

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0073729
(43) 공개일자 2022년06월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 31/18 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7005199
(22) 출원일자(국제) 2020년07월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/042567
(87) 국제공개번호 WO 2021/011882
국제공개일자 2021년01월21일
(30) 우선권주장
62/875,217 2019년07월17일 미국(US)
- (71) 출원인
케이스 웨스턴 리저브 유니버시티
미국 44106 오하이오주 클리블랜드 유클리드 애비뉴 10900
- (72) 발명자
세칼리 라픽-피에르
미국, 오하이오 44106, 클리블랜드, 10900 유클리드 애비뉴
샤르마 아시시
미국, 오하이오 44106, 클리블랜드, 10900 유클리드 애비뉴
제이단 조우마나
미국, 오하이오 44106, 클리블랜드, 10900 유클리드 애비뉴
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 HIV 감염 치료용 장기 생존 T 세포

(57) 요약

HIV 감염 대상을 치료하는 방법은 CD45A 및 CD45O(RA^{int}RO^{int})의 중간 세포 표면 공동 발현을 특징으로 하는 농축된 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4+ T 세포 집단을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/18 (2018.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C07K 14/70589 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 결여된 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단을 생성하는 방법; 다음을 포함하는 방법:

대상의 생물학적 샘플로부터 CD4/CD8 T 세포를 분리하는 단계;

CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단을 CD4/CD8 T 세포로부터 분리하는 단계; 그리고

CD4/CD8 T 세포를 수정하여 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단을 분리하기 전에 CD4/CD8 T 세포에는 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없게하고/하거나 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 분리된 CD4/CD8 T 세포 집단을 수정하여 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포에는 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 분리된 말초 혈액 단핵 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단리된 T-세포가 CD4+ T 세포인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단리된 T-세포가 CD8+ T 세포인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 분리된 CD4/CD8 T 세포가 CD95, CD127, 또는 CD27 중 적어도 하나를 발현하는 것인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 분리된 CD4/CD8 T 세포가 4-1BB를 중간 발현하는 것인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 분리된 CD4/CD8 T 세포가 IL17RA, CD5, IL2RG, IGF2R, SLC38A1, IL7R, SLC44A2, SLC2A3, CD96, CD44, CD6, CCR4, IL4R, 또는 SLC12A7 중 적어도 하나를 발현하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 분리된 CD4/CD8 T 세포가 CD45RA^{int}CD45RO^{int}CD95+CD127+CD27+ 표현형을 갖는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 분리된 CD4/CD8 T 세포가 CD45RA^{int}CD45RO^{int}CD95+CD127+CD27+IL7R+CD44+SCL38A1+IL2RG+CD6+CD5+ 표현형을 갖는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 단리된 CD4/CD8 T 세포를 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체로 활성화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제12항에 있어서, 단리된 CD4/CD8 T 세포를 CD45RA^{int} CD45RO^{int} 표현형을 갖는 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단의 확장 및/또는 형성을 촉진하는데 효과적인 양의 IL7 및 IL15로 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 12

제12항에 있어서, CD45RA^{int} CD45RO^{int} 표현형을 갖는 분리된 CD4/CD8 T 세포를 TGFβ^{hi}/IL12^{hi}를 포함하는 배양 배지에서 배양하여 CD45RA^{int} CD45RO^{int} 표현형을 유지하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 기능성 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동-수용체가 결여된 CD4/CD8 T 세포가 CCR5 및/또는 CXCR4를 코딩하는 유전자를 비활성화함으로써 변형되는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 단리된 T 세포가 형질도입, 형질감염 및/또는 전기천공 중 적어도 하나에 의해 유전적으로 변형되는 것인 방법.

청구항 15

단리된 농축된 CD4+ T 세포 집단으로서, T 세포 집단은 CD45A 및 CD450(RA^{int}RO^{int})의 중간 세포 표면 동시발현 및 CD95+, CD127+ 및 CD27+의 발현을 특징으로 하며, 여기서 세포는 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 변형된다.

청구항 16

제15항에 있어서, HIV에 감염된 대상체에 투여 시 절대 CD4 세포 수의 지속적인 증가, HIV 특이적 T 세포 면역 회복, 및 대상체의 HIV 저장소의 실질적인 붕괴 중 적어도 하나를 촉진할 수 있는 집단.

