 조성물을 생성하는 방법

[0288] 숙주 세포의 생성 방법

[0289] 일부 양상에서, 본 기술은 세포 요법에 대해 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따라 다시스 트론성 벡터를 포함하는 숙주 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다.

[0290] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 다시스 트론성 벡터, 또는 이를 포함하는 조성물 또는 바이러스를 입양 세포 요법에서 사용하기 위한 숙주 세포의 집단에 도입하는 단계를 포함한다. 숙주 세포는, 예를 들어, 바이러스 형질도입, 인산칼슘 형질감염, 지질-매개 형질감염, DEAE-텍스트란, 전기천공법, 미량주사법, 뉴클레오포레이션(nucleoporation), 리포좀, 나노입자, 또는 다른 방법을 포함하는, 당업계의 임의의 알려진 방법에 의해 다시스 트론성 벡터를 혼입시키도록 형질전환될 수 있다. 예를 들어, 기재된 바와 같은 바이러스 벡터 또는 바이러스 형태의 다시스 트론성 벡터는 숙주 세포의 집단을 형질도입하는 데 사용될 수 있다. 형질전환된 숙주 세포는 알려진 기법을 이용하여 수집 및/또는 선별될 수 있고, 다양한 하위집단 또는 이의 조합은 알려진 기법에 의해, 예컨대, 항체에 대한 친화도 결합, 유세포분석, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 또는 면역자기 선택(immunomagnetic selection)에 의해 풍부화 또는 고갈될 수 있다. 숙주 세포에 도입 후에, 다시스 트론성 벡터 또는 이의 단편은 무작위 삽입을 통해 또는 기재된 바와 같은 부위-지정 삽입(닉인)을 통해 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있다.

[0291] 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 집단은 세포에 혼입된 다시스 트론성 벡터를 갖는 집단에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포를 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 집단은 다시스 트론성 벡터에 의해 암호화된 관심의 1개 이상의 단백질을 발현시키는 집단에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포를 갖는다.

[0292] 특정 이들 실시형태에서, 상기 방법은 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 제2 다시스트론성 벡터, 또는 이를 함유하는 조성물 또는 바이러스를 숙주 세포 집단에 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다. 제2 다시스트론성 벡터, 또는 이를 함유하는 조성물 또는 바이러스를 도입하는 이런 단계는 제1 다시스트론성 벡터, 또는 이를 함유하는 조성물 또는 바이러스를 숙주 세포에 도입하는 단계와 동시에 또는 후에 일어날 수 있다. 이러한 실시형태에서, 제1 및 제2 다시스트론성 벡터는 상이할 수 있고, 예를 들어, 관심의 상이한 단백질(예를 들어, 상이한 CAR)을 암호화하는 발현 카세트를 함유하고, 생성된 숙주 세포는 이종성 집단일 수 있다. 비제한적 예로서, CD47 및 CD19 CAR을 암호화하는 제1 다시스트론성 벡터 및 CD47 및 CD22 CAR을 암호화하는 제2 다시스트론성 벡터는 이종성 집단을 생성하기 위해 숙주 세포를 형질전환시키도록 순차적으로 또는 조합하여 사용될 수 있으며, 일부 세포는 CD47 및 CD19 CAR을 발현시키고, 일부 세포는 CD47 및 CD22 CAR을 발현시키며, 일부 다른 세포는 CD47, CD19 및 CD22 CAR을 발현시킨다. 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 이종성 집단은 세포에 혼입된 제2 다시스트론성 벡터를 갖는 집단에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포를 갖는다. 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 이종성 집단은 제2 다시스트론성 벡터에 의해 암호화된 관심의 1종 이상의 단백질을 발현시키는 집단에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포를 갖는다. 특정 이들 실시형태에서, 상기 방법은 숙주 세포의 생성된 이종성 집단의 하위 집단을 분류 또는 분리시키는 단계를 더 포함할 수 있으며, 하위 집단에서 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포는 세포에 혼입된 제1 및 제2 다시스트론성 벡터를 둘 다 갖거나, 또는 하위 집단에서 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포는 제1 및 제2 다시스트론성 벡터 둘 다에 의해 암호화된 관심 단백질을 발현시킨다.

[0293] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본 기술의 다양한 실시형태에 따른 2종 이상의 다시스트론성 벡터의 혼합물 또는 조합물, 또는 이를 함유하는 조성물을 숙주 세포의 집단에 도입하는 단계를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 2종 이상의 다시스트론성 벡터는 상이할 수 있고, 예를 들어, 관심의 상이한 단백질(예를 들어, 상이한 CAR)을 암호화하는 발현 카세트를 함유하고, 생성된 숙주 세포는 이질적 집단일 수 있다. 다시스트론성 벡터의 혼합물은 바이러스 벡터 또는 바이러스의 혼합물 형태일 수 있다. 비제한적 예로서, 2개의 다시스트론성 벡터의 혼합물은 이종성 집단을 생성하기 위해 숙주 세포를 형질전환시키는 데 사용될 수 있으며, 하나는 CD47 및 CD19 CAR을 암호화하고 다른 하나는 CD47 및 CD22 CAR을 암호화하고, 일부 세포는 CD47 및 CD19 CAR을 발현시키고, 일부 세포는 CD47 및 CD22 CAR을 발현시키며, 일부 세포는 CD47, CD19 및 CD22 CAR을 발현시킨다. 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 이종성 집단은 세포에 혼입된 둘 이상의 다시스트론성 벡터 중 적어도 하나를 갖는 집단에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포를 갖는다. 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포의 이종성 집단은 둘 이상의 다시스트론성 벡터 중 적어도 하나에 의해 암호화된 관심의 단백질을 발현시키는 집단에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포를 갖는다. 특정 이들 실시형태에서, 상기 방법은 숙주 세포의 생성된 이종성 집단의 하위 집단을 분류 또는 분리시키는 단계를 더 포함할 수 있으며, 하위 집단에서 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포는 세포에 혼입된 둘 이상의 다시스트론성 벡터를 갖거나, 또는 하위 집단에서 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 100%의 숙주 세포는 둘 이상의 다시스트론성 벡터에 의해 암호화된 관심 단백질을 발현시킨다.

[0294] 임의의 이러한 실시형태에서, 상기 방법은 이러한 세포의 면역원성을 감소시키기 위해 숙주 세포의 추가 변형을 수행하는 단계를 더 포함할 수 있다. 세포 요법에서, 숙주 세포가 동종이계일 때, 즉, 수용자 이외의 사람으로부터 유래되었을 때, 수용자에 주입 후에 잠재적인 이식편대숙주 위험 또는 수용자의 선천성 면역계에 의해 제거될 위험을 감소시키기 위해 추가적인 변형이 필요하다. 일부 실시형태에서, 추가적인 변형은 숙주 세포에서

주조직적합 복합체(MHC) 클래스 I 및/또는 II(MHC I 및/또는 MHC II)의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. MHC I 및/또는 MHC II 분자를 변형시키는 이런 단계는 제1 다시스트론성 벡터 또는 이를 함유하는 조성물을 도입하는 단계, 및/또는 제2 다시스트론성 벡터 또는 이를 함유하는 조성물을 숙주 세포에 도입하는 단계 전에, 동시에 또는 후에 일어날 수 있다.

[0295] MHC I 및/또는 MHC II 유전자는 면역 세포에 항원성 펩타이드를 제시하도록 전문화된 세포 표면 분자를 암호화한다. 동종이계 세포에서 MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현은 수용자의 면역 세포에 의한 이러한 세포의 인식 및 그에 따른 이식물의 거부를 방지할 수 있다. 인간에서 MHC는 인간 백혈구 항원(HLA)으로 불린다. MHC I에 상응하는 클래스 I HLA(HLA I)는 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 유전자를 포함하고, MHC II에 상응하는 클래스 II HLA(HLA I)는 HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM 및 HLA-DO 유전자를 포함한다.

[0296] 일부 실시형태에서, 이러한 세포의 면역원성을 감소시키기 위한 숙주 세포의 추가적인 변형은, 예를 들어, CIITA, β_2 마이크로글로불린(B2M), NLRC5, CTLA-4, PD-1, HLA-A, HLA-BM, HLA-C, RFX-ANK, NFY-A, RFX5, RFX-AP, NFY-B, NFY-C, IRF1, MIC-A, MIC-B 및 TAP1을 포함하는 하나 이상의 면역 인자의 발현을 감소시키기 위해 세포를 유전자 변형시키는 것을 포함한다.

[0297] 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C와 같은 HLA 좌위 중 하나 이상을 개별적으로, 또는 HLA-Razor에 의해 총괄적으로 표적화 및 조절함으로써 MHC I 유전자의 발현이 감소되도록 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조절은, 예를 들어, 기재된 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템을 이용함으로써, HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C를 포함하는 HLA 좌위 중 하나 이상의 삽입-결실(indel) 변형을 통해 일어난다. 임의의 HLA 유전자의 발현을 조절함으로써(예를 들어, 감소 또는 결실시킴으로써), 세포는 낮은 면역원성이 제공되고 수용자 대상체에서 면역 반응을 유도하는 능력이 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 임의의 HLA 좌위의 감소된 발현은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 유전자 중 하나 이상의 발현을 감소 또는 제거한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, 임의의 HLA 좌위를 표적화하는 유전자 변형은 본 명세서에 개시된 실시형태에 따라, HLA 좌위에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 핵산(예를 들어, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편)을 삽입하는 것을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 임의의 HLA 좌위에 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 삽입은 HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C 녹아웃을 초래한다.

[0298] 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 B2M 좌위를 표적화 및 조절함으로써 MHC I 유전자의 발현이 감소되도록 변형될 수 있다. B2M 유전자는 MHC I 분자의 구성성분을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 변형은 B2M 좌위의 삽입-결실(indel) 변형을 통해, 예를 들어, 기재된 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템을 이용함으로써 일어난다. 따라서, B2M의 발현을 조절함으로써(예를 들어, 감소 또는 제거함으로써), MHC I 분자의 표면 수송은 차단되고, 세포는 낮은 면역원성을 제공하였다. 일부 실시형태에서, MHC I 유전자의 발현이 감소되도록 변형된 동종이계 숙주 세포는 수용자 대상체에서 면역 반응을 유도하는 능력을 갖는다. 일부 실시형태에서, B2M의 감소된 발현은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 유전자 중 하나 이상의 발현을 감소 또는 제거한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 B2M 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, B2M 좌위를 표적화하는 유전자 변형은 본 명세서에 개시된 실시형태에 따라, B2M 좌위에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 핵산(예를 들어, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편)을 삽입하는 것을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, B2M 좌위에 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 삽입은 B2M 녹아웃을 초래한다.

[0299] 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 TAP1 좌위를 표적화 및 조절함으로써 MHC I 유전자의 발현이 감소되도록 변형될 수 있다. TAP1 유전자에 의해 암호화된 TAP1은, 소포체(ER)에서 발견되고 세포 표면 상의 제시를 위해 MHC 클래스 I 단백질에 부착될 ER에 외래 유래의 펩타이드를 면역계에 수송하는 항원 가공(TAP) 복합체와 연관된 수송체를 형성하기 위해 TAP2 유전자에 의해 암호화된 TAP2와 조립된다. 일부 실시형태에서, 변형은 TAP1 좌위의 삽입-결실(indel) 변형을 통해, 예를 들어, 기재된 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템을 이용함으로써 일어난다. 따라서, TAP1의 발현을 조절함으로써(예를 들어, 감소 또는 제거함으로써), MHC I 분자의 표면 수송은 차단되고, 세포는 낮은 면역원성을 제공하였다. 일부 실시형태에서, TAP1의 감소된 발현은 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 유전자 중 하나 이상의 발현을 감소 또는 제거한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 TAP1 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, TAP1 좌위를 표적화하는 유전자 변형은 본 명세서에 개시된 실시형태에 따라, TAP1 좌위에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 핵산(예를 들어, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편)을 삽입하는 것을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, TAP1 좌위에 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 삽입은 TAP1 녹아웃을 초래한다.

- [0300] 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 CD74의 과발현에 의해 MHC II 유전자의 감소된 발현을 갖도록 변형될 수 있다.
- [0301] 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 클래스 II 트랜스작용인자(CIITA) 좌위를 표적화 및 조절함으로써 MHC II 유전자의 감소된 발현을 갖도록 변형될 수 있다. CIITA는 단백질의 뉴클레오타이드 결합 도메인(NBD) 류신-풍부 반복부(LRR) 패밀리의 구성원이고, MHC 인헨세오솜과 회합함으로써 MHC II의 전사를 조절한다. 일부 실시형태에서, 변형은 CIITA 좌위의 삽입-결실(indel) 변형을 통해, 예를 들어, 기재된 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템을 이용함으로써 일어난다. 일부 실시형태에서, CIITA의 감소된 발현은 HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM 및 HLA-DO 유전자 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 CIITA 녹아웃을 갖는다. 일부 실시형태에서, CIITA 좌위를 표적화하는 유전자 변형은 본 명세서에 개시된 실시형태에 따라, CIITA 좌위에서 본 명세서에 개시된 바와 같은 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 핵산(예를 들어, 다이스트론성 벡터 또는 이의 단편)을 삽입하는 것을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, CIITA 좌위에 다이스트론성 벡터 또는 이의 단편의 삽입은 CIITA 녹아웃을 초래한다.
- [0302] 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 좌위에서 유전자 변형을 갖거나, B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃을 갖거나, CD74 과발현을 갖는다. B2M, TAP1 및/또는 CIITA 녹아웃은 각 유전자 좌위 중 하나의 대립유전자에서, 또는 대립유전자 둘 다에서 일어날 수 있다. 일부 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포가 각각 B2M, TAP1 및/또는 CIITA의 발현을 감소시키거나 발현이 없도록, B2M, TAP1 및/또는 CIITA 좌위는 변형된다. 이러한 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 B2M, TAP1 및/또는 CIITA 결실 또는 CD74의 녹아웃 또는 과발현의 결과로서 MHC I 및/또는 MHC II의 감소된 발현 유전자(인간에서의 HLA I 및/또는 HLA II)를 갖는다.
- [0303] 특정 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 MIC-A의 유전자 변형을 갖는다. MIC-A는 알려진 아이소폼 및 변이체를 갖는 단백질이다(예를 들어, 2022년 7월 18일자로 등록된 UniProt Q29983 참조); MIC-A의 모든 이러한 형태는 본 명세서에 제공된 개시내용에 의해 포괄된다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 일어난다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표적화 서열 GATGACCCTGGCTCATATCA(서열번호 137)를 갖는 gRNA가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, CRISPR/Cas 시스템 및 gRNA 표적화 MIC-A에 의한, 예컨대 표적화 서열 GATGACCCTGGCTCATATCA (서열번호 137)에 의한 유전자 편집 방법은 숙주 세포와 같은 세포에서 MIC-A의 모든 대립유전자를 녹아웃시킨다.
- [0304] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 유전자 변형과 같은 변형을 포함하여, MIC-A 유전자를 표적화한다. 일부 실시형태에서, MIC-A 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 MICA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 1개의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템을 이용하는 것에 의한다.
- [0305] 일부 실시형태에서, 다이스트론성 벡터는 MIC-A 유전자에서 삽입된다.
- [0306] 특정 실시형태에서, 동종이계 숙주 세포는 MIC-B의 유전자 변형을 갖는다. MIC-B는 알려진 아이소폼 및 변이체를 갖는 단백질이다(예를 들어, 2022년 7월 18일자로 등록된 UniProt Q29980 참조); MIC-B의 모든 이러한 형태는 본 명세서에 제공된 개시내용에 의해 포괄된다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 일어난다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표적화 서열 GTTCTGCCTGTCATAGCGC(서열번호 138)를 갖는 gRNA가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, CRISPR/Cas 시스템 및 gRNA 표적화 MIC-B에 의한, 예컨대 표적화 서열 GTTCTGCCTGTCATAGCGC (서열번호 138)에 의한 유전자 편집 방법은 숙주 세포와 같은 세포에서 MIC-B의 모든 대립유전자를 녹아웃시킨다.
- [0307] 일부 실시형태에서, 조작된 세포는 유전자 변형과 같은 변형을 포함하여, MIC-B 유전자를 표적화한다. 일부 실시형태에서, MIC-B 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 MIC-B 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 1개의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템을 이용하는 것에 의한다.
- [0308] 일부 실시형태에서, 다이스트론성 벡터는 MIC-B 유전자에서 삽입된다.
- [0309] 숙주 세포
- [0310] 일부 양상에서, 본 기술은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 다이스트론성 벡터를 포함하는 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 숙주 세포, 예컨대 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 다능성 줄기 세포(PSC) 또는 이들로부터 유래된 세포의 집단을 제공한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 이중성

집단, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 상이한 다시스트론성 백터를 포함하는 세포의 혼합물일 수 있다.

[0311] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 T 세포, 예를 들어, 미경험 T 세포, 헬퍼 T 세포(CD4+), 세포독성 T 세포(CD8+), 조절 T 세포(Treg), 중심 기억 T 세포(T_{CM}), 효과기 기억 T 세포(T_{EM}), 줄기 세포 기억 T 세포(T_{SCM}), 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 관용원성 인자(예를 들어, CD47, HLA-E, HLA-G, PD-L1, CTLA-4), CAR(예를 들어, CD19 CAR, CD22 CAR, BCMA CAR) 및/또는 개시된 다양한 실시형태에 따른 다시스트론성 백터에 의해 암호화된 안전 스위치를 발현시킨다. 이러한 실시형태에서, 숙주 세포는 CAR이 표적화하도록 설계된 항원(예를 들어, CD19, CD22, BCMA)을 발현시키는 표적 세포에 대한 면역 반응을 인식하고 개시하고, 숙주 세포는 관용원성 인자의 발현으로 인한 동종이계 수용자에서 낮은 면역을 갖는다.

[0312] 일부 실시형태에서, T 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 T 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, T 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 T 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이들 실시형태 중 하나에서, T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 얻은 1차 T 세포일 수 있다. 다른 실시형태에서, 예를 들어, 동종이계 T 세포의 경우에, T 세포는 PSC, 예컨대, 배아 줄기 세포(ESC) 또는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로부터 유래되거나 분화될 수 있다.

[0313] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 NK 세포이다. NK 세포(거대 과립 림프구로도 정의됨)는 공통 림프구 조상세포(B 림프구 및 T 림프구로도 발생됨)로부터 분화된 세포 계통을 나타낸다. T-세포와 달리, NK 세포는 원형질막에서 CD3을 자연적으로 발현시키지 않는다. 중요하게는, NK 세포는 TCR을 발현시키지 않으며, 전형적으로 또한 다른 항원-특이적 세포 표면 수용체를 결여한다. NK 세포의 세포독성 활성화는 감작을 필요로 하지 않지만, IL-2를 포함하는 다양한 사이토카인에 의한 활성화에 의해 향상된다. NK 세포는 일반적으로 항원-수용체-매개 신호전달에 필요한 적절한 또는 완전한 신호전달 경로를 결여하는 것으로 여겨지고, 따라서 항원 수용체-의존적 신호전달, 활성화 및 확장을 가능하게 하는 것으로 여겨지지 않는다. NK 세포는 세포독성이고, 이들은 이들의 세포독성 활성을 조절하기 위해 활성화 및 저해 수용체 신호전달의 균형을 유지한다. 예를 들어, CD16을 발현시키는 NK 세포는 감염 세포에 결합된 항체의 Fc 도메인에 결합하여, NK 세포 활성화를 초래할 수 있다. 대조적으로, 활성화는 고수준의 MHC 클래스 I 단백질을 발현시키는 세포에 대해 감소된다. 표적 세포와 대조적으로, NK 세포는 퍼포린과 같은 단백질, 및 프로테아제(그랜자임)와 같은 효소를 방출한다. 퍼포린은 표적 세포의 세포막에서 기공을 형성하여, 세포자멸사 또는 세포 용해를 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 NK 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 NK 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이들 실시형태 중 하나에서, NK 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 얻은 1차 NK 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래되거나 분화될 수 있다. 다능성 줄기 세포(예를 들어, iPSC)로부터 NK 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있는 다수의 기법이 있다. 예를 들어, 문헌[Zhu et al., Methods Mol Biol. 2019; 2048:107-119; Knorr et al., Stem Cells Transl Med. 2013 2(4):274-83. doi: 10.5966/scrm.2012-0084; Zeng et al., Stem Cell Reports. 2017 Dec 12;9(6):1796-1812; Ni et al., Methods Mol Biol. 2013;1029:33-41; Bernareggi et al., Exp Hematol. 2019 71:13-23; Shankar et al., Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):234]을 포함하며, 이들 모두는 분화를 위한 방법 및 시약에 대해 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 그리고 구체적으로 인용된다. 분화는 CD56, KIRs, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, TRAIL, CD122, CD27, CD244, NK1.1, NKG2A/C, NCR1, Ly49, CD49b, CD11b, KLRG1, CD43, CD62L 및/또는 CD226을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 NK 세포 관련 및/또는 특이적 마커의 존재를 일반적으로 평가함으로써 당업계에서 공지된 바와 같이 분석될 수 있다.

[0314] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 NKT 세포이다. NKT 세포는 T 세포와 NK 세포 둘 다의 특성을 공유하는 T 세포의 이종성 그룹이다. 이들 세포 중 다수는 자기 및 외래 지질 및 당지질에 결합하는 항원-제시 분자인 비-다형성 CD1d 분자를 인식한다. 이들은 대략 1%의 모든 말초 혈액 T 세포만을 구성한다. 일부 실시형태에서, NKT 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 NKT 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, NKT 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 NKT 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이들 실시형태 중 하나에서, NKT 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 얻은 1차 NKT 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, NKT 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래되거나 분화될 수 있다.

- [0315] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는, 예를 들어, β 세포(베타 세포 또는 β 섬 세포로도 지칭됨)를 포함하는 췌장 섬 세포이다. 예시적인 췌장 섬 세포 유형은 췌장 섬 조상세포 세포, 미숙 췌장 섬 세포, 성숙 췌장 섬 세포 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 β 섬 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 β 섬 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이러한 실시형태 중 하나에서, β 섬 세포는 1차 β 섬 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래되거나 분화될 수 있다. 다능성 줄기 세포를 췌장 섬 세포를 분화시키기 위한 유용한 방법은, 예를 들어, US 9,683,215; US 9,157,062; 및 US 8,927,280에 개시되어 있다.
- [0316] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 방법에 의해 생성된 β 섬 세포는 인슐린을 분비한다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 내인성 췌장 섬 세포의 적어도 2개의 특징, 예를 들어, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 당 증가에 반응한 인슐린의 분비, 및 베타 세포 마커의 발현을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 β 섬 세포는 당뇨병을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. 예시적인 β 세포 마커 또는 β 세포 조상세포 마커는 c-펩타이드, Pdx1, 글루코스 수송체 2(Glut2), HNF6, VEGF, 글루코키나제(GCK), 프로호르몬 전환 효소(PC 1/3), Cdcpl, NeuroD, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.1, Nkx6.2, Pax4, Pax6, Ptf1a, Isl1, Sox9, Sox17 및 FoxA2를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, PSC는 I형 진성 당뇨병(T1DM)을 해결하기 위한 이식을 위해 베타-유사 세포 또는 섬 오가노이드로 분화된다. 세포계는 T1DM을 해결하기 위한 유망한 방법이며, 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 인용되는 문헌[Ellis et al., Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct;14(10):612-628]을 참조한다. 추가적으로, Pagliuca 등(Cell, 2014, 159(2):428-39)은 hiPSC로부터 β 세포의 성공적인 분화를 보고하며, 이의 내용은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 인용되고, 특히, 인간 다능성 줄기 세포로부터 기능성 인간 β 세포의 대규모 생산에 대해 개시된 방법 및 시약을 참조한다. 더 나아가, Vegas 등은 인간 다능성 줄기 세포로부터의 인간 β 세포의 생산 다음에 숙주에 의한 면역거부를 회피하기 위한 캡슐화를 나타낸다; (본 명세서에 전체가 참조에 의해 인용된 문헌[Vegas et al., Nat Med, 2016, 22(3):306-11], 특히 인간 다능성 줄기 세포로부터의 기능성 인간 β 세포의 대규모 생산을 위해 이에 개시된 방법 및 시약). 본 기술에서 사용하기 위한 췌장 β 섬 세포를 포함하는 췌장 섬 세포의 추가적인 개시내용은 W02020/018615에서 찾을 수 있으며, 이의 개시내용은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.
- [0317] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 1차 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 PSC, 예를 들어, ESC 또는 iPSC이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된 세포이다. ESC 및 iPSC는, 예를 들어, 뉴런, 성상교세포, 희소돌기 아교세포, 망막 상피 세포, 표피 세포, 모세포, 각질세포, 간세포, 췌장 β 섬 세포, 장상피 세포, 폐포세포, 조혈 세포, 내피 세포, 심근세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 신세포, 지방세포, 연골세포 및 골세포를 포함하는 임의의 신체 세포 유형으로 분화되는 능력을 갖는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 T 세포, NK 세포, 또는 NKT 세포이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 β 섬 세포 또는 신경아교 전구체 세포(GPC)이다.
- [0318] 숙주 세포 조성물
- [0319] 일부 양상에서, 본 기술은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 숙주 세포의 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0320] 일부 실시형태에서, 조성물은 적합한 투여 경로에 따라서 다양한 제형, 예를 들어, 주사 가능한 제형, 동결건조 제형, 액체 제형, 경구 제형 등을 가질 수 있다.
- [0321] 일부 실시형태에서, 조성물은 동일한 투약 단위로 공동 제형화될 수 있거나, 별개의 투약 단위로 개개로 제형화될 수 있다. 본 명세서의 용어 "용량 단위" 및 "투약량 단위"는 치료 효과를 제공하기 위한 단일 투여에 적합한 치료제의 양을 함유하는 조성물의 부분을 지칭한다. 이러한 투약량 단위는 1일당 1 내지 복수회(즉, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 4, 또는 1 내지 2회), 또는 치료 반응을 유발하는 데 필요하다면 다수 회 투여될 수 있다.
- [0322] 일부 실시형태에서, 단일 투약 단위는 적어도 약 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} 또는 5×10^{10} 개의 세포를 포함한다.
- [0323] 숙주 세포에서의 다িস트론성 벡터의 삽입

[0324] 일부 양상에서, 본 기술의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편은 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있다. 특정 실시 형태에서 이 통합을 수행하기 위한 방법 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 해당 실시형태에서, 다시스트론성 벡터의 단편이 게놈에 통합되며, 상기 단편은 적어도 관심 이식유전자(들)(예를 들어, 관용원성 인자, CAR 및/또는 안전 스위치)를 포함하는 발현 카세트를 포함하고, 선택적으로 프로모터(들)를 포함할 수 있다.

[0325] 무작위 삽입

[0326] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편은 숙주 세포의 무작위 게놈 좌위에 삽입된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터는 유전자 물질을 숙주 세포에 전달하기 위해 통상적으로 사용되고, 외래 또는 외인성 유전자를 숙주 세포 게놈에 무작위로 삽입하여 유전자의 안정한 발현 및 복제를 촉진시킨다.

[0327] 부위-지정 삽입(닉인)

[0328] 일부 실시형태에서, 본 기술의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편은 숙주 세포의 특정 게놈 좌위에 삽입된다. 다수의 유전자 편집 방법은 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편을 선택된 특정 게놈 좌위에 삽입하는 데 사용될 수 있다. 유전자 편집은 뉴클레오타이드 서열이 살아있는 유기체의 게놈에서 삽입, 결실, 변형 또는 대체될 수 있는 유전자 조작의 유형이다. 현재의 유전자 편집 기법은 일반적으로 DNA에서 이중-가닥 파손(double-strand break: DSB)을 수선하기 위해 세포에 대한 선천적 메커니즘을 이용한다.

[0329] 진핵 세포는 2가지 주요 수선 경로에 의해 DSB를 수선한다: 비상동 말단 접합(NHEJ) 및 상동 유도 수선(HDR). HDR은 전형적으로 자매염색분체가 수선 주형으로서 작용하도록 이용 가능할 때 후기 S기 또는 G2기 동안 일어난다. NHEJ는 더 통상적이고, 세포 주기의 임의의 단계 동안 일어날 수 있지만, 이는 더 오류를 유발하는 경향이 있다. 유전자 편집에서, NHEJ는 일반적으로, 오픈 리딩 프레임(ORF)을 이동시키고 암호화 영역 또는 회합된 조절 영역에서 변형을 생성함으로써 표적 유전자에서의 표적화된 기능상실을 생산할 수 있는, 삽입/결실 돌연변이(indel)를 생산하는 데 사용된다. 다른 한편으로, HDR은 상동성 서열을 갖는 수선 주형의 존재 하에 특정 돌연변이의 표적화된 닉인, 닉아웃 또는 삽입을 생산하기 위한 바람직한 경로이다. 여러 방법은, 예를 들어, 화학적 조절(예를 들어, NHEJ 경로에서 중요한 효소의 저해제로 세포를 치료); 세포 주기의 S 및 G2기에서 유전자 편집의 시기 적절한 전달; S 및 G2기에서의 세포 주기 저지; 및 상동성 서열을 갖는 수선 주형의 도입을 포함하는, HDR 효율을 개선시키는 것으로 당업자에게 알려져 있다. 본 명세서에 제공된 방법은 HDR-매개 수선, NHEJ-매개 수선, 프라임 편집 또는 이들의 조합을 이용할 수 있다.

[0330] 프라임 편집은 조작된 역전사효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas9 엔도뉴클레아제를 이용하여 특정된 DNA 부위에 새로운 유전자 정보를 직접 작성하고, 표적 부위를 구체화하고 목적하는 편집을 암호화하는 프라임 편집 가이드 RNA(pegRNA)에 의해 프로그래밍된, 다재다능하고 정확한 게놈 편집 방법이다. 예를 들어, 문헌[Anzalone et al., Nature, 576:149-157 (2019); WO2021072328; WO2022067130]을 참조하며, 이들 모두는 본 명세서에 이들의 전문이 참조에 의해 인용된다.

[0331] 일부 실시형태에서, 부위-지정 삽입을 위한 본 명세서에 제공된 방법은, 예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성체-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 트랜스포사제, 및 주기적으로 간격을 띄고 분포하는 짧은 회문구조 반복부(CRISPR)/Cas 시스템을 포함하는, 부위-지정 뉴클레아제를 이용한다. 일부 실시형태에서, 부위-지정 삽입은 프라임 편집 또는 미스매치 수선-기반 삽입을 통한다.

[0332] ZFN

[0333] ZFN은 박테리아 FokI 제한 효소의 엔도뉴클레아제 도메인에 부착된 아연 핑거-함유 전사 인자에 적합한 다수의 부위-특이적 DNA 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. ZFN은 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상)의 DNA 결합 도메인 또는 아연 핑거 도메인을 가질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160] 참조. 각각의 아연 핑거 도메인은 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이고, 보통 3- 내지 4-bp DNA 서열을 인식한다. 따라서, 탠덤 도메인은 세포 게놈 내에서 고유한 연장된 뉴클레오타이드 서열에 잠재적으로 결합할 수 있다.

[0334] 알려진 특이성의 다양한 아연 핑거는 약 6, 9, 12, 15 또는 18-bp 서열을 인식하는 다중 핑거 폴리펩타이드를 생성하도록 조합될 수 있다. 다양한 선택 및 모듈 조립 기법은 파지 디스플레이, 효모 1-혼성체 시스템, 박테리

아 1-혼성체 및 2-혼성체 시스템, 및 포유류 세포를 포함하는 특정 서열을 인식하는 아연 핑거(및 이들의 조합)를 생성하는 데 사용될 수 있다. 아연 핑거는 사전 결정된 핵산 서열을 결합하도록 조작될 수 있다. 사전 결정된 핵산 서열에 결합하도록 아연 핑거를 조작하는 기준은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Sera et al., *Biochemistry* (2002) 41:7074-7081; Liu et al., *Bioinformatics* (2008) 24:1850-1857] 참조.

[0335] FokI 뉴클레아제 도메인 또는 다른 이량체 뉴클레아제 도메인을 포함하는 ZFN은 이량체로 작용한다. 따라서, ZFN의 쌍은 비-회문구조 DNA 부위를 표적화하는 데 필요하다. 2개의 개개 ZFN은 적절하게 이격된 이들의 뉴클레아제에 의해 DNA의 반대 가닥과 결합하여야 한다. 문헌[Bitinaite et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:10570-10575] 참조. 게놈 내 특정 부위를 절단하기 위해, ZFN의 쌍은 부위에 축적하는 2개의 서열을 인식하도록 설계되며, 하나는 정방향 가닥 상에 있고, 다른 하나는 역방향 가닥 상에 있다. 부위의 측면 중 하나 상에서 ZFN의 결합 시, 뉴클레아제 도메인은 부위에서 DNA를 이량체화 및 절단하여, 5' 돌출부가 있는 DSB를 생성한다. 이어서, HDR은 상동성 아암에 의해 축적되는 목적하는 돌연변이를 포함하는 수선 주형을 사용하여 특정 돌연변이를 도입하는 데 이용될 수 있다. 수선 주형은 보통 세포에 도입된 외인성 이중 가닥 DNA 벡터이다. 문헌[Miller et al., *Nat. Biotechnol.* (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., *Nat. Biotechnol.* (2011) 29:731-734] 참조.

[0336] TALEN

[0337] TALEN은 표적 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제의 다른 예이다. TALEN은 연장된 DNA 서열에 결합하고 인식하는 10 내지 30개의 반복부를 갖는 탠덤 어레이를 보통 포함하는, TALE 반복부로 지칭되는 DNA 결합 도메인으로부터 유래된다. 각 반복부는 33 내지 35개의 아미노산 길이며, 2개의 인접한 아미노산(반복부-가변 2-잔기 또는 RVD로 지칭됨)은 4개의 DNA 염기쌍 중 하나에 특이성을 부여한다. 따라서, 표적 DNA 서열에서 반복부와 염기쌍 사이에서 1 대 1의 대응이 있다.

[0338] TALEN은 1개 이상의 TALE DNA 결합 도메인(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의)을 뉴클레아제 도메인, 예를 들어, FokI 엔도뉴클레아제 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생성된다. 문헌[Zhang, *Nature Biotech.* (2011) 29:149-153] 참조. FokI에 대한 여러 돌연변이는 TALEN에서의 이의 용도에 대해 생성되었고; 이들은, 예를 들어, 절단 특이성 또는 활성을 개선시킨다. 문헌[Cermak et al., *Nucl. Acids Res.* (2011) 39:e82; Miller et al., *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., *Nature Biotech.* (2011) 29:731-734; Wood et al., *Science* (2011) 333:307; Doyon et al., *Nature Methods* (2010) 8:74-79; Szczepek et al., *Nature Biotech* (2007) 25:786-793; Guo et al., *J. Mol. Biol.* (2010) 200:96] 참조. FokI 도메인은 이량체로서 작용하여, 적절한 배향 및 이격을 갖는 표적 게놈에서 부위에 대해 고유 DNA 결합 도메인을 갖는 2개의 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 뉴클레아제 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수와 2개의 개개 TALEN 결합 부위 사이의 염기의 수는 모두 고수준의 활성을 달성하기 위한 중요한 파라미터인 것으로 나타난다. 문헌[Miller et al., *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148] 참조.

[0339] 조작된 TALE 반복부를 뉴클레아제 도메인을 조합함으로써, 임의의 목적하는 DNA 서열에 특이적인 부위-특이적 뉴클레아제가 생성될 수 있다. ZFN과 유사하게, TALEN은 게놈에서 목적하는 표적 부위에서 DSB를 생성하기 위해 세포에 도입될 수 있고, 따라서 유사한, HDR-매개 경로에서 유전자를 꺼내어하거나 돌연변이를 억제하는 데 사용될 수 있다. 문헌[Boch, *Nature Biotech.* (2011) 29:135-136; Boch et al., *Science* (2009) 326:1509-1512; Moscou et al., *Science* (2009) 326:3501] 참조.

[0340] 메가뉴클레아제

[0341] 메가뉴클레아제는 거대 DNA 서열(14 내지 40개의 염기쌍)을 인식하고 절단하는 이들의 능력을 특징으로 하는 엔도뉴클레아제 패밀리의 효소이다. 메가뉴클레아제는 뉴클레아제 활성 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 이들의 구조 모티프에 기반하여 패밀리로 그룹화된다. 가장 널리 퍼져있고 가장 잘 알려진 메가뉴클레아제는 LAGLIDADG 패밀리의 단백질이며, 보존된 아미노산 서열을 따라 명명된다. 문헌[Chevalier et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18): 3757-3774] 참조. 다른 한편으로, GIY-YIG 패밀리는 GIY-YIG 분자를 갖는데, 이는 70 내지 100개의 잔기 길이이고 4개의 비변이체 잔기를 갖는 4 또는 5개의 보존된 서열 모티프를 포함하고, 이 중 둘은 활성에 필요하다. 문헌[Van Roey et al., *Nature Struct. Biol.* (2002) 9:806-811] 참조. His-Cys 패밀리는 메가뉴클레아제는 수백개의 아미노산 잔기를 포괄하는 영역에 걸쳐 고도로 보존된 일련의 히스티딘 및 시스테인을 특징으로 한다. 문헌[Chevalier et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774] 참조. NHN 패밀리의 구성원은 아스파라긴 잔기에 의해 둘러싸인 보존된 히스티딘의 2개의 쌍을 포함하는 모티프로 정해진다. 문헌[Chevalier et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774] 참조.