청구항 17

CD45A 및 CD450(RA^{int}RO^{int})의 중간 세포 표면 동시 발현을 특징으로 하는 농축 기억 줄기 세포(Tscm) CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4+ T 세포 집단) 및 CCR7+, CD27+, CD28+, CD95+, CD127+, CD58+ 및 CD95+의 발현을 포함하며, 여기서 유전자 편집된 세포는 기능적 CCR5 HIV 공동 수용체가 결여되어 있다.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항의 농축된 T 세포 집단을 대상체에 투여하는 것을 포함하는, HIV 감염 대상체를 치료하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 대상체가 항레트로바이러스 요법을 받았고/받거나 계속 받는 것인 방법.

청구항 20

제10항에 있어서, 농축된 T 세포 집단은 절대 CD4 세포 수의 지속적인 증가, HIV 특이적 T 세포 면역의 회복, 및 대상체에서 HIV 저장소의 실질적인 붕괴 중 적어도 하나를 촉진하기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여되는 방법.

청구항 21

CD45A 및 CD450(RA^{int}RO^{int})의 중간 세포 표면 동시발현을 특징으로 하는 농축된 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4+ T 세포 집단을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 HIV 감염된 대상체를 치료하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 대상체가 항레트로바이러스 요법을 받았고/받거나 계속 받는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 농축된 T 세포 집단은 절대 CD4 세포 수의 지속적인 증가, HIV 특이적 T 세포 면역의 회복, 및 대상체에서 HIV 저장소의 실질적인 붕괴 중 적어도 하나를 촉진하기에 효과적인 양으로 대상체에게 투여되는 방법.

발명의 설명

배경 기술

[0001] 본 출원은 2019년 7월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 62/875,217로부터 우선권을 주장하며, 그 내용 전체가 참조로 여기에 포함된다.

[0002] 잠재적으로 감염된 세포의 작은 풀의 존재는 항레트로바이러스 치료(ART: anti-retroviral treatment) 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV: human immunodeficiency virus) 근절을 중단하는 주요 장애물이었다. ART는 바이러스 복제를 지속적으로 억제할 수 있지만 HIV는 무기한 지속되므로 감염된 개인은 평생 복잡한 항레트로바이러스 약물 요법을 받아야 한다. 면역 기능을 재구성하는 ART의 능력은 매우 다양하다. 개인의 하위 집합(최대 45%)은 수년간의 효과적인 ART 후에도 CD4+ T 세포 수의 완전한 회복을 나타내지 못한다. 손상된 CD4+ T 세포 회복은 손상된 흥선 생성 및 항상성과 같은 다수의 숙주 관련 및 HIV 관련 인자와 연관되어 있다. ART 상의 개인의 낮은 CD4+ T 세포 수가 암 및 기타 질병의 위험 증가와 관련되어 있기 때문에 이러한 개인의 면역 기능을 향상시키기 위한 새로운 치료 방법이 필요하다.

[0003] 잠복 HIV 저장소를 모델링하는 연구는 특히 ART가 만성 감염 단계에서 시작된 개인에서 ART 개시 후 4년 동안 전체 및 통합 HIV DNA의 최소 붕괴가 있음을 보여주었다. 항상성 증식, 기능 장애 숙주 제거 기전 및 가능한 잔류 바이러스 복제에 의해 유지되는 장기 기억 CD4+ T 세포의 "잠재" 감염을 비롯한 여러 기전이 HIV 지속성에 기여한다. 흥미롭게도 이러한 모든 기전은 면역학적 무반응자에서 악화되고 더 높은 HIV 저장소 크기와 관련이 있다. 따라서 CD4+ T 세포의 회복을 향상시키는 것은 ART 동안 HIV 저장소의 감소에 기여할 수 있다.

[0004] CCR5는 HIV 진입에 대한 주요 공동 수용체 중 하나이다. 동형접합 CCR5 Δ 32 일치 기증자로부터 CD34+ 줄기 세포의 동종이기에 골수 이식을 받은 이후로 HIV에 감염되지 않은 "베를린 환자"를 통해 HIV 감염 대상에게 CCR5 결핍 면역 구획을 제공하는 치료 개념이 입증되었다. 이러한 결과는 고무적이지만 덜 침습적이고 보다 광범위하게 적용 가능한 치료 전략이 바람직할 것이다. 한 가지 접근법은 자가 T 세포의 입양 전달을 통해 면역 기능을 재구성하는 것이고 이것은 거대세포바이러스(cytomegalovirus) 및 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스를 포함한 다른 바이러스 감염에 성공적으로 배치되었지만, 부분적으로는 CD4+ T 세포가 HIV 감염에 취약하기 때문에 HIV 감염에는 크게 실패하였다. HIV에 감염된 성인 그룹에서 쟁기 핑거 뉴클레아제(ZFN: zinc finger nuclease) 매개 CCR5 유전자 편집 CD4 T 세포(SB-728-T 제품)의 입양 전달을 수행한 최근 시험에서 이 주입이 안전하고 잘 견디는 것으로 나타났으며, CD4+ T 세포 수는 증가하고 HIV 저장소는 감소하였다.