- [0342] 높은 특이성 요건으로 인해 특정 표적 DNA 서열에 대한 자연적 메가뉴클레아제를 확인할 가능성이 낮기 때문에, 고유한 서열을 인식하는 메가뉴클레아제 변이체를 생성하기 위해 돌연변이유발 및 고속대량 선별 방법을 포함한 다양한 방법이 사용되었다. 예를 들어, 사전 결정된 핵산 서열에 결합하기 위해 변경된 DNA-결합 특이성을 갖는 메가뉴클레아제를 조작하기 위한 전략은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Chevalier et al., *Mol. Cell.* (2002) 10:895-905; Epinat et al., *Nucleic Acids Res* (2003) 31:2952-2962; Silva et al., *J Mol. Biol.* (2006) 361:744-754; Seligman et al., *Nucleic Acids Res* (2002) 30:3870-3879; Sussman et al., *J Mol Biol* (2004) 342:31-41; Doyon et al., *J Am Chem Soc* (2006) 128:2477-2484; Chen et al., *Protein Eng Des Sel* (2009) 22:249-256; Arnould et al., *J Mol Biol.* (2006) 355:443-458; Smith et al., *Nucleic Acids Res.* (2006) 363(2):283-294] 참조.
- [0343] ZFN 및 TALEN과 같이, 메가뉴클레아제는 게놈 DNA에서 DSB를 생성할 수 있는데, 이는, 예를 들어, NHEJ를 통해 부적절하게 수선되는 경우 틀-이동 돌연변이를 생성하여, 세포 내 표적 유전자의 발현 감소로 이어질 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 메가뉴클레아제와 함께 세포에 도입될 수 있다. 외래 DNA의 서열 및 염색체 서열에 따라서, 이 과정은 표적 유전자를 변형시키는 데 사용될 수 있다. 문헌[Silva et al., *Current Gene Therapy* (2011) 11:11-27] 참조.
- [0344] 트랜스포사제
- [0345] 트랜스포사제는 트랜스포존의 단부에 결합하고, 잘라 붙이기 메커니즘 또는 복제 전위 메커니즘에 의해 게놈의 다른 부분으로의 이의 움직임을 촉진시키는 효소이다. CRISPR/Cas 시스템과 같은 다른 시스템에 트랜스포사제를 연결함으로써, 게놈 DNA의 부위 특이적 삽입 또는 조작을 가능하게 하기 위해 새로운 유전자 편집 도구가 개발될 수 있다. 촉매적 비활성 Cas 효소가 단백질 및 Tn7-유사 트랜스포존을 사용하는 트랜스포존을 이용하는 2가지의 알려진 DNA 통합 방법이 있다. 트랜스포사제-의존적 DNA 통합은 게놈에서 DSB를 유발하지 않으며, 이는 더 안전하고 더 특이적인 DNA 통합을 보장할 수 있다.
- [0346] CRISPR/Cas
- [0347] CRISPR 시스템은 획득 면역의 형태를 제공하는 침입 파지 및 플라스미드에 대한 방어에 관련된 시스템으로서 원핵 유기체(예를 들어, 박테리아 및 고세균)에서 본래 발견되었다. 이제, 이는 연구 및 임상 적용에서 인기있는 유전자 편집 도구로서 적용되고 사용되고 있다.
- [0348] CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 적어도 2개의 구성성분: 하나 이상의 가이드 RNA(gRNA) 및 Cas 단백질을 포함한다. Cas 단백질은 DSB를 표적 부위에 도입하는 뉴클레아제이다. CRISPR-Cas 시스템은 2가지 주요 부류에 속한다: 클래스 1 시스템은 다중 Cas 단백질의 복합체를 사용하여 핵산을 분해하고; 클래스 2 시스템은 동일한 목적을 위해 단일의 거대한 Cas 단백질을 사용한다. 클래스 1은 I, III 및 IV형으로 나누어지고; 클래스 2는 II, V 및 VI로 나뉘어진다. 유전자 편집 적용에 적합한 상이한 Cas 단백질은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3 및 Mad7을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Jinek et al., *Science* (2012) 337 (6096):816-821; Dang et al., *Genome Biology* (2015) 16:280; Ran et al., *Nature* (2015) 520:186-191; Zetsche et al., *Cell* (2015) 163:759-771; Strecker et al., *Nature Comm.* (2019) 10:212; Yan et al., *Science* (2019) 363:88-91]을 참조한다. 가장 널리 사용되는 Cas9는 II형 Cas 단백질이고, 본 명세서에 예시로서 기재되어 있다. 이들 Cas 단백질은 상이한 공급원 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas9는 스트렙토코커스 피오게네스(*S. pyogenes*) 또는 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*)로부터 유래될 수 있다.
- [0349] 본래의 미생물 게놈에서, II형 CRISPR 시스템은 숙주 게놈 내에서 어레이로서 암호화된 CRISPR 반복부 서열 사이에 침범 DNA로부터의 서열을 혼입한다. CRISPR 반복부 어레이로부터의 전사체는 "프로토스페이서" 서열뿐만 아니라 CRISPR 반복부의 부분으로 알려진 침윤 DNA로부터 전사된 가변 서열을 각각 보유하는 CRISPR RNA(crRNA)로 가공된다. 각각의 crRNA는 제2 전사활성 CRISPR RNA(tracrRNA)와 혼성화하고, 이들 두 RNA는 Cas9 뉴클레아제와 복합체를 형성한다. crRNA의 프로토스페이서-암호화된 부분은 Cas9 복합체가 상보성 표적 DNA 서열을 절단하도록 지시하며, 단, 이들은 "프로토스페이서 인접 모티프"(PAM)로서 알려진 짧은 서열에 인접한다.
- [0350] 앞서 언급한 설명은 Cas9 뉴클레아제에 중점을 두었지만, 일부 방법에서 이 지점에 대해 기재된 것과 상이한 gRNA를 이용하는 다른 RNA-가이드 뉴클레아제가 존재한다는 것이 인식되어야 한다. 예를 들어, Cpf1(프레보텔라

(Prevotella) 및 프란시셀라 1(Franciscella 1)로부터의 CRISPR; Cas12a로도 알려짐)은 crRNA만을 필요로 하며 tracrRNA가 작용할 필요가 없는 RNA-가이드 뉴클레아제이다.

[0351] 이의 발견 이후로, CRISPR 시스템은 박테리아로부터 인간 세포를 포함하는 진핵 세포까지 걸쳐있는 매우 다양한 세포 및 유기체에서 서열 특이적 DSB 및 표적화된 게놈 편집을 유도하는 데 적합하게 되었다. 유전자 편집 적용 분야에서의 이의 용도에서, 인공적으로 설계된, 합성 gRNA는 특정 실시형태에서 단일 gRNA를 통한 것을 비롯하여, 본래의 crRNA:tracrRNA 복합체를 대체하였다. 예를 들어, gRNA는 crRNA, 테트라루프 및 tracrRNA로 구성된 단일 가이드 RNA(sgRNA)일 수 있다. crRNA는 보통 관심의 표적 DNA를 인식하도록 사용자-설계된 상보성 영역(스페이서로도 불리며, 보통 약 20개의 뉴클레오타이드 길이임)을 포함한다. tracrRNA 서열은 Cas 뉴클레아제 결합에 대한 스캐폴드 영역을 포함한다. crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 테트라루프에 의해 연결되고, 각각은 서로 혼성화를 위해 짧은 반복부 서열을 갖고, 따라서, 키메라 sgRNA를 생성한다. gRNA에 존재하는 스페이서 또는 상보성 영역 서열을 간단히 변화시킴으로써 Cas 뉴클레아제의 게놈 표적을 변화시킬 수 있다. 상보성 영역은 표준 RNA-DNA 상보성 염기쌍 형성 규칙을 통해 Cas 뉴클레아제를 표적 DNA로 향하게 할 것이다.

[0352] Cas 뉴클레아제가 작용하도록, 게놈 DNA에서 표적 서열 바로 하류에 PAM이 있어야 한다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 게놈 서열을 탈안정화시켜, gRNA에 의한 서열의 절의를 가능하게 하고 매칭 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 짝짓기를 초래하는 것으로 여겨진다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 다르다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스로부터 유래된 가장 통상적으로 사용되는 Cas9 뉴클레아제는 5'-NGG-3' 또는 덜 효율적인 비율로, "N"이 임의의 뉴클레오타이드일 수 있는 경우 5'-NAG-3'의 PAM 서열을 인식한다. 대안의 PAM을 갖는 다른 Cas 뉴클레아제 변이체가 또한 특성규명되었고, 아래의 표 17에 요약된 게놈 편집을 위해 성공적으로 사용된다.

표 17

예시적인 Cas 뉴클레아제 변이체 및 이들의 PAM 서열

CRISPR 뉴클레아제	공급원 유기체	PAM 서열 (5'→3')
SpCas9	스트렙토코커스 피오게네스 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	ngg 또는 nag
SaCas9	스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ngrrt 또는 ngrrn
NmeCas9	네이세리아 메닝기티디스 (<i>Neisseria meningitidis</i>)	nnnngatt
CjCas9	캠필로박터 제주니 (<i>Campylobacter jejuni</i>)	nnnnryac
StCas9	스트렙토코커스 써모필러스 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	nnagaaw
TdCas9	트레포네마 덴티콜라 (<i>Treponema denticola</i>)	naaaac
LbCas12a (Cpf1)	라크노스피라세아 박테리움 (<i>Lachnospiraceae bacterium</i>)	tttv
AsCas12a (Cpf1)	아시다미노코커스 종 (<i>Acidaminococcus sp.</i>)	tttv
AacCas12b	알리사이클로바실러스 아시다필러스 (<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>)	ttn
BhCas12b v4	바실러스 히사시 (<i>Bacillus hisashii</i>)	attn, tttn 또는 gttn

r=a 또는 g; y=c 또는 t; w=a 또는 t; v=a 또는 c 또는 g; n= 임의의 염기

[0353]

[0354] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 이들의 활성, 특이성, 인식 및/또는 다른 특징을 변경시키기 위해 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, Cas 뉴클레아제는 비표적(off-target) 효과를 완화시키기 위해 이의 충실도를 변경시키는 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 SpCas9의 evoSpCas9 고충실도 변이체)를 가질 수 있다. 다른 예에 대해, Cas 뉴클레아제는 이의 PAM 특이성을 변경시키는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

- [0355] 특정 실시형태에서, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편은 기재된 바와 같은 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)과 연관된 HDR을 통해 표적 부위에 통합될 DNA 수선 주형으로서 작용할 수 있다. 일반적으로, 삽입될 다시스트론성 벡터의 단편은 관심의 이식유전자(예를 들어, 관용원성 인자, CAR 및/또는 안전 스위치 발현 카세트)를 포함하는 발현 카세트를 적어도 포함하고, 선택적으로 또한 프로모터를 포함할 것이다. 특정 이들 실시형태에서, 삽입될 발현 카세트 및/또는 프로모터를 포함하는 단편은 표적의 바로 상류 및 하류의 상동성 서열, 즉, 표적 게놈 좌위가 HDR에 대한 주형으로서 작용하도록 특이적으로 설계된 좌측 상동성 아암(LHA) 및 우측 상동성 아암(RHA)에 축적될 것이다. 각각의 상동성 아암의 길이는 일반적으로 도입 중인 삽입의 크기에 따르며, 삽입이 클수록 더 긴 상동성 아암을 필요로 한다.
- [0356] 일부 실시형태에서, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 부위-지정 삽입을 위한 특정 게놈 좌위는 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위 및 안전 항만 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 안전 항만 좌위의 비제한적 예는 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 유전자 좌위를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 벡터 또는 이의 단편은, 예를 들어, 인트론, 엑손 및/또는 유전자 암호 영역(암호화 서열 또는 "CDS"로도 알려짐)을 포함하는 안전 항만 좌위의 적합한 영역에 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 안전 항만 좌위는 AAVS1 좌위, CCR5 좌위 및 CLYBL 좌위로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 삽입은 특정 게놈 좌위의 하나의 대립유전자에서 일어난다. 일부 실시형태에서, 삽입은 특정 게놈 좌위의 대립유전자 둘 다에서 일어난다. 이들 실시형태 중 하나에서, 표적 게놈 좌위에 삽입된 이식유전자의 배향은 해당 좌위에서 유전자의 방향과 동일하거나 반대일 수 있다. 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 게놈 좌위에 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 삽입은 내인성 유전자의 녹아웃(KO)을 초래한다.
- [0357] 일부 실시형태에서, 기재된 바와 같은 임의의 유전자 편집 시스템에 의해 변형된 게놈 좌위를 갖는 숙주 세포 또는 이의 구성물이 제공된다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR-관련 트랜스포사제로 이루어진 군으로부터 선택된 부위-지정 뉴클레아제를 이용하는 것에 의한다. 특정 이들 실시형태에서, 변형된 게놈 좌위는 B2M 좌위, TAP1 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위 또는 안전 항만 좌위이다. 안전 항만 좌위의 비제한적 예는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 유전자 좌위를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 기재된 바와 같은 게놈 좌위에 변형(예를 들어, 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 삽입)으로 인해 내인성 유전자 KO를 갖는다.
- [0358] 유전자 편집에 대한 가이드 RNA(gRNA)
- [0359] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편의 부위-지정 삽입에서, 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템과 함께 사용하기 위한 gRNA가 제공된다. gRNA는 crRNA 서열을 포함하고, 이는 결국 관심의 상보성 표적 DNA를 인식하고 이에 결합하는 상보성 영역(스페이서로도 불림)을 포함한다. 스페이서 또는 상보성 영역의 길이는 일반적으로 15 내지 30개의 뉴클레오타이드, 보통 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이지만, 특정 CRISPR/Cas 시스템의 필요에 기반하여 다를 것이다. 특정 실시형태에서, 스페이서 또는 상보성 영역은 표적 DNA 서열에 완전히 상보성이다. 다른 실시형태에서, 스페이서는 표적 DNA에 부분적으로 상보성, 예를 들어 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 상보성이다.
- [0360] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 gRNA는 뉴클레아제에 대한 결합을 위한 스캐폴드 영역을 포함하는 tracrRNA 서열을 추가로 포함한다. tracrRNA의 길이 및/또는 서열은 편집을 위해 사용 중인 특정 뉴클레아제에 따라 다를 수 있다. 특정 실시형태에서, gRNA에 의한 뉴클레아제 결합은 tracrRNA 서열을 필요로 하지 않는다. gRNA가 tracrRNA를 포함하는 해당 실시형태에서, crRNA 서열은 tracrRNA의 상보성 서열과 혼성화를 위한 반복부 영역을 추가로 포함할 수 있다.
- [0361] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 gRNA는 둘 이상의 gRNA 분자, 예를 들어, 2개의 별개의 분자로서 crRNA 및 tracrRNA를 포함한다. 다른 실시형태에서, gRNA는 단일 RNA 분자 상에 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 sgRNA를 포함하는, 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 특정 이들 실시형태에서, crRNA 및 tracrRNA는 개재 테트라루프에 의해 연결된다.

- [0362] 일부 실시형태에서, 하나의 gRNA는 관심의 유전자 좌위의 표적화된 편집을 위해 부위-지정 뉴클레아제와 공동으로 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 관심의 동일한 유전자 좌위를 표적화하는 둘 이상의 gRNA는 부위-지정 뉴클레아제와 공동으로 사용될 수 있다.
- [0363] 일부 실시형태에서, Cas9 및 Cas12b(C2c1)를 비롯하여 crRNA와 tracrRNA를 둘 다 필요로 하는 다양한 통상적인 Cas 뉴클레아제와 함께 사용하기 위한 예시적인 gRNA(예를 들어, sgRNA)는 **표 18**에 제공된다. 예를 들어, 문헌 [Jinek et al., *Science* (2012) 337 (6096):816-821; Dang et al., *Genome Biology* (2015) 16:280; Ran et al., *Nature* (2015) 520:186-191; Strecker et al., *Nature Comm.* (2019) 10:212]을 참조한다. 각각의 예시적인 gRNA의 경우, 상보성 영역 또는 스페이서, crRNA 반복부 영역, 테트라루프 및 tracrRNA를 포함하는, gRNA의 상이한 부분에 대한 서열이 나타난다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 94 내지 97에 제시된 뉴클레오타이드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 98 내지 101에 제시된 뉴클레오타이드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 102 내지 105에 제시된 뉴클레오타이드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 106 내지 109에 제시된 뉴클레오타이드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다.
- [0364] 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 95, 서열번호 99, 서열번호 103, 또는 서열번호 108에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 crRNA 반복부 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 96 또는 서열번호 107에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 테트라루프를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 97, 서열번호 101, 서열번호 105, 또는 서열번호 106에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 tracrRNA를 포함한다.

상의 gRNA 및 Cas 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터 내에 포함된다.

[0367] 일부 실시형태에서, 이식유전자의 부위-지정 삽입을 위해 사용되는 gRNA는 AAVS1에서 표적 서열을 인식하는 상보성 영역을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 표적 서열은 AAVS1의 인트론 1에 위치된다. AAVS1은 염색체 19에 위치되며: 55,090,918 내지 55,117,637 역가닥, 및 AAVS1 인트론 1(전사체 ENSG00000125503에 기반)은 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796 역가닥에 위치된다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796에서 어디에나 위치되는 부위의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 좌위를 표적화한다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내의 또는 500 bp 이내의 게놈 좌위를 표적화한다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674에서 또는 염색체 19: 55,115,674의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 뉴클레오타이드 내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 실시형태에서, gRNA는 문헌[Li et al., Nat. Methods 16:866-869 (2019)]에 기재된 "sgAAVS1-1"로도 알려진 GET000046이다. 이 gRNA는 서열번호 110에 제시된 핵산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이루어지는 상보성 영역을 포함하고, AAVS1의 인트론 1(PPP1R12C로도 알려짐)을 표적화 한다.

[0368] 일부 실시형태에서, 이식유전자의 부위-지정 삽입을 위해 사용되는 gRNA는 CLYBL에서 표적 서열을 인식하는 상보성 영역을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 표적 서열은 CLYBL의 인트론 2에 위치된다. CLYBL은 염색체 13: 99,606,669 내지 99,897,134 정방향 가닥에 위치되고, CLYBL 인트론 2(전사체 ENST00000376355.7에 기반함)는 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860 정방향 가닥에 위치된다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860에서 어디에나 위치되는 부위의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 좌위를 표적화한다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 13: 99,822,980의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내의 또는 500 bp 이내의 게놈 좌위를 표적화한다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 13: 99,822,980에서 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 뉴클레오타이드 이내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 실시형태에서, gRNA는 서열번호 111에 제시된 핵산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이루어진 상보성 영역을 포함하고 CLYBL의 인트론 2를 표적화하는 GET000047이다. 표적 부위는 문헌[Cerbini et al., PLoS One, 10(1): e0116032 (2015)]에 기재된 바와 같이 TALEN의 표적 부위와 유사하다.

[0369] 일부 실시형태에서, 이식유전자의 부위-지정 삽입을 위해 사용되는 gRNA는 CCR5에서 표적 서열을 인식하는 상보성 영역을 포함한다. 특정 이들 실시형태에서, 표적 서열은 CCR5의 엑손 3에 위치된다. CCR5는 염색체 3: 46,370,854 내지 46,376,206 정방향 가닥에 위치되고, CCR5 엑손 3(전사체 ENST00000292303.4에 기반함)은 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206 정방향 가닥에 위치된다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206에서 어디에나 위치되는 부위의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 좌위를 표적화한다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 3: 46,373,180의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내의 또는 500 bp 이내의 게놈 좌위를 표적화한다. 특정 실시형태에서, gRNA는 염색체 3: 46,373,180에서 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 뉴클레오타이드 내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 실시형태에서, gRNA는 문헌[Mandal et al., Cell Stem Cell 15:643-652 (2014)]에 기재된 "crCCR5_D"로도 알려진 GET000048이다. 이 gRNA는 서열번호 112에 제시된 핵산 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 본질적으로 이루어지는 상보성 영역을 포함하고, CCR5의 엑손 3(대안적으로 양상블 게놈 데이터베이스에서 엑손 2로서 주석이 달림)을 표적화 한다. 문헌[Gomez-Ospina et al., Nat. Comm. 10(1):4045 (2019)]을 참조한다.

[0370] 본 명세서에서 사용되는 gRNA의 특정 실시형태에서, 표 19에 제시된 상보성 영역 서열에서 하나 이상의 티민은 유라실로 치환된다.

표 19

예시적인 gRNA 상보적 영역 서열

서열번호	핵산 서열 (5'→3')	설명
110	acccacacagtggggccacta	GET000046 가이드
111	tgttgaaggatgaggaaat	GET000047 가이드
112	tcactatgctgccgccagt	GET000048 가이드

[0371]

[0372]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 부위-지정 유전자 편집 접근에서 사용하기 위한 새로운 좌위 및/또는 gRNA 서열을 확인하는 방법이 제공된다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우, (예를 들어, 안전 항만 좌위 내에서) 특정 좌위에 대해 존재하는 gRNA가 사용될 때, 보통 게놈에 걸쳐 100개의 염기쌍(bp)마다 생기는 PAM 서열에 대한 좌위 측면 중 하나 상에서 측점 영역을 스캐닝함으로써 이식유전자의 표적화된 삽입을 위한 추가적인 좌위를 확인하기 위해 "자벌레" 접근이 사용될 수 있다. PAM 서열은 사용되는 특정 Cas 뉴클레아제에 따라 다르며, 상이한 뉴클레아제는 상이한 대응하는 PAM 서열을 갖기 때문이다. 좌위의 측면 중 하나 상의 측점 영역은 약 500 내지 4000 bp 길이, 예를 들어, 약 500 bp, 약 1000 bp, 약 1500 bp, 약 2000 bp, 약 2500 bp, 약 3000 bp, 약 3500 bp 또는 약 4000 bp 길이일 수 있다. PAM 서열이 검색 범위 내에서 확인될 때, 새로운 가이드는 이식유전자의 부위-지정 삽입에서 사용하기 위한 해당 좌위의 서열에 따라 설계될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템이 예시로서 설명되지만, 기재된 바와 같은 임의의 유전자 편집 접근은 ZFN, TALEN, 메가뉴클레아제 및 트랜스포사제를 이용하는 것을 비롯하여, 새로운 좌위를 확인하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0373]

일부 실시형태에서, gRNA의 활성, 안정성 및/또는 다른 특징은 화학적 및/또는 서열 변형의 혼입을 통해 변경될 수 있다. 일례로서, 일시적으로 발현 또는 전달되는 핵산은, 예를 들어, 세포 뉴클레아제에 의해 분해되기 쉬울 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 gRNA는 뉴클레아제에 대해 안정성을 도입하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 특정 이론에 구속되지 않고, 본 명세서에 기재된 특정 변형된 gRNA는 세포의 집단, 특히 본 기술의 세포에 도입될 때 감소된 선천성 면역 반응을 나타낼 수 있는 것으로 여겨진다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 용어 "선천성 면역 반응"은 일반적으로 사이토카인 발현 및 방출의 유도를 수반하는 바이러스 또는 박테리아 유래의 단일 가닥 핵산을 포함하는 외인성 핵산, 특히 인터페론에 대한 세포 반응, 및 세포사를 포함한다. 안정성을 개선시키고/시키거나, 뉴클레아제 내성을 증가시키고/시키거나, 면역 반응을 감소시키기 위한 gRNA의 다른 통상적인 화학적 변형은 2'-O-메틸 변형, 2'-플루오로 변형, 2'-O-메틸 포스포로티오에이트 결합 변형 및 2'-O-메틸 3' 티오PACE 변형을 포함한다.

[0374]

하나의 공통 3' 단부 변형은 하나 이상의(전형적으로 5 내지 200개의) 아데닌(A) 잔기를 포함하는 폴리 A 트랙의 첨가이다. 폴리 A 트랙은 gRNA를 암호화하는 핵산 서열에 함유될 수 있거나 또는 화학적 합성 동안 또는 폴리 아데노신 중합효소(예를 들어, 이콜라이(*E. coli*) 폴리(A)중합효소)를 이용하는 시험관내 전사 후에 gRNA에 첨가될 수 있다. 생체내, 폴리-A 트랙은 폴리 아데닐화 신호의 사용을 통해 DNA 벡터로부터 전사된 서열에 첨가될 수 있다. 이러한 신호의 예는 Maeder에 제공된다. 다른 적합한 gRNA 변형은 미국 특허 출원 공개 US 2017/0073674 A1 및 국제 특허 출원 공개 WO 2017/165862 A1에 기재되어 있는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들 각각의 전문은 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

[0375]

숙주 세포에 유전자 편집 시스템의 전달

[0376]

일부 실시형태에서, 하나 이상의 gRNA, 부위-지정 뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제) 또는 부위-지정 뉴클레아제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 선택적으로 표적화된 삽입을 위한 이식유전자를 포함하는, 본 명세서에 기재된 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성성분을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 세포에 전달을 위해 제형화된다.

[0377]

일부 실시형태에서, 1개 이상의 gRNA, 부위-지정 뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제) 또는 부위-지정 뉴클레아제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 선택적으로 표적화된 삽입을 위한 이식유전자(예를 들어, 본 기술의 다시스트론성 벡터 또는 이의 단편)를 포함하는 본 명세서에 제공된 유전자 편집 시스템의 구성성분은 전달 벡터의 형태로 세포에 전달될 수 있다. 전달 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 아데노바이러스 벡터, 아

데노-연관 바이러스(AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 파지 및 HDR-기반 공여자 벡터를 포함하는, 세포에 뉴클레오타이드 서열을 도입하는 데 적합한 임의의 유형의 벡터일 수 있다. 상이한 구성성분은 세포에 함께 또는 별개로 도입될 수 있고, 단일 벡터 또는 다중 벡터에 전달될 수 있다.

[0378] 일부 실시형태에서, 전달 벡터는, 예를 들어, 바이러스 형질전환, 인산칼슘 형질감염, 지질-매개 형질감염, DEAE-텍스트란, 전기천공법, 미량주사법, 뉴클레오포레이션, 리포좀, 나노입자, 또는 다른 방법을 포함하는 당 업계의 임의의 알려진 방법에 의해 세포에 도입될 수 있다.

[0379] 일부 실시형태에서, 본 기술은 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 전달 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 보존제 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. "약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제"는 신체의 하나의 조직, 기관 또는 일부에서 신체의 다른 조직, 기관 또는 일부까지 관심 화합물을 운반 또는 수송하는데 관련되는 약제학적으로 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭한다. 예를 들어, 담체 또는 부형제는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매, 또는 캡슐화 물질 또는 이들의 일부 조합물일 수 있다. 담체 또는 부형제의 각 구성성분은 "약제학적으로 허용 가능"해야 하며, 즉, 제형의 다른 성분과 양립 가능하여야 한다. 또한 접할 수 있는 신체의 임의의 조직, 기관 또는 일부와의 접촉에 적합하여야 하는데, 이는 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성 또는 치료적 이점을 과도하게 초과하는 임의의 다른 합병증의 위험을 지니지 않아야 한다는 것을 의미한다. 적합한 부형제는 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 세포를 포함하는 조성물은 적합한 주입 매질을 더 포함한다.

[0380] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 gRNA, 부위-지정 뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제) 또는 부위-지정 뉴클레아제 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 선택적으로 표적화된 삽입을 위한 이식유전자를 포함하는, 본 명세서에 기재된 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성성분을 포함하는 세포 또는 이의 조성물이 제공된다.

[0381] 치료 방법

[0382] 일부 양상에서, 본 기술은 질환의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체의 질환을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료적 유효량의, 본 명세서에 개시된 다양한 실시형태에 따른 다시스트론성 벡터를 함유하는 숙주 세포 집단, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 수반한다.

[0383] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 T 세포이다. T 세포는 자가일 수 있으며, 즉, 변형 후에 T 세포를 받을 대상체로부터 얻을 수 있다. 대안적으로, T 세포는 동종이계일 수 있고, 즉, 변형 후 T 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이들 실시형태 중 하나에서, T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 얻은 1차 T 세포일 수 있다. 다른 실시형태에서, 예를 들어, 동종이계 T 세포의 경우에, T 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래될 수 있다.

[0384] 일부 실시형태에서, T 세포는 미경험 T 세포, 헬퍼 T 세포(CD4+), 세포독성 T 세포(CD8+), 조절 T 세포(Treg), 중심 기억 T 세포(T_{CM}), 효과기 기억 T 세포(T_{EM}), 줄기 세포 기억 T 세포(T_{SCM}) 또는 이들의 임의의 조합이다. 더 구체적으로는, T 세포는 미경험 T 세포(항원에 노출되지 않음; CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA의 증가된 발현, 및 T_{CM}와 비교할 때 CD45RO의 감소된 발현), 기억 T 세포(항원-경험 및 오래 생존) 또는 효과기 세포(항원-경험, 세포독성)일 수 있다. 기억 T 세포는 T_{CM}(미경험 T 세포에 비해 CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO 및 CD95의 증가된 발현, 및 CD54RA의 감소된 발현) 및 T_{EM}(미경험 T 세포 또는 T_{CM}에 비해 CD62L, CCR7, CD28, CD45RA의 감소된 발현, 및 CD127의 증가된 발현)의 소집단으로 추가로 나누어질 수 있다. 효과기 T 세포는 T_{CM}과 비교할 때 CD62L, CCR7, CD28의 감소된 발현을 갖고, 그랜자임 및 퍼포린에 대해 양성인 항원-경험 CD8+ 세포독성 T 세포를 지칭한다. 헬퍼 T 세포는 사이토카인을 방출함으로써 다른 면역 세포의 활성화에 영향을 미치는 CD4+ 세포이다. CD4+ T 세포는 입양 면역 반응을 활성화시키거나 억제할 수 있고, 이들 두 기능 중 어느 것이 유도되는지는 다른 세포 및 신호의 존재에 따를 것이다. T 세포는 알려진 기법을 이용하여 선별될 수 있고, 다양한 하위집단 또는 이의 조합은 알려진 기법에 의해, 예컨대, 항체에 대한 친화도 결합, 유세포분석, 또는 면역자기 선택(immunomagnetic selection)에 의해 풍부화 또는 고갈될 수 있다.

[0385] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 NK 세포이다. NK 세포(거대 과립 림프구로도 정의됨)는 공통 림프구 조상세포(B 림프구 및 T 림프구로도 발생됨)로부터 분화된 세포 계통을 나타낸다. T-세포와 달리, NK 세포는 원형질막에

서 CD3을 자연적으로 발현시키지 않는다. 중요하게는, NK 세포는 TCR을 발현시키지 않으며, 전형적으로 또한 다른 항원-특이적 세포 표면 수용체를 결여한다. NK 세포의 세포독성 활성화는 감작을 필요로 하지 않지만, IL-2를 포함하는 다양한 사이토카인에 의한 활성화에 의해 향상된다. NK 세포는 일반적으로 항원-수용체-매개 신호전달에 필요한 적절한 또는 완전한 신호전달 경로를 결여하는 것으로 여겨지고, 따라서 항원 수용체-의존적 신호전달, 활성화 및 확장을 가능하게 하는 것으로 여겨지지 않는다. NK 세포는 세포독성이고, 이들은 이들의 세포독성 활성을 조절하기 위해 활성화 및 저해 수용체 신호전달의 균형을 유지한다. 예를 들어, CD16을 발현시키는 NK 세포는 감염 세포에 결합된 항체의 Fc 도메인에 결합하여, NK 세포 활성화를 초래할 수 있다. 대조적으로, 활성화는 고수준의 MHC 클래스 I 단백질을 발현시키는 세포에 대해 감소된다. 표적 세포와 대조적으로, NK 세포는 퍼포린과 같은 단백질, 및 프로테아제(그랜자임)와 같은 효소를 방출한다. 퍼포린은 표적 세포의 세포막에서 기공을 형성하여, 세포자멸사 또는 세포 용해를 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 NK 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 NK 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이들 실시형태 중 하나에서, NK 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 얻은 1차 NK 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래되거나 분화될 수 있다. 다능성 줄기 세포(예를 들어, iPSC)로부터 NK 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있는 다수의 기법이 있다. 예를 들어, 문헌[Zhu et al., *Methods Mol Biol.* 2019; 2048:107-119; Knorr et al., *Stem Cells Transl Med.* 2013 2(4):274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084; Zeng et al., *Stem Cell Reports.* 2017 Dec 12;9(6):1796-1812; Ni et al., *Methods Mol Biol.* 2013;1029:33-41; Bernareggi et al., *Exp Hematol.* 2019 71:13-23; Shankar et al., *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):234]을 포함하며, 이들 모두는 분화를 위한 방법 및 시약에 대해 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 그리고 구체적으로 인용된다. 분화는 CD56, KIRs, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, TRAIL, CD122, CD27, CD244, NK1.1, NKG2A/C, NCR1, Ly49, CD49b, CD11b, KLRG1, CD43, CD62L 및/또는 CD226을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 NK 세포 관련 및/또는 특이적 마커의 존재를 일반적으로 평가함으로써 당업계에 공지된 바와 같이 분석될 수 있다.

[0386] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 NKT 세포이다. NKT 세포는 T 세포와 NK 세포 둘 다의 특성을 공유하는 T 세포의 이종성 그룹이다. 이들 세포 중 다수는 자기 및 외래 지질 및 당지질에 결합하는 항원-제시 분자인 비-다형성 CD1d 분자를 인식한다. 이들은 대략 1%의 모든 말초 혈액 T 세포만을 구성한다. 일부 실시형태에서, NKT 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 NKT 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, NKT 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 NKT 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이들 실시형태 중 하나에서, NKT 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 체대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 얻은 1차 NKT 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, NKT 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래되거나 분화될 수 있다.

[0387] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는, 예를 들어, β 세포(베타 세포 또는 β 섬 세포로도 지칭됨)를 포함하는 췌장 섬 세포이다. 예시적인 췌장 섬 세포 유형은 췌장 섬 조상세포 세포, 미숙 췌장 섬 세포, 성숙 췌장 섬 세포 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 자가이며, 즉, 변형 후 β 섬 세포를 수용할 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 동종이계이며, 즉, 변형 후 β 섬 세포를 수용할 대상체 이외의 누군가로부터 얻는다. 이러한 실시형태 중 하나에서, β 섬 세포는 1차 β 섬 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, β 섬 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 유래되거나 분화될 수 있다.

[0388] 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 다능성 줄기 세포, 예를 들어, ESC 또는 iPSC이다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 ESC 또는 iPSC로부터 분화된 세포이다. ESC 및 iPSC는, 예를 들어, 뉴런, 성상교세포, 희소돌기 아교세포, 망막 상피 세포, 표피 세포, 모세포, 각질세포, 간세포, 췌장 β 섬 세포, 장상피 세포, 폐포세포, 조혈 세포, 내피 세포, 심근세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 신세포, 지방세포, 연골세포 및 골세포를 포함하는 임의의 신체 세포 유형으로 분화되는 능력을 갖는다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 β 섬 세포 또는 신경아교 전구체 세포(GPC)이다.

[0389] 일부 실시형태에서, 질환은 암, 예를 들어, CD19, CD22 또는 BCMA 발현과 연관된 것이며, 즉, 암 세포는 CD19, CD22 또는 BCMA를 발현시킨다. 이러한 실시형태에서, 상기 방법은 CAR이 암세포 상에서 발현되는 항원에 반응하여 활성화되고, 후속적으로 암세포의 사멸을 개시하도록, 암세포를 본 기술의 다이스트론성 벡터를 포함하는 숙주 세포와 접촉시키는 단계 및 상응하는 CAR을 발현시키는 단계를 포함한다.

[0390] 일부 실시형태에서, 암은 혈액 악성종양이다. 혈액 악성종양의 비제한적 예는 골수성 신생물, 골수형성 이상증후군(MDS), 골수증식성/골수형성 이상증후군, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 골

수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), T 세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), T 세포 림프종 및 B 세포 림프종을 포함한다. 일 실시형태에서, 혈액 악성종양은 CD19+, B 림프구-유래 악성종양이다.

[0391] 일부 실시형태에서, 질환은, 예를 들어, 루푸스, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 궤양성 대장염, 에디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염 및 셀리아병을 포함하는 자가면역질환이다.

[0392] 일부 실시형태에서, 질환은, 예를 들어, I형 당뇨병, II형 당뇨병, 당뇨병 전증 및 임신성 당뇨병을 포함하는 진성 당뇨병이다.

[0393] 일부 실시형태에서, 질환은, 예를 들어, 강경증, 뇌전증, 뇌염, 뇌수막염, 편두통, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 펠리체우스-메르쯔바하병 및 다발성 경화증을 포함하는 신경학적 질환이다.

[0394] 일부 실시형태에서, 본 기술에 따른 숙주 세포의 집단, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물은 의학 분야의 당업자에 의해 결정된 바와 같이 치료될 질환, 병태 또는 장애에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 임의의 위의 실시형태에서, 숙주 세포의 집단 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물은 표적 항원 또는 세포와 접하기 위해 골수에, 림프절에, 또는 뇌척수액에 정맥내로, 복강내로, 종양내로 투여될 수 있다. 적절한 용량, 적합한 지속기간 및 투여 빈도는 환자의 조건으로서 이러한 인자; 질환, 병태 또는 장애의 규모, 유형 및 중증도; 세포의 원치않는 유형 또는 수준 또는 활성, 활성 성분의 특정 형태; 및 투여 방법에 의해 결정될 것이다.

[0395] 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물 중 숙주 세포의 양은 전형적으로 10^2 개의 세포, 예를 들어, 약 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} 개 이상의 세포이다.

[0396] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 숙주 세포의 집단, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물을 대상체에게, 약 3일, 약 5일, 약 7일, 약 10일, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 1개월, 약 2개월, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월, 약 1년, 약 1.25년, 약 1.5년, 약 1.75년, 약 2년, 약 2.25년, 약 2.5년, 약 2.75년, 약 3년, 약 3.25년, 약 3.5년, 약 3.75년, 약 4년, 약 4.25년, 약 4.5년, 약 4.75년, 약 5년 또는 약 5년 초과 기간 동안 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 또는 1일 4회 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포의 집단, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물은 매일, 격일, 3일마다, 매주, 2주마다(즉, 격주), 3주마다, 매달, 격달 또는 3개월마다 투여될 수 있다.

[0397] 일부 실시형태에서, 숙주 세포의 집단 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물은 사전 결정된 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포의 집단, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물은 특정 치료 기준에 도달될 때까지 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 숙주 세포, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물의 투여를 계속할 것인지의 여부를 결정하기 위해 생물학적 샘플에서 하나 이상의 치료 기준, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 암 바이오마커 수준을 평가하는 단계를 포함한다.

[0398] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 1가지 이상의 다른 암 요법, 예컨대, 수술, 면역요법, 방사선요법 및/또는 화학요법을 대상체에게 순차적 또는 동시에 투여하는 단계를 추가로 수반한다.

[0399] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 약제학적 유효량의 1종 이상의 추가 치료제를 대상체에게 투여하여 개선된 또는 상승적 치료 효과를 얻는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 추가 치료제는 면역요법제, 화학치료제 및 생물 제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 숙주 세포, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물의 투여 전에 1종 이상의 추가 치료제가 투여되었다. 일부 실시형태에서, 대상체는 1종 이상의 추가 치료제와 숙주 세포, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물이 공동 투여된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 숙주 세포, 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물의 투여 후에 1종 이상의 추가 치료제가 투여되었다.

[0400] 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 1종 이상의 추가적인 치료제 및 숙주 세포 또는 이를 함유하는 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에게 대상체의 진단 및 예후에 따라서 동일 또는 상이한 용량이 1회 이상 투여될 수 있다. 당업자는 목적하는 치료 결과를 달성하기 위해 상이한 순서로 이러한 요법 중 하나 이상을 조합할 수 있을 것이다. 일부 실시형태에서, 병용 요법은 단독으로 투여되는 임의의 치료에 비해 개선되거나 상승적인 효과를 달성한다.