발명의 내용

[0005] 본 명세서에 기재된 실시형태는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 유전자 변형 및/또는 변경된 CD4/CD8 T 세포인 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포(CD4/CD8 T 세포)의 장기간 농축된 집단과 HIV 감염 대상 체 및 특히 항레트로바이러스 요법을 받았거나 및/또는 계속 받고 있는 대상체의 잠복 HIV 감염을 치료하는데 있어서의 이들의 용도에 관한 것이다. 서브세트 CD4/CD8 T 세포는 수명이 긴 만능 줄기 세포의 표현형 및 분자적 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 다른 알려진 줄기 세포 집단과 마찬가지로 이 하위 집단 집단은 낮은 대사 프로파일(지방산 대사 및 산화적 인산화의 상향 조절, 세포 순환 경로의 하향 조절)을 갖고 자가 재생 능력을 유지하며 효과기 세포로 분화할 수 있다. 이 하위 집합은 주로 CD45RA 및 CD45RO(CD45RA^{int}CD45RO^{int})의 중간 공동 발현이 특징이다. CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 또한 CD95(Fas) CD127(IL7R) 및 CD27을 발현할 수 있다. 저용량의 사이토카인 IL-7 및 IL-15를 첨가하면 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 농축된 CD4/CD8 세포 집단이 형성될 수 있다; 반면 고용량의 사이토카인 IL-7 및 IL-15는 세포의 이펙터 분화로 이어질 수 있다.

- [0006] CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 유전적으로 변형될 수 있다. CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 자가 CD4/CD8 T 세포를 HIV 감염 대상에 투여하면 CD4⁺ T 세포 수의 지속적인 증가, 회복된 T 세포 항상성 및 대상에서 HIV 저장소 크기의 상당한 감소를 제공할 수 있다.
- [0007] 일부 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단을 생성하는 방법은 CD4/CD8 T 세포에 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 유전적으로 변형될 수 있으며, 이는 대상의 생물학적 샘플로부터 T 세포를 분리하는 것을 포함한다. 생물학적 샘플은 치료될 HIV가 있는 피험자의 말초혈액 단핵 세포와 같은 샘플, 즉, 치료될 피험자의 자가 T 세포를 함유하는 T 세포를 포함할 수 있다. 분리된 T 세포는 CD4⁺ T 세포 및/또는 CD8⁺ T 세포를 포함할 수 있다.
- [0008] CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단은 단리된 T-세포로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD4/CD8 T 세포는 분리된 T 세포에서 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 가지는 CD4/CD8 T 세포의 집단을 분리하기 전에 CD4/CD8 T 세포에 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 유전적으로 변형될 수 있다. 다른 구체예에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단은 단리된 T-세포로부터 분리된 후에 유전적으로 변형될 수 있고 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단은 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없다.
- [0009] 일부 실시양태에서, 단리된 CD4/CD8 T-세포는 세포에서 CCR5 및/또는 CXCR4를 코딩하는 유전자를 비활성화하기 위해 형질도입, 형질감염 및/또는 전기천공 중 적어도 하나에 의해 유전적으로 변형된다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 분리된 CD4/CD8 T 세포는 CD95, CD127, 또는 CD27 중 적어도 하나를 발현할 수 있다. 다른 구체예에서, 분리된 CD4/CD8 T 세포는 4-1BB를 중간적으로 발현할 수 있고 선택적으로 OX40을 발현할 수 있다.
- [0011] 다른 실시양태에서, 분리된 CD4/CD8 T-세포는 IL17RA, CD5, IL2RG, IGF2R, SLC38A1, IL7R, SLC44A2, SLC2A3, CD96, CD44, CD6, CCR4, IL4R 또는 SLC12A7 중 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 그 이상을 발현할 수 있다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 분리된 CD4/CD8 T 세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int}CD95⁺ CD127⁺CD27⁺ 표현형을 가질 수 있다. 다른 구체예에서, 분리된 T-세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int}CD95⁺ CD127⁺CD27⁺IL7R⁺CD44⁺ SLC38A1⁺IL2RG⁺CD6⁺CD5⁺ 표현형을 가질 수 있다.
- [0013] 다른 실시양태에서, 방법은 유전자 변형 및/또는 분리 전에 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체로 단리된 CD4/CD8 T 세포를 활성화하는 것을 포함할 수 있다. 활성화된 CD4/CD8 T 세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 가진 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단의 팽창 및/또는 형성을 촉진하는 데 효과적인 IL7과 IL15의 양으로 배양될 수 있다. 일단 분리되면, CD4/CD8 T-세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 유지하기 위해 TGFβ/IL15를 포함하는 배양 배지에서 배양될 수 있다.
- [0014] 본원에 기재된 다른 실시양태는 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단을 포함하는 조성물에 관한 것이다. CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8의 농축된 집단의 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% T 세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 가질 수 있다. 조성물 또는 강화된 T-세포 집단은 HIV 감염을 치료하기 위해 HIV 감염 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, HIV에 걸린 대상체에 조성물 또는 농축된 T-세포 집단의 투여는 절대 CD4 세포 수의 지속적인 증가, HIV 특이적 T 세포 면역의 회복, 및 대상체에서 HIV 저장소의 실질적인 붕괴 중 적어도 하나를 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 항레트로바이러스 요법을 받았고/받거나 계속 받고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단을 생성하는 방법을 예시하는 흐름도이다. 도 2(A-F)는 SB-728-T 주입 후 HIV 저장소의 붕괴가 CCR5 유전자 편집된 세포의 지속성과 상관관계를 나타내는

플롯을 예시한다. A, 기준선(BL), 주입 후 1년 및 2년에서 10^6 PBMC당 총 HIV DNA를 보유하는 세포의 빈도를 보여주는 중첩된 지터가 있는 박스 플롯. 박스는 중앙값, 첫 번째 및 세 번째 사분위수를 보여주고 수염은 최대값과 최소값으로 확장된다. 개별 데이터 포인트는 9명의 참가자 모두에 대해 서로 다른 집단에 해당하는 색상으로 표시된다(집단 1, 2 및 3은 각각 파란색, 녹색 및 빨간색 색조로 표시됨). 피험자 1-01 및 1-02에 대한 BL 값은 재료 및 방법에 설명된 대로 전가되었다. * $P < 0.05$; Wilcoxon 순위합 검정. B, 10^6 정제된 CD4+ T 세포당 통합된 HIV DNA 사본의 빈도는 BL 및 2-3년(장기 추적 조사)에 표시된다. 집단 1, 2 및 3의 참가자는 각각 파란색, 녹색 및 빨간색 기호로 표시된다. * $P < 0.05$; Wilcoxon 순위합 검정. CD, 장기 시점에서 총 HIV DNA를 보유하는 PBMC의 빈도 변화(0일에 대한 720일에 $\log_{10}$ 값의 비율)와 21일(C) 및 연도에 Pentamer Duplication 표시된 세포의 배수 확장 사이의 연관성 주입 후 3-4(D). 강력한 회귀 모델의 산점도 및 예측은 95% 신뢰 구간(음영 처리된 영역)과 함께 표시된다. E, 비선형 혼합 효과 모델에서 매개변수 추정을 위한 소프트웨어인 Monolix를 사용한 HIV DNA(참가자 3-01)의 2상 붕괴 분석의 대표적인 예. 파란색 선은 10^6 PBMC(빨간색 별표로 표시)당 HIV DNA 사본에 대한 2상 지수 적합선을 나타낸다. 선은 각각 빠른 감쇠 및 느린 감쇠 및 느린 감쇠 단계가 끝난 후 도달한 고원을 나타낸다. 삼입물은 느린 위상 감쇠의 시작과 끝을 나타내는 두 교차점을 강조 표시한다. F, 주입 후 회석(참가자 3-01)의 결과로 예상되는 10^6 PBMC당 추정된 총 HIV DNA의 대표적인 예(빨간색 선). 10^6 PBMC당 총 HIV DNA의 측정된 빈도(파란색 선) 및 주입 후 10^6 PBMC당 총 CCR5 유전자 편집된 세포의 예상 빈도(보라색 선, 다음으로 계산된 Pentamer Duplication이 표시된 셀의 빈도를 4)로 곱한 값도 표시된다.