- [0401] 실시예
- [0402] 실시예 1. CD47 및 CD19 CAR을 공동발현시키는 이시스트론성 벡터는 충분한 이식편대숙주 보호를 제공한다
- [0403] 본 연구에서, 3개의 이시스트론성 벡터를 개발하였고, CD47/CD19 CAR 발현 수준, CD19+ 표적 세포 사멸, 및 시험관내 저면역에 대해 평가하였다.
- [0404] 도 1A는 본 기술의 특정 실시형태에 따른 이시스트론성 벡터의 일반적 설계를 나타낸다. 나타낸 바와 같이, 이시스트론성 벡터는 EF1 α 프로모터, CD47에 대한 암호화 서열, 절단 부위, 및 CD19 CAR에 대한 암호화 서열을 갖는다. 그러나, 절단 부위는 선택적으로 2A 부위(상단) 또는 2A 부위 단독(하단)에 추가로 플린 부위를 가질 수 있다.
- [0405] CD19 CAR/CD47 발현
- [0406] 처음에, 이시스트론성 벡터 설계의 형질도입 및 발현 효율을 단일 일반적 서열만을 포함하는 벡터의 형질도입뿐만 아니라 공동-형질도입 설계와 비교하여 시험하였고, CD19 CAR 및 CD47을 각각 암호화하는 2개의 렌티바이러스 벡터를 사용하여 세포를 공동형질도입하였다(도 1B). 공여자로부터 수집한 1차 T 세포를 (1) 작제물 없음(대조군); (2) CD47-암호화 렌티바이러스 벡터 단독; (3) CD19 CAR-암호화 렌티바이러스 벡터 단독; (4) CD47과 CD19 CAR을 둘 다 암호화하는 이시스트론성 벡터; 및 (5) 2개의 렌티바이러스 벡터(하나는 CD19 CAR을 암호화하고 하나는 CD47을 암호화함)로 형질도입하였다.
- [0407] 간략하게, T 세포를 채취하였고, 배지에서 재현탁시키고 나서, 계수하고, 렌티바이러스 형질도입을 위해 플레이팅하였다. 형질도입 7일 후에, CD47 및 CD19 CAR의 발현을 유세포분석에 의해 시험하였다.
- [0408] 도 2에 나타낸 바와 같이, 이시스트론성 렌티바이러스 벡터 처리는 공동 형질도입된 1차 T 세포보다 더 큰 CD47/CAR 이중 양성 세포를 초래하였다. 특히, CD47-T2A-CD19 CAR의 이시스트론성 렌티바이러스 벡터는 60% CD47+, CD19 CAR+ 세포를 초래한 한편, CD47 벡터와 CD19 CAR 벡터의 공동 형질도입은 42% CD47+, CD19 CAR+ 세포를 초래하였다. 공동-형질도입 그룹에서, 단일 벡터 그룹에서의 82% CD19 CAR+ 세포에 비해서 CD19 CAR+ 세포의 총 백분율(45%)의 현저한 감소가 있다. 이러한 데이터는 단일 이시스트론성 렌티바이러스 벡터에 의한 T 세포의 형질도입이 두 벡터의 공동 형질도입보다 더 큰 수의 CD47/CD19 CAR 이중 양성 세포 및 더 많은 CD19 CAR+ 세포를 생산하였다는 것을 시사한다.
- [0409] 또한, CD47-CD19 CAR 이시스트론성 CAR-T 세포가 비슷한 역가를 생산하고, CD19 CAR-단독 CAR-T 세포와 비슷한 수준에서 시험관내 표적 CD19+ Nalm-6 세포를 사멸하였다는 것을 발견하였는데(데이터 미제시), 이는 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터가 의도한 바와 같은 기능적 CD19 CAR의 충분한 수준을 생성할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0410] CD47 발현 수준 및 낮은 면역
- [0411] T 세포 상에서의 내인성 CD47 발현은 면역 침입에 대해 높은 CD47 수준을 필요로 하는 동종이계 숙주에서 선천성 면역 세포 사멸로부터 세포를 보호하는 데 충분하지 않다. 따라서, 본 기술의 이시스트론성 벡터가 적어도 낮은 면역을 부여하는 데 필요한 역가 초과로 충분한 CD47 발현을 생성할 수 있다는 것은 중요하다. 이시스트론성 벡터에서 CD19 CAR 앞에 CD47을 위치시키는 것이 CD47 발현의 최대화를 돕는다는 가설을 세웠다. 이 가설을 CD19 CAR을 첫 번째 CD47을 두 번째로 위치시키는 대안의 설계와 비교함으로써 시험하였다(도 1C).
- [0412] 도 3 및 도 4에 나타낸 바와 같이, 이시스트론성 벡터에서 CD47을 첫 번째로 위치시키는 것은 CD19 CAR을 첫 번째로 위치시키는 것보다 더 높은 수준의 CD47(천연 수준에 비해 6.5배 증가)을 생성하였다. 대조적으로, 이시스트론성 벡터에서 CD19 CAR을 첫 번째로 위치시키는 것은 CD47을 첫 번째로 위치시키는 것보다 더 높은 수준의 CD19 CAR(1.7배 차이)을 생성하였다.
- [0413] Quantibrite™을 이용해서 CD47 발현 수준을 분석하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, CD47-CD19 CAR과 CD19 CAR-CD47 이시스트론성 작제물 둘 다에 대한 CD47 발현은 단일 발현 카세트를 포함하는 벡터로부터의 CD47 발현 수준 이상이었다. CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터로부터의 CD47을 발현시키는 HIP CAR-T 세포(B2M 및 CIITA 결실에 의해 HLA I/II 녹아웃(KO)을 가짐)의 낮은 면역을 시험하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, CD47-CD19 CAR-형질도입 세포는 HLA-I/II KO CAR-T 세포와 비교할 때 더 낮은 NK 세포 사멸 및 대식세포 사멸을 나타냈고, 면역 보호는 항-CD47 항체의 첨가에 의해 차단되었다. 종합하면, 이러한 결과는 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터로부터의 CD47을 발현시키는 CAR-T 세포는 낮은 면역을 나타낸다.
- [0414] 3중의 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터의 생성 및 시험

[0415] 후속적으로, 3개의 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터를 확인하였고, 이들의 CD47/CD19 CAR 발현 수준, CD19+ 표적 세포 사멸 및 시험관내 낮은 면역에 대해 특성규명하였다.

[0416] 3종의 최고 성능의 이시스트론성 벡터: Psf2 렌티바이러스 벡터 골격을 이용하여, EF1 α -Kozak-CD47-FC2-T2A-CD19 CAR(작제물 1); EF1 α -Kozak-CD47-FC3-T2A-CD19 CAR(작제물 2); 및 EF1 α -Kozak-CD47-T2A-CD19 CAR(작제물 3)을 생성하였고, 확인하였다. 모두 3종의 작제물은 도 1A에 나타난 바와 같은 유전자 설계에 따르고, 즉, 이들은 모두 EF1 α 프로모터, CD47의 경우 암호화 서열, 절단 부위를 갖고, CD19 CAR의 경우 암호화 서열이 이어진다. 그러나, 작제물 1 및 2의 절단 부위는 T2A 부위에 추가로 퓨린 부위를 갖는 반면(작제물 1은 추가 FC3 부위를 갖고; 작제물 2는 추가 FC2 부위를 가짐), 작제물 3은 T2A 부위만을 갖는다(도 1A). 이들의 CD47 및/또는 CD19 CAR 발현 수준 및 CD19+ 표적 세포 사멸 효율을 아래의 표 20에 요약한다.

표 20

이시스트론성 벡터 작제물 1, 2 및 3의 특성규명

작제물	CD47+/% CD19 CAR+	CD19 CAR+%	CD47 MFI(대 천연)의 배수 증가	CD19 CAR MFI(대 CD19 CAR 단일 벡터)	CD19 CAR+ 역가(TU/mL)	IC50 사멸
1	77.2	84.1	7.2	0.25	2.0E+07	0.06
2	77.3	84.3	6.7	0.28	1.7E+07	0.08
3	75.5	82.3	7.1	0.19	2.4E+07	0.10

[0417]

[0418] 따라서, 작제물 1, 2 및 3은 서로 비슷한 CD47 및/또는 CD19 CAR 발현 수준 및 CD19-표적화된 면역 반응에 관해 높은 성능을 갖는다.

[0419] 실시예 2. CD47 및 안전 스위치를 공동 발현시키는 이시스트론성 벡터는 숙주 세포의 제어된 사멸을 가능하게 한다

[0420] 본 연구에서, CD47 및 안전 스위치의 공동 발현을 위해 이시스트론성 벡터를 생성하였고, 안전 스위치의 발현을 갖는 숙주 세포의 제어된 사멸에 대해 시험하였다.

[0421] CD47 및 안전 스위치의 공동 발현을 위한 이시스트론성 벡터는 도 7A에 나타난 바와 같이 일반 설계를 갖는 작제물을 포함할 수 있다. 작제물은 프로모터(예를 들어, CAG 프로모터), CD47에 대한 암호화 서열 및 안전 스위치 이식유전자(예를 들어, 사이토신 데아미나제(CyD), 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(HSVtk))에 대한 암호화 서열을 포함하고 선택적으로 HA 태그가 이어질 수 있다. 이시스트론성 벡터의 두 버전이 생성될 수 있으며, 첫 번째는 5'에서 3' 순서에서 CD47에 대한 암호화 서열 앞에 안전 스위치에 대한 암호화 서열을 갖고(도 7A, 상단), 두 번째는 5'에서 3' 순서에서 안전 스위치에 대한 암호화 서열 앞에 CD47에 대한 암호화 서열을 갖는다(도 7A, 하단). 2A 부위는 안전 스위치와 CD47을 분리시키는 데 사용될 수 있다. 작제물은 상동 유도 수선(HDR)을 통해 지시된 삽입을 위해 관심 표적 게놈 좌위(예를 들어, CLYBL 안전 항만 좌위)에 특이적인 좌측 및 우측 상동성 아암(LHA, RHA)에 측접된다.

[0422] 도 7B에 나타난 바와 같이, CAG 프로모터, CyD에 대한 암호화 서열 다음에 HA 태그, 2A 부위 및 CD47에 대한 암호화 서열을 갖는 작제물을 포함하는 이시스트론성 벡터를 CD47과 CyD의 공동 발현에 대해 생성하였다. 작제물은 CLYBL 안전 항만 좌위에 부위-지정 삽입을 위해 CLYBL LHA 및 RHA에 측접된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, CyD 안전 스위치는 세포 성장을 유도 가능하게 중단시키고/시키거나 프로드러그 5-플루오로사이토신(5-FC)의 존재 하에 작제물을 갖는 증식 세포를 사멸시킬 수 있었다.

[0423] 이시스트론성 벡터를 유도 만능 줄기 세포(iPSC)를 형질도입하는 데 사용하였고, 이후에, 분화시켰다. 2D에서 CyD-CD47-발현 클론의 분화는 안전 스위치 발현에 의해 영향받지 않았다(데이터를 본 명세서에서는 제시하지 않음). 도 8에 나타난 바와 같이, 형질도입 세포는 야생형(WT) 대조군과 비교할 때 증가된 CD47 발현을 가졌지만, CLYBL 좌위에 삽입 후 형질도입된 세포에서의 분화 후에 이시스트론성 카세트(CD47 발현에 기반함)의 더 낮은 발현이 관찰되었다. 최종적으로, 도 9에 나타난 바와 같이, 2종의 클론(2-G09 및 2-G11)으로부터의 결과에 기반하여, 5-FC의 존재 하에 CyD의 사멸 효율이 달성되었고, iPSC에 대한 비슷한 IC50로 분화 세포에서 유지되었다(99% 초과 사멸이 달성됨). 이러한 결과는 CyD-CD47 이시스트론성 작제물을 갖는 세포의 효과적이고 제어 가

능한 사멸을 나타낸다.

- [0424] CD47과 상이한 안전 스위치인 HSVtk의 공동 발현을 위한 다른 이시스트론성 벡터를 또한 생성하고 시험하였다. **도 7C**에 나타난 바와 같이, 이시스트론성 벡터는 CAG 프로모터, CD47에 대한 암호화 서열, 2A 부위, 및 HSVtk에 대한 암호화 서열 다음에 HA 태그를 갖는 작제물을 포함한다. HSVtk는 간시클로버(GCV)를 DNA 합성을 방해하는 독성 대사물질로 전환시킴으로써, 분화 세포를 사멸시킬 수 있었다. 앞서와 같이, 작제물은 CLYBL 안전 항만 좌위에 부위-지정 삽입을 위해 CLYBL LHA 및 RHA에 측접된다.
- [0425] iPSC를 CD47-HSVtk 이시스트론성 작제물로 형질도입하였고, 이어서, 시험을 위해 클론으로 분화시켰다. **도 10**에 나타난 바와 같이, CD47 발현을 2주의 기간에 걸쳐 여러 클론(1-B10, 1-C02, 2-F09 및 1-H04)에서 시험하였고, 2주에 걸쳐 CD47 발현의 침묵은 관찰되지 않았다. 모든 클론은 CD47에 대해 적어도 98% 양성이었다. **도 11**에 나타난 바와 같이, 야생형 수준에 대한 CD47 과발현을 이러한 클론에서 시험하였고, CyD-CK47 클론을 2-G09를 대조군으로서 시험하였다. CD47의 1개 복제물에 의해 클론에 대해 약 70배 과발현이 관찰되었지만, 플라스미드 골격의 삽입은 CD47 발현 수준을 낮추었다.
- [0426] **도 12**에 나타난 바와 같이, 다양한 양의 GCV의 존재 하에서 HSVtk의 사멸 효율 및 용량 반응을 계수 비드를 이용하는 유세포분석에 의해 3일 후에 CD47-HSVtk 클론에서 시험하였다. 시험한 용량 범위에서 대조군 클론에서 GCV 독성이 관찰되지 않았지만, 용량-반응 HSVtk 사멸이 CD47-HSVtk 클론에서 달성되었고, IC50은 일반적으로 문헌에서 보고된 것과 비슷하였다(10 내지 100nM). 종합하면, 이러한 결과는 CD47-안전 스위치 이시스트론성 작제물을 갖는 세포의 안정한 CD47 과발현 및 제어 가능한 사멸을 나타낸다.
- [0427] **실시예 3. CD47-CD19 CAR 및 CD47-CD22 CAR 이시스트론성 벡터에 의한 이중 형질도입은 단일 형질도입 대조군에 비해서 세포독성 및 사이토카인 반응을 증가시킨다**
- [0428] 본 연구에서, CD47과 CD22 CAR의 공동발현을 위한 이시스트론성 벡터를 생성하고, 특성규명하고 나서, T 세포의 이중 형질도입을 위해 CD47-CD19 CAR 이시스트론성 벡터와 함께 시험하였다. 이어서, 단일 및 이중 형질도입된 CAR-T 세포를 시험관내 및 마우스 종양모델에서 이들의 종양 사멸 능력에 대해 시험하였다.
- [0429] CD47-CD22 CAR 이시스트론성 벡터 설계 및 시험
- [0430] **도 13**에 나타난 바와 같은 설계를 갖는 CD47-CD22 CAR 이시스트론성 벡터(PLAS2199)를 생성하였다. CD47-CD22 CAR 이시스트론성 벡터는 EF1 α 프로모터, CD47에 대한 암호화 서열, 퓨린 부위, T2A 부위 및 CD22 CAR에 대한 암호화 서열을 포함한다. CD22 CAR은 다음의 기능적 도메인을 갖는다: GMCSFR- α 신호 펩타이드, 짧은 G4S 링커에 의해 연결된 m971의 V_H 및 V_L을 포함하는 CD22-특이적 scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인. CD22 CAR 작제물은 또한 V_L 도메인과 CD8 α 힌지 도메인 사이에 짧은 AAA 링커를 갖는다.
- [0431] 다음에, CD47-CD22 CAR 작제물의 물리적 및 기능적 특징을 시험하였고, 앞서 기재한 바와 같은 CD47-CD19 CAR 작제물과 비교하였다. CD47-CD19 CAR의 설계를 또한 **도 13**에 나타낸다. CD19 CAR은 다음의 기능적 도메인: CD8 α 신호 펩타이드, Whitlow 링커에 의해 연결된 FMC63의 V_H 및 V_L을 포함하는 CD19-특이적 scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 갖는다. CD19 CAR 암호화 서열은 CD47에 대한 암호화 서열의 하류에 있으며, 두 암호화 서열은 퓨린 부위 및 T2A 부위에 의해 분리된다. 암호화 서열은 둘 다 EF1 α 프로모터에 의해 유도된다. CD22 CAR-CD47 이시스트론성 벡터(PLAS2218)를 또한 CD22 CAR에 대한 암호화 서열 및 CD47에 대한 암호화 서열을 바꿈으로써 대조군으로서 생성하였다.
- [0432] 모두 3개의 이시스트론성 벡터, 즉, CD47-CD19 CAR, CD47-CD22 CAR(PLAS2199), 및 CD22 CAR-CD47(PLAS2218)을 사용하여 렌티바이러스를 생성하였고, 이어서, 계능 정량화 분석(GQA), 기능적 역가 분석 및 입자 대 감염성 분석을 포함하는 일련의 물리적 및 기능적 분석에서 시험하였다. **도 14**에 나타난 바와 같이, CD47-CD22 CAR 렌티바이러스는 CD47-CD19 CAR 렌티바이러스에 대한 유사한 물리적 및 기능적 역가 프로파일을 나타냈다.
- [0433] CD47-CD22 CAR/CD47-CD19 CAR 이중 형질도입
- [0434] 다음에, CD47-CD22 CAR과 CD47-CD19 CAR 바이러스를 둘 다 이용하는 이중 형질도입을 시험하였다. 이중 형질도입 접근의 흐름도를 **도 15**에 나타낸다. 간략하게, 제0일에, 공여자 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 해동시키고, 1:1 비로 혼합하고, 3:1 비로 CTS™ Dynabeads™(Thermo Fisher Scientific)에 적용하였다. 제1일에, 렌티바이러스로 T 세포를 형질도입하였다. 총 6개의 렌티바이러스 처리를 시험하였다: (1) 모의; (2) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스

스 단독; (3) CD47-CD22 CAR(PLAS2199) 렌티바이러스 단독; (4) CD22 CAR-CD47 (PLAS2218) 렌티바이러스 단독; (5) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스와 CD47-CD22 CAR(PLAS2199) 렌티바이러스 혼합물(CD47-CD19 CAR×CD47-CD22 CAR); 및 (6) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스와 CD22 CAR-CD47 (PLAS2218) 렌티바이러스 혼합물(CD47-CD19 CAR×CD22 CAR-CD47). 제4일에, 세포를 비드로부터 분리시키고, 소집단을 제7일에 후속 분석을 가하였다. 제14일에, 세포의 다른 소집단을 다시 시험하였고, 남아있는 세포를 냉동시켰다.

[0435] 도 16은 CD47, CD19 CAR 및 CD22 CAR 발현 수준을 시험하기 위한 단일 또는 이중 형질도입 T 세포의 유세포분석의 예시적 개폐 전략을 나타낸다. 개시 T 세포를 CD4 및/또는 CD8 발현에 대해, 이어서, 선택적으로 CD47 발현에 대해 선택하였고, CD19 및 CD22 발현에 대해 시험하였다. 도 17에 나타난 바와 같이, CD47-CD19 CAR 렌티바이러스 또는 CD47-CD22 CAR/CD22 CAR-CD47 렌티바이러스 단독의 형질도입은 예상한 바와 같이 CD4+와 CD8+ T 세포 둘 다에서 CD19 CAR 및 CD22 CAR의 발현을 각각 유도하였고, 이는 CD47-CD22 CAR/CD22 CAR-CD47 이시스트론성 렌티바이러스가 pan T 세포를 효과적으로 형질도입할 수 있다는 것을 시사한다. 또한, CD47-CD19 CAR과 CD47-CD22 CAR/CD22 CAR-CD47 렌티바이러스 둘 다의 이중 형질도입은 고수준의 CD19 CAR 발현, CD22 CAR 발현 또는 둘 다 나타내는 T 세포의 이중성 집단을 초래하였다. 이중 형질도입 접근을 상이한 공여자에서 반복하였고, 결과는 이중 형질도입 접근이 공여자와 바이러스 로트 사이에서 일관된 생성물 분포를 생성할 수 있었다는 것을 나타낸다(도 18). 참고로, CD22 CAR-CD47 설계에 비해서, CD47-CD22 CAR 설계는 3명의 공여자의 유세포분석에서 중앙값 형광 강도(median fluorescent intensity: MFI)에 의해 측정할 때 이전의 결과와 일치되는 더 높은 CD47 및 CD22 CAR 발현 수준을 얻을 수 있었고(도 19), 이는 CD47 작제물 하류에 CAR 작제물을 위치시키는 것이 유리할 수 있다는 것을 시사한다. 또한, CD47-CD22 CAR 작제물은 CD47-CD19 CAR 작제물에 대해 유사한 벡터 복제물 수(VCN)에서 낮은 면역에 의해 필요로 되는 역치 초과와 더 높은 CD47 발현 수준을 생성하였고(FIG. 20), 이는 CD47-CD22 CAR 작제물로부터 생성된 T 세포가 낮은 면역이라는 것을 시사한다. CD22 CAR-CD47 작제물보다 CD47-CD22 CAR 작제물의 우수한 특징으로 인해, 후속 시험에 대해 전자를 사용하였다.

[0436] 최종적으로, 이중 형질도입된 세포 집단이 단일 형질도입 세포 집단에 비해 더 높은 VCN을 갖는지의 여부를 시험하였다. 도 21A에 나타난 바와 같이, 3명의 공여자로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 제0일에 해동시켰고, 3:1 비로 CTS™ Dynabeads™(Thermo Fisher Scientific)의 적용 전에 1:1 비로 혼합하였다. 제1일에, 렌티바이러스로 T 세포를 단일 또는 이중 형질도입하였다: (1) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스 단독; (2) CD47-CD22 CAR 렌티바이러스 단독; 및 (3) CD47-CD19 CAR 렌티바이러스와 CD47-CD22 CAR 렌티바이러스 혼합물(CD47-CD19 CAR×CD47-CD22 CAR). 제4일에 세포를 비드로부터 분리시켰고, 제8일에 유세포분석 및 VCN 분석을 수행하였다. 도 21B에 나타난 바와 같이, 이중 형질도입된 집단은 단일 CAR 형질도입 세포보다 더 높은 VCN을 가졌고, 이중 형질도입된 생성물은 단일 및 이중 형질도입된 세포의 VCN의 평균이었다.

[0437] 시험관내 이중 CD47-CD19 CAR/CD47-CD22 CAR 형질도입 T 세포의 세포독성

[0438] 다음에, 이중 CD47-CD19 CAR/CD47-CD22 CAR 형질도입 T 세포가 시험관내 종양 성장을 저해할 수 있는지를 시험하였다. 도 22에 나타난 바와 같이, CD47-CD19 CAR로 단일 형질도입되고(CD19 CAR-T 세포), CD47-CD22 CAR로 단일 형질도입되고(CD22 CAR-T 세포) 및 CD47-CD19 CAR/CD47-CD22 CAR로 이중 형질도입된 T 세포(CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포)를 RFP-표지 대조군 NALM, CD19 KO NALM 또는 CD22 KO NALM 종양 세포 상에서 시험하였고, 시간에 따라 RFP의 총 통합 강도에 의해 세포독성을 측정하였다. 단일 형질도입된 T 세포에 비해, 이중 형질도입된 T 세포는 항원 탈출(antigen escape)을 극복하였고, NALM 세포에서 CD19 또는 CD22 KO 표적에 대해 사이토카인을 생성하였다. 도 23에 나타난 바와 같이, CD47-CD22 CAR은 항원 의존적 방식으로 NALM 및 RAJI 종양 세포에 대해 세포독성을 유발하였다.

[0439] 이중 형질도입된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포가 단일 CAR-발현 세포에 대해 유사한 세포독성 및 사이토카인 프로파일을 유발하는지의 여부를 추가로 시험하기 위해, 단일 형질도입된 CD19 CAR-T 세포, 단일 형질도입된 CD22 CAR-T 세포 및 이중 형질도입된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포를 자기 선택에 의해 분류하고, 이어서, 세포독성(IncuCyte®) 및 사이토카인(Meso Scale Discovery) 분석에 의해 분석한 연구를 수행하였다(예시적 흐름도를 나타내는 도 24 참조). 간략하게, 2명의 공여자로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 제0일에 해동시켰고, 3:1 비로 CTS™ Dynabeads™(Thermo Fisher Scientific)의 적용 전에 1:1 비로 혼합하였다. 제1일에, T 세포를 (1) 모의 작제물로 형질도입; (2) CD47-CD19 CAR로 단일 형질도입(CD19 CAR-T 세포); (3) CD47-CD22 CAR로 단일 형질도입(CD22 CAR-T 세포); 또는 (4) CD47-CD19 CAR과 CD47-CD22 CAR로 이중형질도입(CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포)하였다. 제4일에 세포를 비드로부터 분리시키고, 제7일에 소집단을 시험하였다. 제8일에, CD19 CAR-T 세포 및 이중 형질도입된 T 세포를 항-이디오타입-바이오틴 및 항-바이오틴 마이크로비드에 의해 분류하고, CD22 CAR-T 세포를 가용성 CD22-바이오틴에 의해 분류하였다. 제12일에, 이중 형질도입된 집단을 CD22 CAR에 대해 가용성

CD22-바이오틴에 의해 다시 분류하였다. 분류 단계는 CD19 CAR 및/또는 CD22 CAR을 모두 발현시키는 세포를 풍부화하기 위해 단일 또는 이중 형질도입 T 세포의 하위 집단을 선택하였다. 도 25에 나타난 바와 같이, 이중 형질도입된 세포를 효율적으로 하위 집단으로 분류하였고(정제하였고), 90% 초과인 세포는 CD19 CAR과 CD22 CAR을 둘 다 발현시켰다. 제14일에, 세포의 다른 소집단을 CAR 패널에 대해 시험하였고, 남아있는 것을 냉동시켰다. 도 26에 나타난 바와 같이, 이중 형질도입 및 분류된 CAR-T 세포는 낮은 효과기(E) 대 표적(T)(E:T) 비로 단일 형질도입 및 분류된 CAR-T 대조군에 비해 종양 세포 성장을 더 효율적으로 저해하였다. 이중 형질도입 및 분류된 CAR-T 세포는 또한 CD19 KO(도 27) 또는 CD22 KO(도 28) 배경에서 종양 성장의 더 효과적인 제어를 나타냈다. 또한, 이중 형질도입된 CAR-T 세포는 대조군, CD19 KO 및 CD22 KO NALM 세포에서 시험하였을 때 단일 형질도입 CAR-T 세포에 비해 더 높은 수준의 사이토카인을 유발하였다(도 29). 종합하면, 이러한 데이터는 이중 형질도입된 CAR-T 세포가 시험관내 단일 형질도입 CAR-T 세포에 비해 우수한 세포독성 및 사이토카인 반응을 나타낸다는 것을 시사한다.

[0440] 생체내 이중 CD47-CD19 CAR/CD47-CD22 CAR 형질도입 T 세포의 세포독성

[0441] 생체내 이중 형질도입된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포의 세포독성을 평가하고, 이중 형질도입된 CAR-T 세포가 CD19 항원 손실을 극복할 수 있었는지의 여부를 시험하기 위해, NSG 마우스에 CD19-발현 및 CD19-음성 NALM(1.0×10^6 개 세포/마우스) 또는 RAJI(0.5×10^6 개 세포/마우스) 종양 세포의 혼합물을 정맥내로 주사하였다(대표로서 NALM 모델을 나타내는 도 30). 종양 세포 주사의 3일 후에, 종양 생착 마우스를 CD19 CAR-T 세포, CD22 CAR-T 세포 또는 이중 형질도입된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포의 정맥내 주사로 처리하였다. 종양 성장을 생물발광 및 Kaplan-Meier 생존 곡선에 의해 분석하였다. 도 31 내지 도 34에 나타난 바와 같이, 모의 및 CD19 CAR-T 세포 처리 대조군에 비해, CD22 CAR-T 세포 및 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포 처리 마우스는 종양 세포의 생물발광(도 31, 도 33) 및 전체 마우스 영상(도 32, 도 34)에 의해 측정된 바와 같이 CD19 KO NALM(도 31 내지 도 32) 및 CD19 KO RAJI(도 33 내지 도 34) 마우스 모델에서 제어된 종양 부담을 나타냈다. 이러한 데이터는 이중 형질도입된 CAR-T 세포가 항원 탈출을 극복하고 마우스 모델에서 NALM 및 RAJI 종양 성장을 저해하는 한편, CD19 CAR-T 세포는 마우스가 점진적으로 종양에 굴복하기 전에 일시적으로만 종양 성장을 제어하였다는 것을 시사한다.

[0442] 이중 형질도입된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포는 생체내 CD19 CAR-과 CD22 CAR-T 세포의 혼합물에 비해서 증가된 세포독성을 갖는다

[0443] 최종적으로, 이중 형질도입된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포가 대조군 종양 성장을 CD19 CAR-과 CD22 CAR-T 세포의 1:1 혼합물보다 더 효율적으로 제어할 수 있었는지의 여부를 시험하였다. 이중 형질도입 또는 이중 형질도입 및 분류된, CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포의 항종양 활성을 CD19 CAR-과 CD22 CAR-T 세포의 조합된 생성물과 비교하였다. 앞서와 같이, NSG 마우스에 NALM 종양 세포를 정맥내로 주사하였다(도 35). 종양 세포 주사의 3일 후에, 종양 생착 마우스를 (1) 이중 형질도입 또는 (2) 이중 형질도입 및 분류된 CD19 CAR×CD22 CAR-T 세포 또는 (3) CD19 CAR-과 CD22 CAR-T 세포의 50:50 혼합물의 정맥내 주사로 처리하였다. 종양 성장을 생물발광 및 Kaplan-Meier 생존 곡선에 의해 분석하였다. 놀랍게도, 도 36에 나타난 바와 같이, 이중 형질도입 또는 이중 형질도입 및 분류된, CD19×CD22 CAR-T 세포는 CD19 CAR-과 CD22 CAR-T 세포의 혼합물에 비해 종양 성장의 더 효과적인 저해를 나타냈는데, 이는 이중 형질도입된 T 세포의 종양 사멸 능력이 단일 형질도입 상대의 조합된 능력보다 더 크다는 것을 시사한다.

[0444] 결론적으로, 이러한 데이터는 고수준의 CAR 발현, 세포독성, 낮은 면역, 사이토카인 반응 및 이중 형질도입 접근에 의해 생성된 CAR-T 세포의 시험관내와 생체내 모두에서의 종양 사멸 능력을 입증하였다. 이중 형질도입된 CAR-T 세포는 항원 탈출을 극복하고, 단일 형질도입 상대의 1:1 혼합물에 비해 종양 생착 마우스 모델에서 더 양호한 종양 저해 성능을 나타낼 수 있었고, 따라서 세포 요법에서 사용하기 위한 더 큰 잠재력을 가질 수 있다.

[0445] 결론

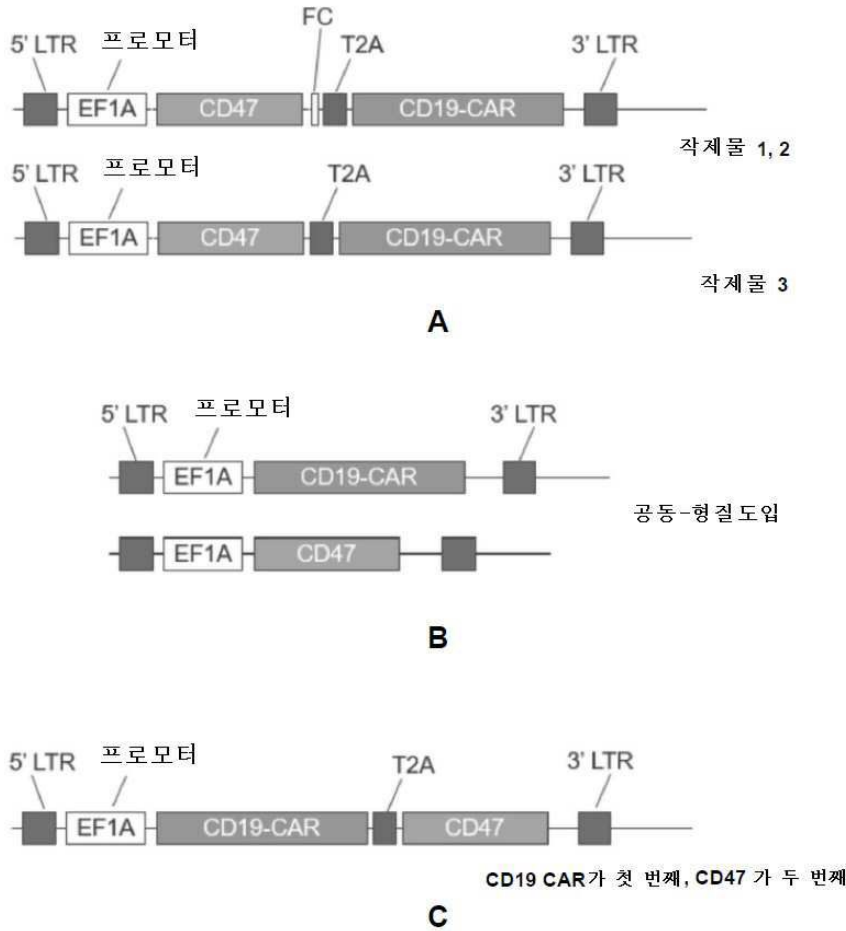
[0446] 위에 상술한 기술의 실시형태의 설명은 배타적이거나 또는 위에 개시한 정확한 형태로 기술을 제한하려는 의도는 아니다. 기술에 대한 구체적 실시형태 및 실시예를 예시의 목적을 위해 위에 기재하였지만, 관련 분야의 당업자가 인식할 바와 같이 기술 범주 내에서 다양한 균등한 변형이 가능하다. 예를 들어, 단계들을 주어진 순서로 제시하지만, 대안의 실시형태는 단계들을 상이한 순서로 수행할 수 있다. 본 명세서에 기재한 다양한 실시형태는 또한 조합되어 추가 실시형태를 제공할 수 있다.

[0447] 앞서 언급한 것으로부터, 기술의 구체적인 실시형태를 예시의 목적을 위해 본 명세서에 기재하였지만, 기술의

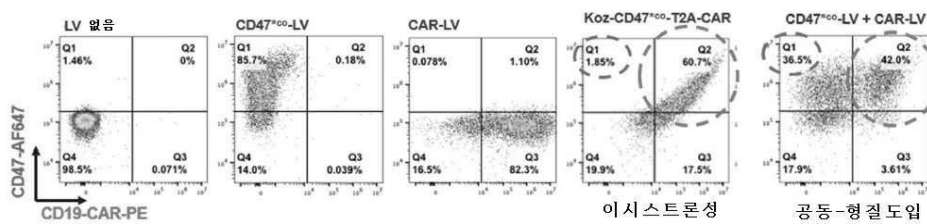
실시형태의 설명을 불필요하게 모호하게 하는 것을 피하기 위해 잘 공지된 구성성분 및 기능을 상세한 설명에 나타내거나 기재하지 않았다. 문맥이 허용하는 경우, 단일 또는 복수의 용어는 또한 각각 복수 또는 단일 형태를 포함할 수 있다. 추가로, 기술의 일부 실시형태와 관련된 이점이 해당 실시형태와 관련하여 기재되었지만, 다른 실시형태가 또한 이러한 이점을 나타낼 수 있고, 모든 실시형태가 기술 범주 내에 속하는 이러한 이점을 반드시 나타낼 필요는 없다. 따라서, 개시내용 및 관련 기술은 분명하게 나타내거나 본 명세서에 기재하지 않은 다른 실시형태를 포괄할 수 있다.