도 3(A-D)은 CCR5의 지속성에 기여하는 새로운 기억 줄기 세포 CD4+ T 세포 서브세트(CD95를 발현하는 CD45RA^{int}RO^{int} 세포)의 식별을 보여주는 그래프 및 플롯을 보여주며, 유전자 편집된 T 세포 및 총 CD4+ T 세포는 CD4+ T 세포 저장소에 최소한으로 기여한다. A, BL에서 CD4+ T 세포의 na⁺ve, T_{CM}, T_{TM}, T_{EM} 및 CD45RA^{int}RO^{int}의 빈도(주입 전 7일에서 3개월; $n=9$), 초기(14 내지 28일; $n=6$), 중반(4 내지 7개월; $n=7$) 및 장기 시점(3 내지 4년; $n=9$)로 주입 후 평균 분포를 나타내는 막대 차트. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Wilcoxon 순위합 검정. B, 14일 내지 4달($n=3$ 개의 하위 집합 모두에 대해 7), 6달 내지 8달(각각 $n=$ 각각 7, 7 및 6), 11달 내지 12달($n=$ 각각 7, 7 및 6) 및 3년 내지 4년 동안, 정렬된 T_{CM}, T_{TM} 및 T_{EM} 그리고 9달 내지 10달($n=$ 각각 6 및 5), 11달 내지 12달($n=$ 각각 3 및 5) 및 3년 내지 4년($n=$ 각각 7 및 8) 동안 CD45RA⁺T_{SCM} 및 CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM} 메모리 하위 집합에서 주입 후 측정된 10^6 셀당 Pentamer Duplication 마커의 중간 빈도. N/A = 완료되지 않음; 냉동보존된 PBMC의 한계는 초기 시점에서 T_{SCM} 하위 집합의 정량화를 방지하였다. C, 3-4년 샘플에서 CD4+ T 세포 HIV 저장소에 대한 각 하위 집합의 기여도를 나타내는 중첩된 지터가 있는 박스 그림($n=$ 세포 가용성의 제한으로 인해 8). 박스는 중앙값, 첫 번째 및 세 번째 사분위수를 보여주고 수염은 최대값과 최소값으로 확장된다. Wilcoxon 순위합 검정의 P 값이 표시된다. D, 3 내지 4년차에 CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM} 세포 수의 함수로서 주입 후 총 HIV DNA를 보유하는 PBMC의 빈도 변화를 보여주는 3차원 산점도(0일째에 대한 720일째 $\log_{10}$ 값의 비율), 3 내지 4년차에 CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}에서 Pentamer Duplication의 빈도 및 3 내지 4년차에 T_{EM}에서 Pentamer Duplication 빈도에 따른 CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}에서 Pentamer Duplication 빈도의 비율. 저장소 붕괴를 예측하기 위해 최소 선형 다변수 모델이 구축되었다. 최상의 저장소 붕괴를 예측하는 다변량 회귀 모델에는 세 가지 기능이 포함되어 있다: CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM} 3 내지 4년차의 세포 수(z 축), CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM} 3 내지 4년차의 $\log_{10}$ Pentamer Duplication 수준(x 축), CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}/T_{EM} 3 내지 4년차의 Pentamer Duplication 비율(y 축) 산점도의 각 점은 점 크기가 HIV DNA 720일/BL 비율에 비례하는 참가자에 해당하며 더 큰 붕괴는 더 작은 점 크기로 상징된다.

도 4(A-G)는 CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}이 이전에 식별된 CD45RA⁺T_{SCM} 세포들과 구별되는 것을 나타내는 표, 그래프 및 도표를 보여준다. A, 3 내지 4년차 샘플에서 T_{EM} 및 T_{CM} 과 비교하여 CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}에서 유도되거나 억제된 유

전자가 상당히 농축된 선택된 경로의 히트맵($n = 7$). 색상 구배는 T_{EM} 및 T_{CM} 과 비교하여 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 에 서 유도되거나 억제된 유전자가 농축된 경로의 GSEA 정규화된 농축 점수(NES 범위 -4 내지 +5)를 나타낸다($P < 0.05$). 선택된 경로는 여러 생물학적 기능으로 그룹화되었다; 세포 주기, 세포 대사, 사이토카인 신호전달, 노 치 신호전달 및 세포자멸사. B, DNA 시퀀싱에 의해 결정된 ZFN 매개 CCR5 돌연변이의 분포는 3 내지 4년차에 $CD4+ T$ 세포 하위 집합의 SB-728-T 제품에서 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}CCR7+CD27+$ 에 고유하게 존재한다($n = 5$). 박스 는 중앙값, 첫 번째 및 세 번째 사분위수를 보여주고 수염은 $1.5 \times IQR$ 의 거리까지 확장된다. 이상치는 점으로 표 시된다. C, 원형 및 막대 차트는 항-CD3/CD28 자극에 대한 반응으로 주입 후 3 내지 4년차에 $CD4+ T$ 세포 하위 집합에서 생성된 IFN- γ , IL-2 및 TNF- α 사이토카인의 빈도를 도시한다. 응답은 각 세포 하위 집합에 대해 평균 을 냈다($n = 6$). 원형 차트는 1, 2 또는 3개의 기능을 생성하는 세포의 비율을 나타낸다. 호는 IL-2, IFN- γ 및 TNF- α 에 대해 양성인 세포 집단을 식별한다. 막대 그래프는 사이토카인 생산의 다른 조합의 상대 빈도를 나타 낸다. D, 주입 후 3 내지 4년차에 $CD4+ T$ 세포 하위 집합에서 전사 인자 T-bet, Eomes, ROR γ t 및 GATA-3의 발 현을 나타내는 히스토그램($n = 7$). * $P < 0.05$; Wilcoxon 순위합 검정. E, 유클리드 거리를 사용하여 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 과 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ 하위 집합 간의 전사체 분산을 강조하는 다차원 스케일링(MDS: Multi-dimensional Scaling) 플롯. 첫 번째 차원은 두 T_{SCM} 하위 집합 간의 전사체 분산의 27%를 설명한다. $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 은 빨간색으로 표시되고 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ 은 녹색으로 표시된다($n = 7$). F, WNT 신호전달(반응통) 에 초점을 맞춘 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ 과 비교하여 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 이 상당히 농축된 유전자 세트 농축 분석(GSEA: Gene Set Enrichment Analysis)에 의해 확인된 경로의 히트맵. 사전 정의된 경로의 첨단을 사용하는 집합 유전자 세 트는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 하위 집합에서 이러한 유전자의 상당한 농축을 보여주었다. 척도는 각각 양성 및 음성 농축을 나타내는 빨간색 및 파란색 사각형으로 NES 점수를 나타낸다. 열은 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 및 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ 하 위 집합을 나타낸다. G, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 하위 집합 내에서 현저하게 농축된 최상위 첨단 유전자를 강조하는 공동 발현 네트워크. GeneMania 알고리즘은 네트워크 연결 및 공동 발현을 추론하는 데 사용되었다.

도 5(A 내지 H)는 ATI 이전에 편집된 T_{SCM} CCR5 유전자가 바이러스 부하의 제어와 상관관계를 나타내는 플롯을 예시한다. A, 22주차의 바이러스 부하(VL) 값(ATI의 16주에 해당) 및 참가자 차트에서 얻은 과거 ART 이전 바이 러스 설정점 값을 나타내는 플롯(연구 1101 집단 참가자 15명 중 14명에 대해 사용 가능한 데이터 1 내지 5). 확장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. Wilcoxon 순위합 검정의 P 값이 표시된다. B 내지 C, 피크 확 장(주입 후 1-3주) 동안 $CD4+ T$ 세포 수의 변화와 함께 22주와 ART 이전 바이러스 설정점 사이의 VL 변화 사이 의 Spearman 순위 상관 관계(B) 및 ATI(6주차) 전 10^6 PBMC당 "Pentamer Duplication" 마커의 빈도로(C). 확 장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. 점선은 95% 신뢰 구간을 나타낸다. 패널 d 내지 h에 표시된 면역 학적 및 바이러스학적 분석은 분석을 위해 냉동보존된 세포를 사용할 수 있었던 집단 3 내지 5의 참가자에 대해 수행되었다. d 내지 e, $CD4+ T$ 세포 하위 집합(naive, $CD45RA^{+}T_{SCM}$, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$, T_{CM} , T_{TM} 및 T_{EM})에 대해 DNA 시퀀싱에 의해 결정된 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도를 보여주는 오버레이 지터가 있는 박스 그림에 서 주입 후 6주(ATI 이전)(D) 및 주입 후 22주(ATI 종료)(E). 상자는 중앙값, 첫 번째 및 세 번째 사분위수를 보여주고 수염은 최대값과 최소값으로 확장된다. 확장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. $n = 7$; * $P < 0.05$; Wilcoxon 순위합 검정. F 내지 G, 22주차와 ART 이전 바이러스 설정점 사이의 (f) $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 및 (G) $CD45RA^{+}T_{SCM}$ ATI 이전의 세포 수(6주차)의 VL 변화 사이의 Spearman 순위 상관 관계 확장 ATI가 있는 참 가자는 빨간색으로 표시된다. 점선은 95% 신뢰 구간을 나타낸다. ($n = 8$, ATI를 확장한 참가자 01-060에 대해 과 거 사전 ART VL 설정점에 대한 데이터가 누락되어 VL 연관 분석에 포함되지 않음). H, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포 수의 함수로 VL(w22 - 과거 설정점)의 변화를 보여주는 3차원 산점도 및 개그 펩타이드 풀 자극 후 IL-2를 생성 하는 $CD8+ T_{TM}$ 세포의 빈도(각 참가자에 대한 최대 반응을 갖는 시점 사용; T_{max})($n = 8$). 다변수 선형 회귀 모델은 w6에서 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 수들, IFN- γ , TNF- α 를 생성하는 $CD8+ T$ 세포 하위 집합 및 주입 후 개그 펩 타이드 풀 자극 후 IL-2 사이토카인의 빈도를 통하여 구축되었다. VL의 최상의 변화를 예측하는 다변수 모델에