도면

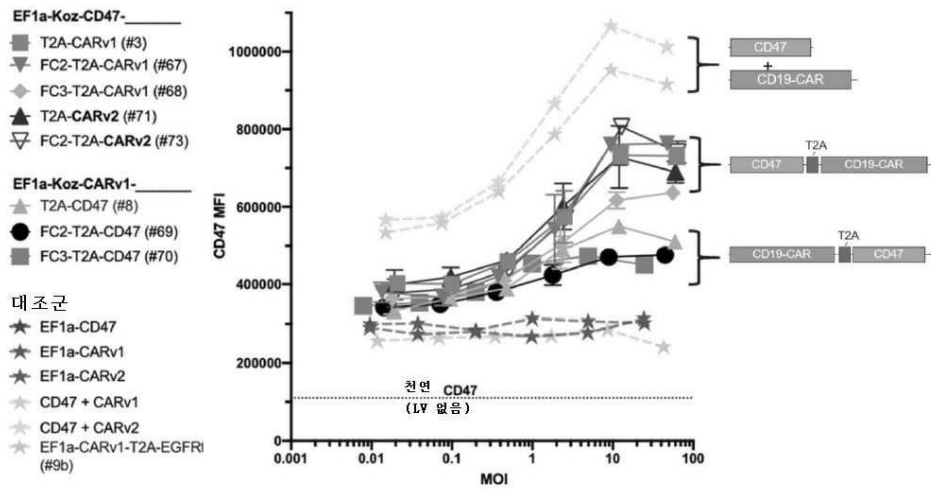
도면1



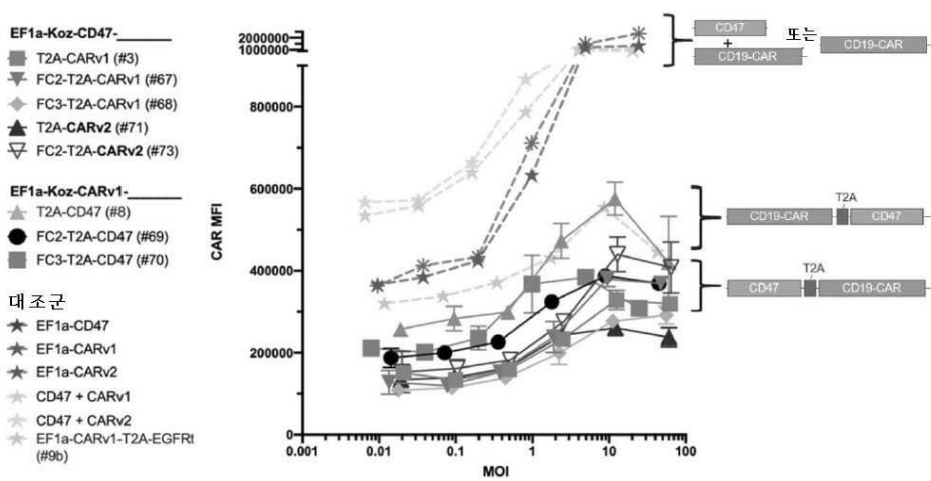
도면2



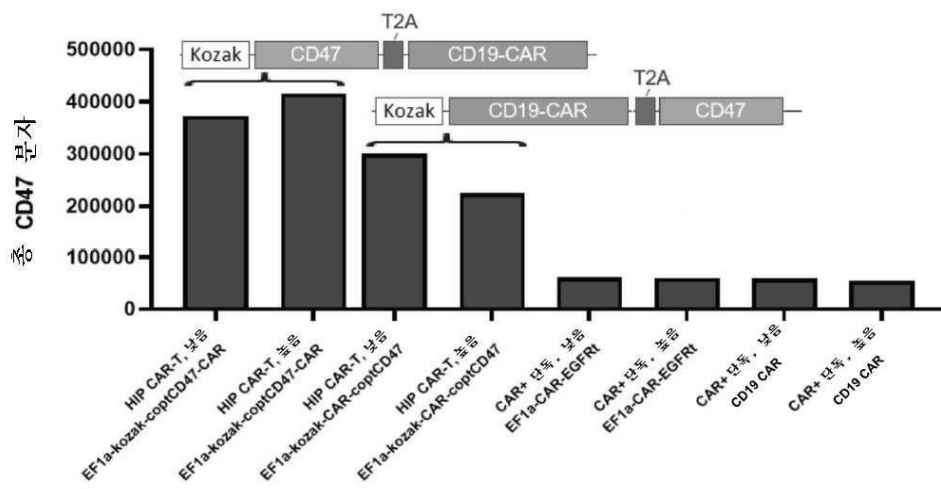
도면3



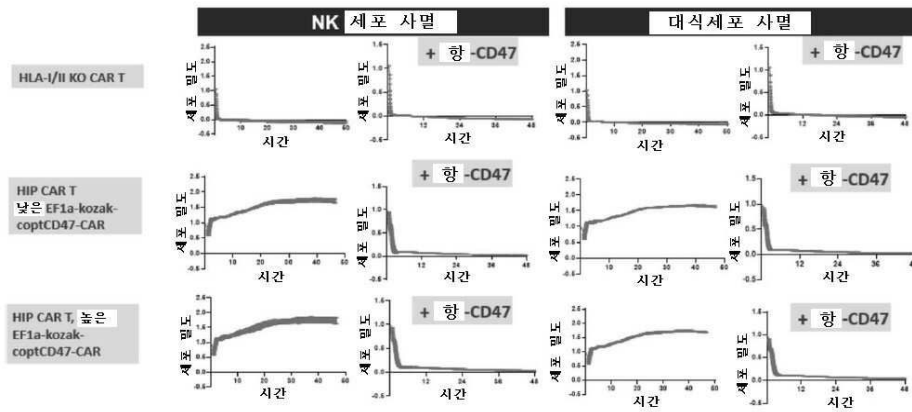
도면4



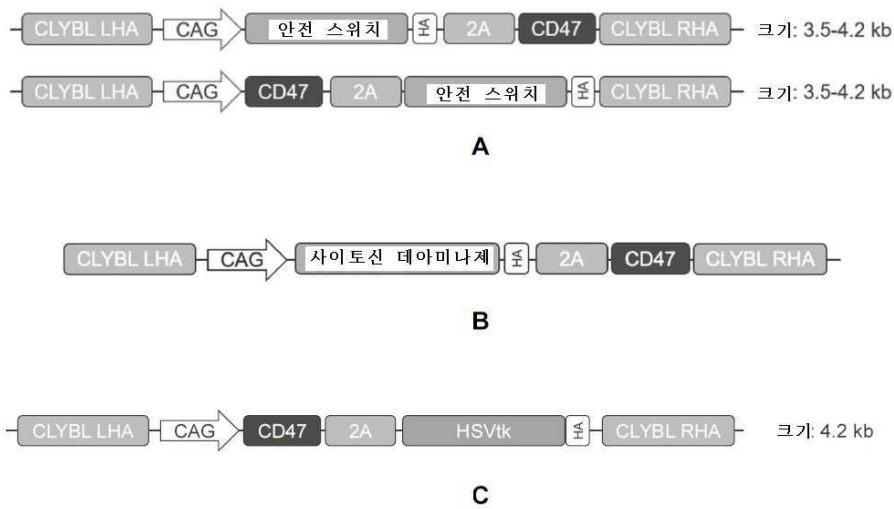
도면5



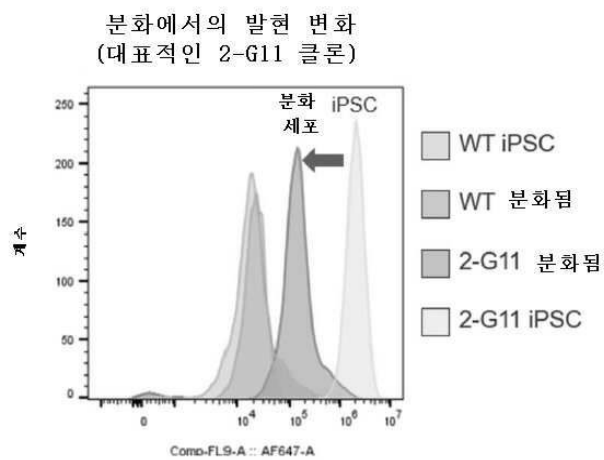
도면6



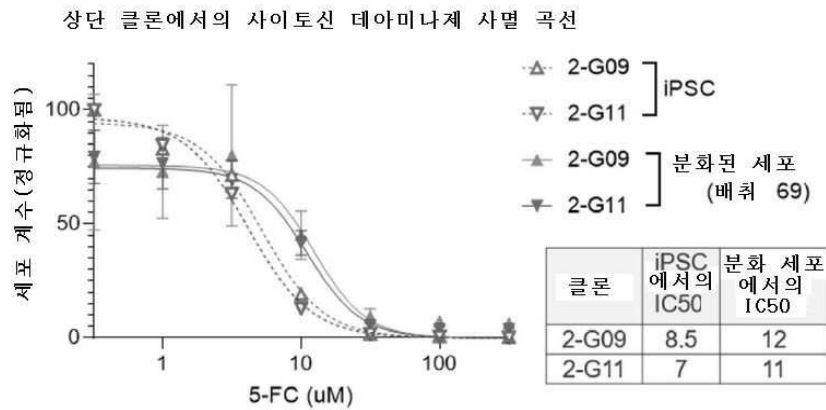
도면7



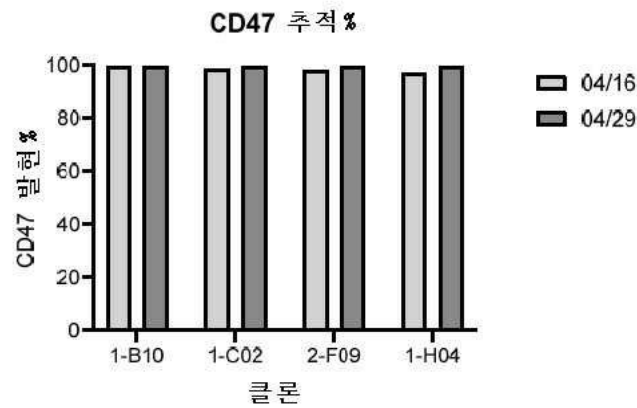
도면8



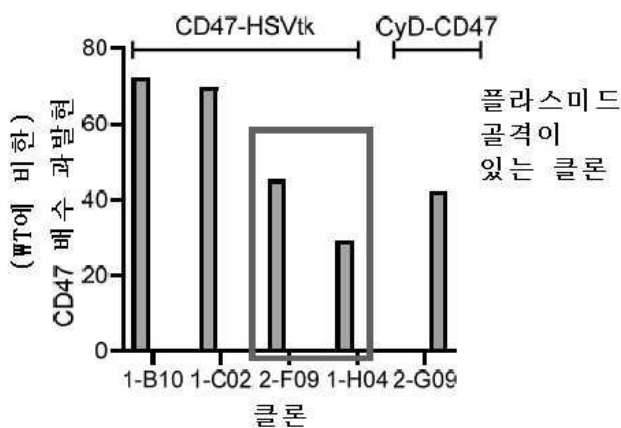
도면9



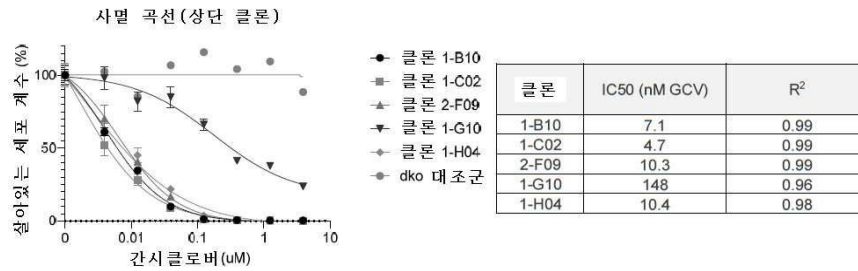
도면10



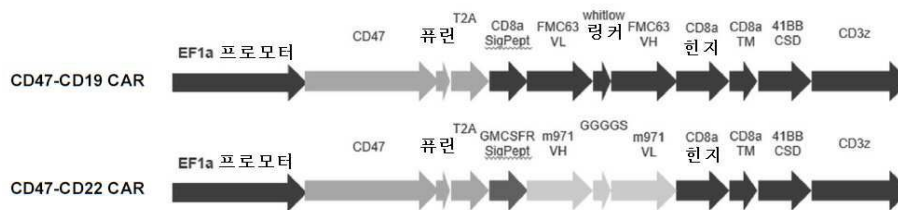
도면11



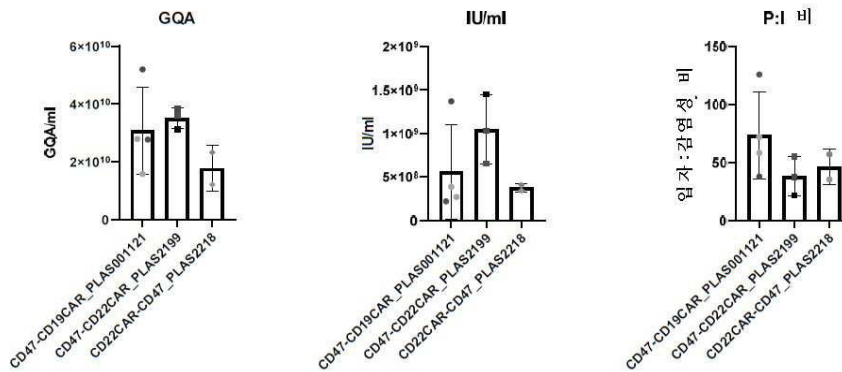
도면12



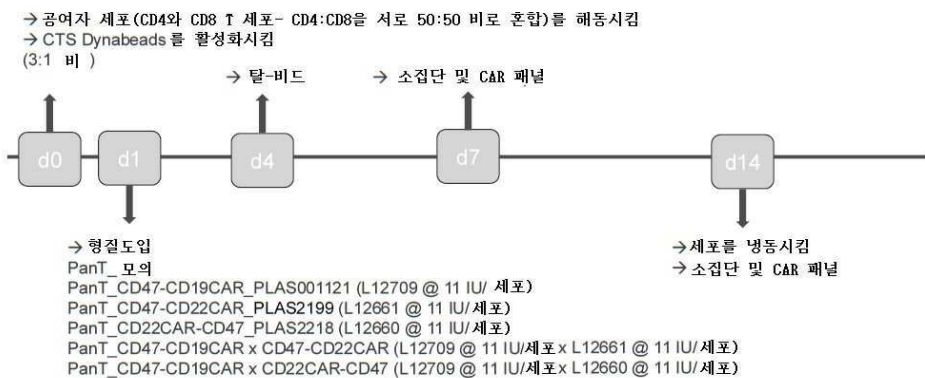
도면13



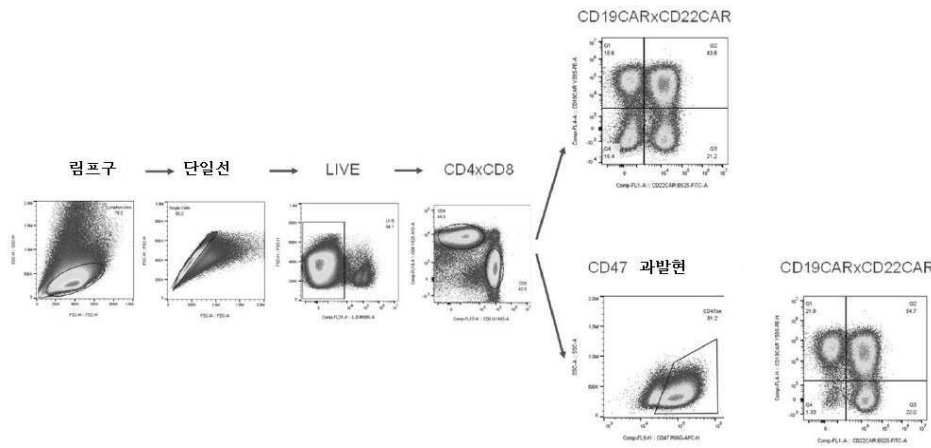
도면14



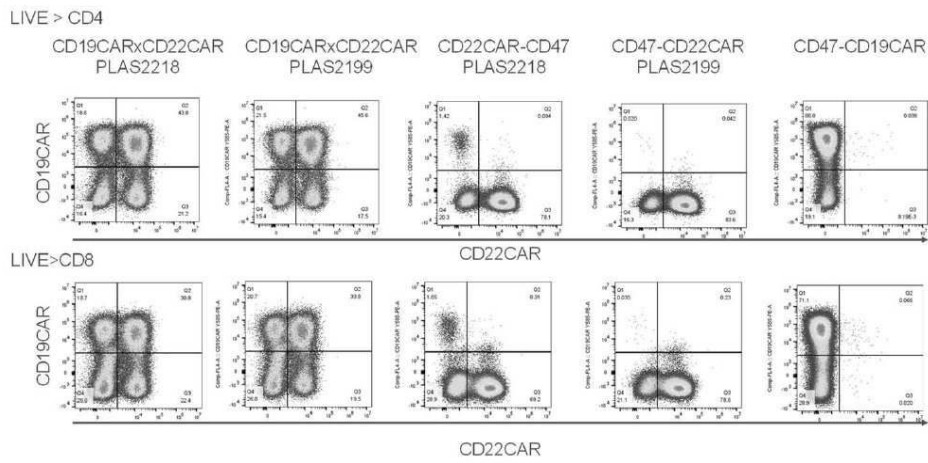
도면15



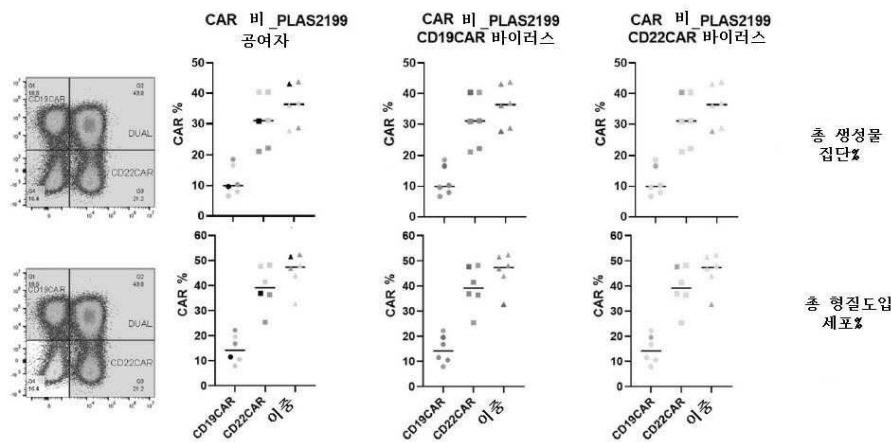
도면16



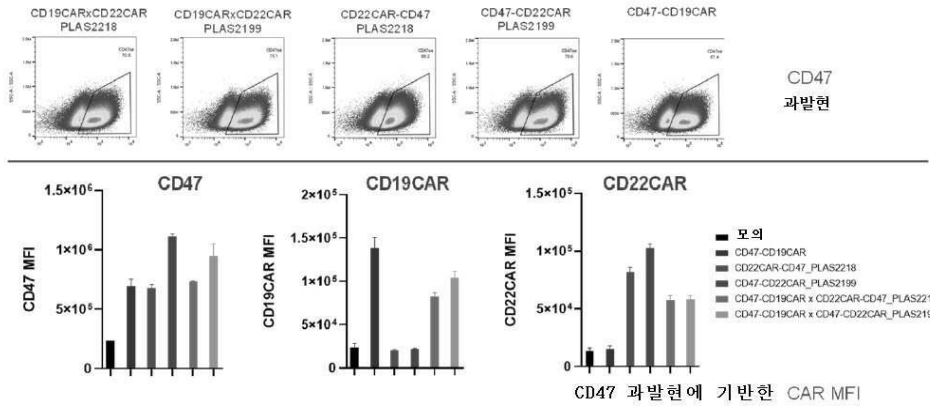
도면17



도면18



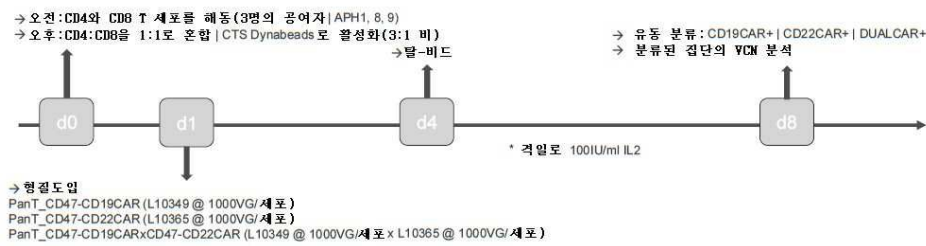
도면19



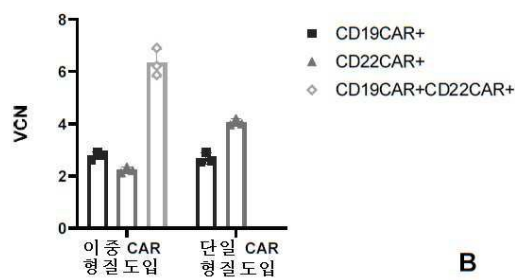