는 w6($P = 0.05$)에서 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 수들 및 $T_{max}((P = 0.02)$ 에서 IL-2를 생산하는 HIV-특이적 $CD8^{+}T_{TM}$ 세포들을 포함하였다.

도 6(A 내지 I)은 ATI 동안 T_{EM} 편집된 CCR5 유전자의 수준이 바이러스 부하의 제어 및 T_{EM} HIV 저장소의 더 낮은 재파종과 상관관계가 있음을 보여주는 플롯을 보여준다. A, 주입 후 6주 및 22주($n = 7$)에 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합에서 검출되는 SB-728-T 제품들에서 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}CCR7+CD27+(T_{SCM}$ 표현형)에 고유하게 존재하는 ZFN 유도 CCR5 돌연변이의 백분율을 보여주는 박스 그림. 박스는 중앙값, 첫 번째 및 세 번째 사분위수를 보여주고 수염은 $1.5 \times IQR$ 의 거리까지 확장된다. 이상치는 점으로 표시된다. B, CCR5 유전자 편집 $CD4^{+}T$ 세포 역학의 역학을 보여주는 개략도(전체 모델 세부사항 및 가정은 재료 및 방법 참조). 모델 매개변수는 연장된 ATI 기간을 가진 5명의 참가자의 5개 개별 피팅 결과의 기하 평균을 취하여 얻는다. 상자에 나열된 매개변수는 100,000개의 빈을 사용하여 MATLAB에서 수행된 민감도 분석 테스트에서 얻은 세포 집단 크기와 유의한 상관관계($\bar{A} \pm 0.5$)를 나타내는 매개변수를 나타낸다. C 내지 E, ATI 종료 시(22주차) CCR5 유전자 편집된 T_{EM} 세포 수 및 ATI 이전의 세포 수(6주차)의 CCR5 유전자 편집 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ (C), $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ (D), T_{CM} (E)의 세포 수의 Spearman 순위 상관 관계. 확장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. $n = 7$. F, BL에서 주입 후 6주 및 22주($n = 7$), T_{EM} 세포 내 통합된 HIV DNA의 빈도를 나타내는 중첩된 지터가 있는 상자 그림. 상자는 중앙값, 첫 번째 및 세 번째 사분위수를 보여주고 수염은 최대값과 최소값으로 확장된다. 모든 참가자에 대해 점과 선이 표시된다. 확장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. Wilcoxon 순위합 검정의 P 값이 표시된다. G 내지 H, 바이러스혈증(22주차) 동안 T_{EM} 내에서 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도, 22주차(ATI 후 16주차) 사이의 바이러스 부하 변화, 역사적인 pre-ART 바이러스 설정점(G) 및 int.HIV DNA를 포함하는 T_{EM} 세포의 6주에서 22주 사이의 주파수 변화(H) 사이의 Spearman 순위 상관 관계. 확장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. 점선은 95% 신뢰 구간을 나타낸다. $n = 6$; ATI를 확장한 참가자 01-060에 대한 과거 사전 ART VL 설정점에 대한 데이터가 누락되어 VL 연관 분석에 포함되지 않았다. I, Int. HIV DNA를 포함하는 T_{EM} 세포의 6주에서 22주 사이의 주파수 변화 및 22주차(ATI 후 16주)의 바이러스 부하 수준 사이의 Spearman 순위 상관 관계. 확장 ATI가 있는 참가자는 빨간색으로 표시된다. 점선은 95% 신뢰 구간을 나타낸다. $n = 8$.