도면20



도면21

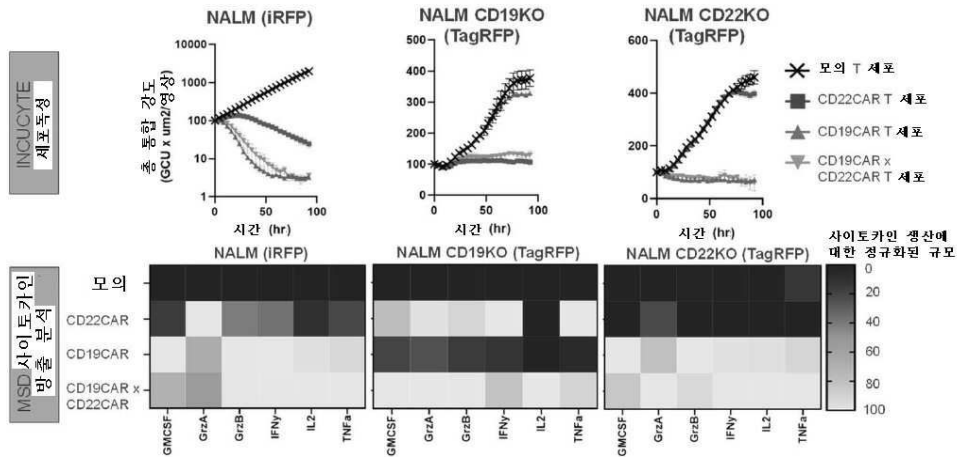


A

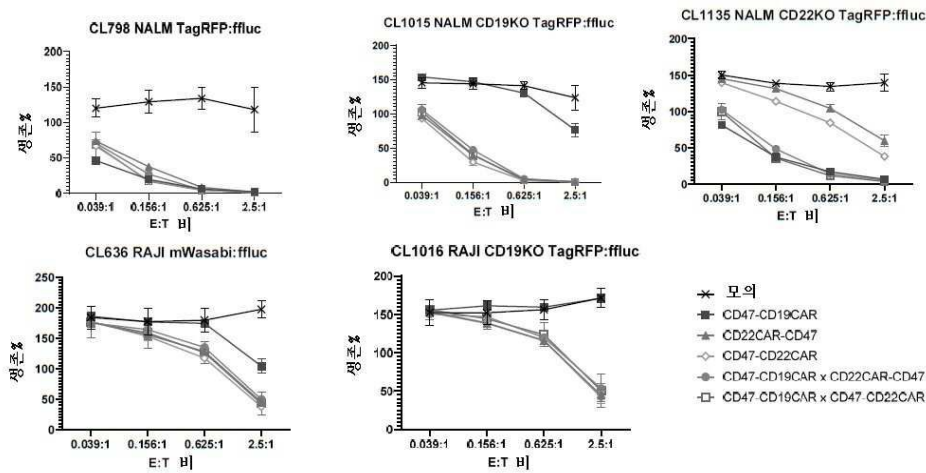


B

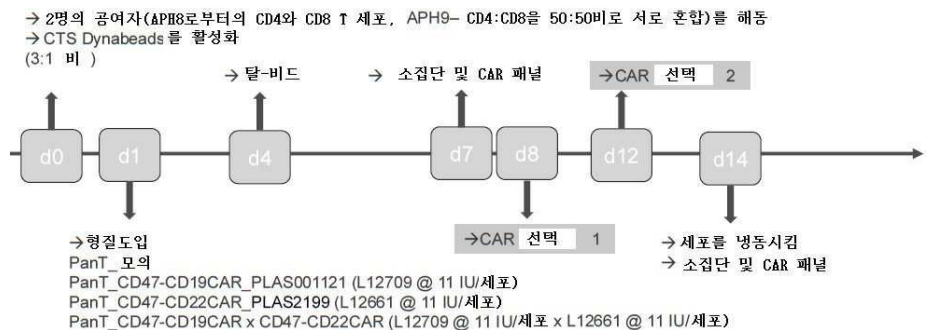
도면22



도면23



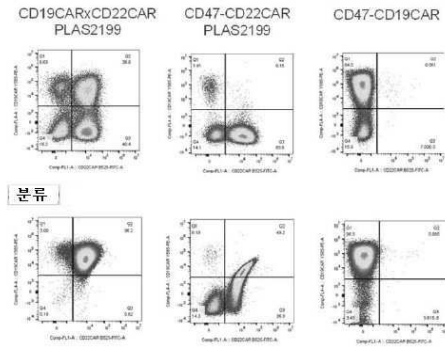
도면24



도면25

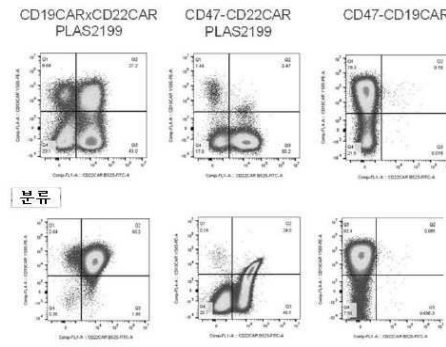
LIVE>CD4

비-분류

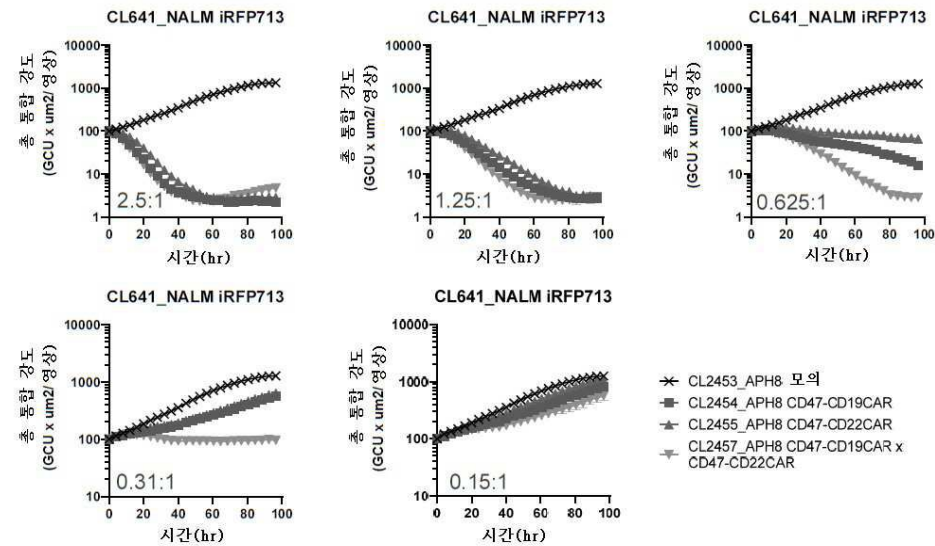


LIVE>CD8

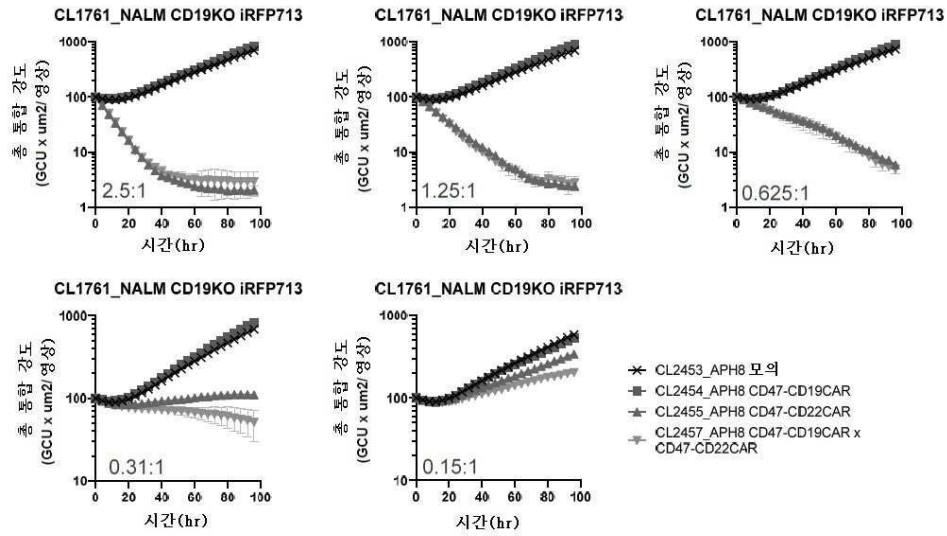
비-분류



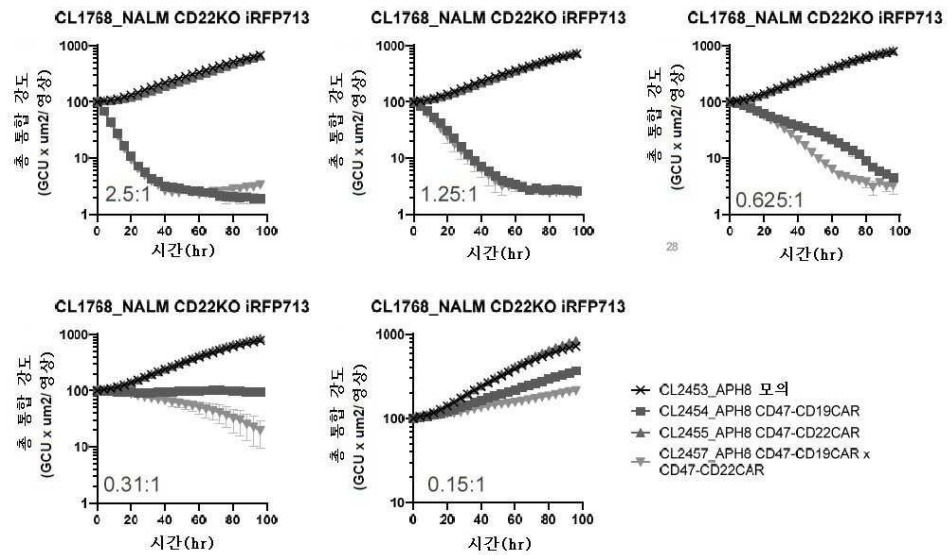
도면26



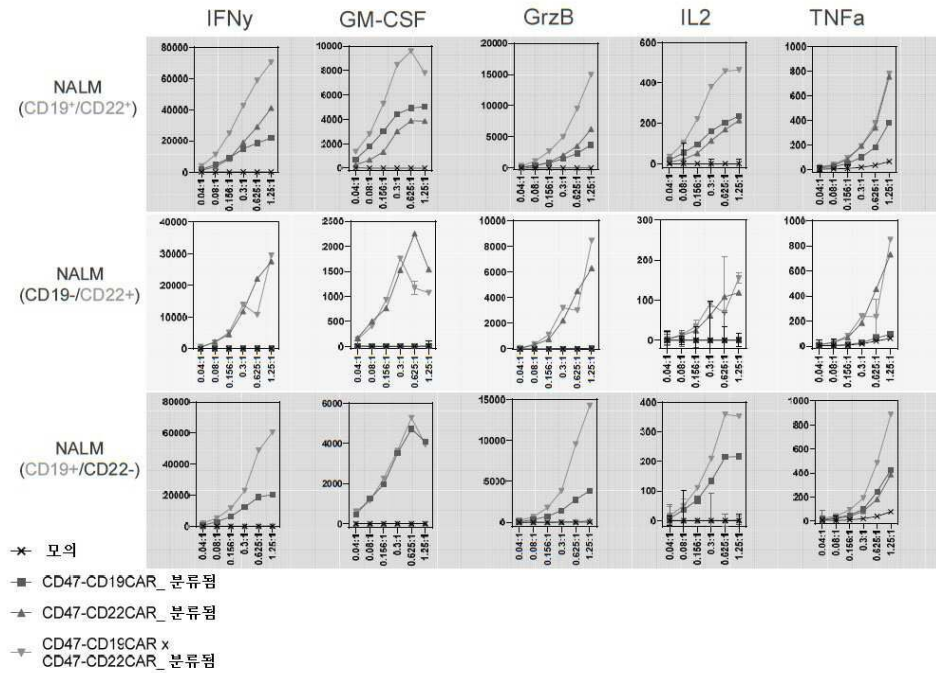
도면27



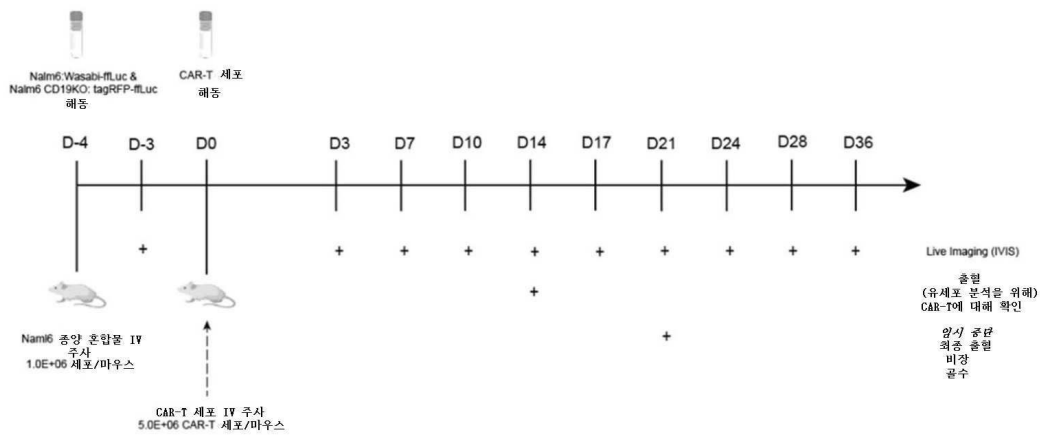
도면28



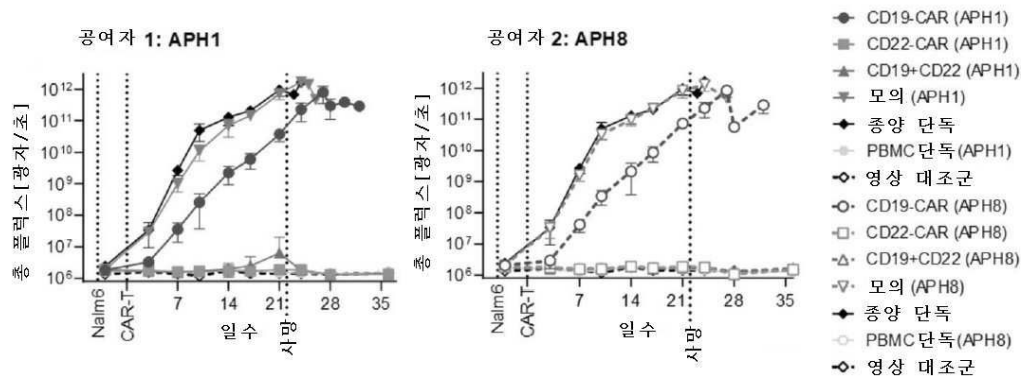
도면29



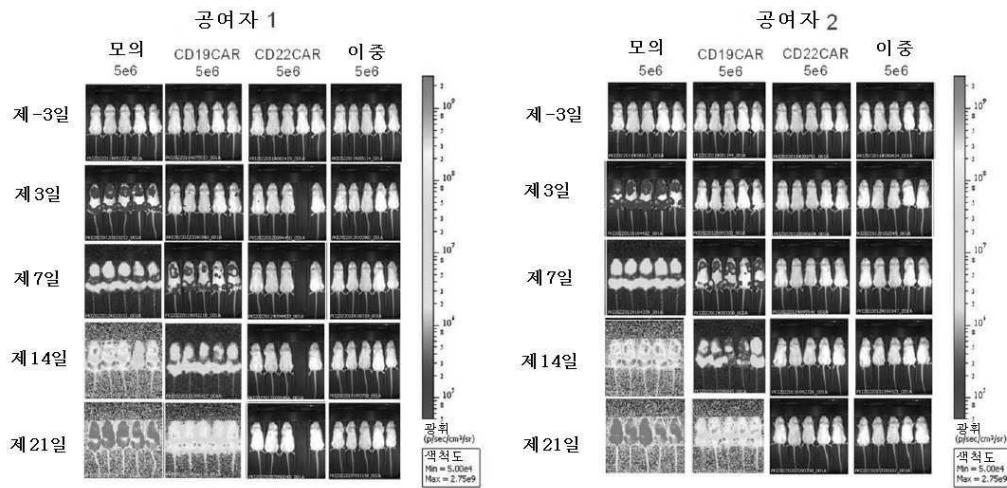
도면30



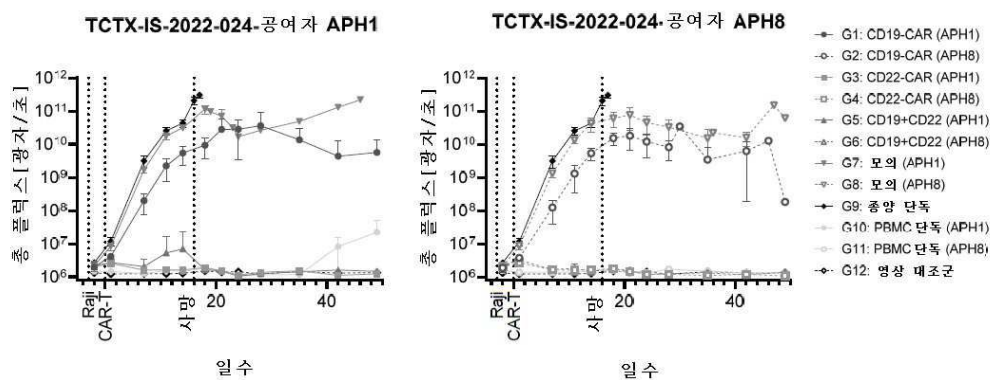
도면31



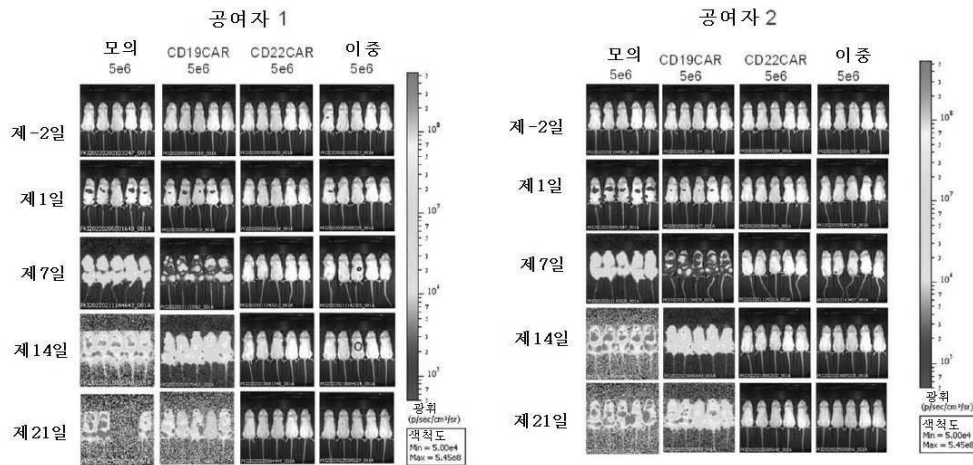
도면32



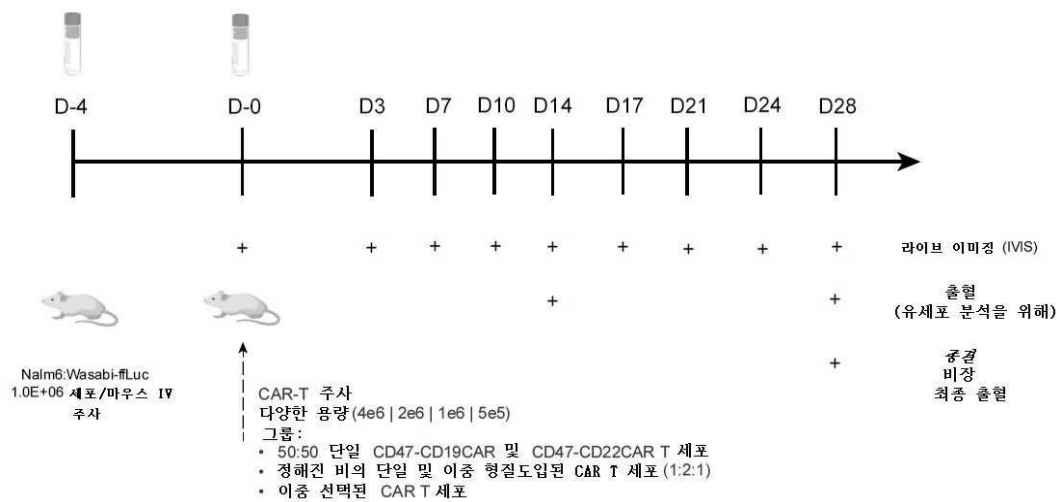
도면33



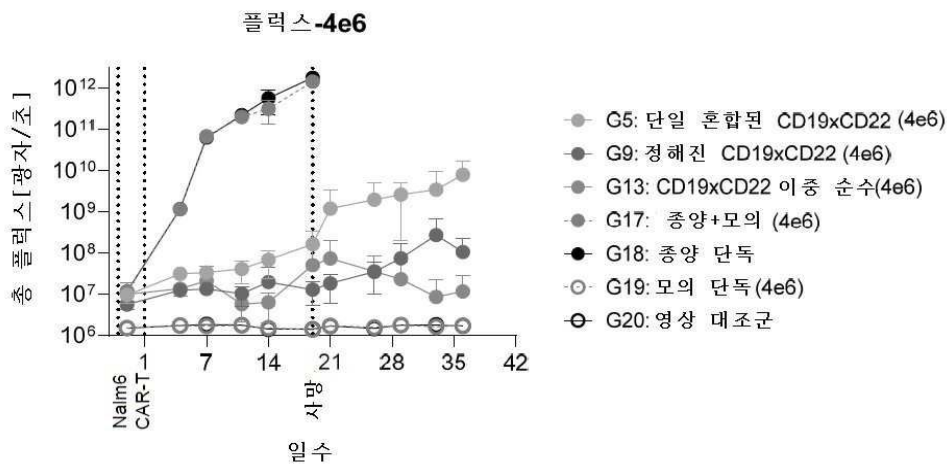
도면34



도면35



도면36



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.