그림 7은 기준선에서 SB-728-0902 연구 참가자의 HIV 저장소 크기를 보여주는 그림을 보여준다. 기준선(BL)에서의 $CD4^{+}T$ 세포 수와 정제된 $CD4^{+}T$ 세포에서 측정된 BL에서의 통합된 HIV DNA 수준 간의 상관관계. Spearman의 $\rho(p)$ 테스트가 사용되었다. 점선은 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 8(A 내지 E)는 단일 SB-728-T 주입이 총 $CD4^{+}T$ 세포 수의 지속적인 증가, $CD4:CD8$ 비율의 개선, 및 CCR5 유전자 편집된 세포의 장기간 지속성을 야기함을 예시한다. A, $CD4^{+}T$ 세포 수는 기준선(BL, 주입 7일 전), 14일, 3, 6, 12달에 표시되며, 2년차 및 마지막 후속 조치 3년 내지 4년차를 포함한 장기 추적 관찰 시점에 대해서도 표시된다. 평균은 검은색 선으로 표시된다. Wilcoxon 서명 순위 테스트 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 패널 A-C의 경우 집단 1($\sim 1E10$ 주입된 세포)의 참가자는 파란색 기호로, 집단 2($\sim 2E10$ 주입된 세포)는 녹색 기호로, 집단 3($\sim 3E10$ 주입된 세포)은 빨간색 기호로 표시된다. B, $CD4:CD8$ 비율은 BL, 14일, 3, 6, 12개월, 2년 및 3 내지 4년에 표시된다. 평균은 검은색 선으로 표시된다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Wilcoxon 서명 순위 테스트. C, 주입 후 Pentamer Duplication으로 표시된 $CD4^{+}T$ 세포의 배수 확장은 추적 기간 동안 9명의 연구 참가자 모두에 대해 재료 및 방법에 설명된 대로 추정되었다. 회색 영역은 접힘 변형이 1 미만인 데이터 포인트를 나타낸다. D, 주입 후 직장 생검에서 10^6 단핵 세포당 Pentamer Duplication(유전자 편집된 세포의 마커)의 오버레이 지터가 있는 박스 그림. 박스 그림은 75번째(위쪽 가장자리), 중앙값(상자 안의 실선) 및 25번째 백분위수(아래쪽 가장자리)를 보여준다. 수염은 최소값에서 최대값으로 그려진다. E, Pentamer Duplication 마커가 LNCM에서 정량화된 3명의 개인에 대한 주입 후 10^6 PBMC(검은색 원)당 Pentamer Duplication 마커 및 림프절 생검(LNCM; 사각형)의 단핵 세포 그림.

도 9(AC)는 SB-728-T 제품의 특성을 나타내는 그림을 보여준다. A, 제조 전 백혈구 성분채집 샘플(BL) 및 제조 후(SB-728-T 제품)에서 정제된 $CD4^{+}T$ 세포의 통합 HIV DNA 수준. Wilcoxon 부호 있는 순위 검정 P 값이 표시된다. 살아있는 $CD3^{+}CD4^{+}$ 세포는 $na^{\uparrow}ve$ ($CD45RA+CD45RO-CCR7+CD27+$), $CD45RA^{int}CD45RO^{int}T_{SCM}$ 유사 세포, T_{CM} ($CD45RA-CD45RO+CCR7+CD27+$), T_{TM} ($CD45RA-CD45RO+CCR7-CD27+$), T_{EM} ($CD45RA-CD45RO+CCR7-CD27-$) 및 $CD45RA-$

CD45RO⁺CCR7⁺CD27⁻ 하위 집합을 식별하기 위해서 CD45RA 및 CD45RO에 게이팅된 후 CCR7 및 CD27에 게이팅되었다. B, SB-728-T 제품에서 관찰된 CD4⁺ T 세포 하위 집합의 빈도. 선은 평균과 표준 편차를 나타낸다. C, 다양한 CCR5 ZFN 유도 돌연변이의 DNA 시퀀싱으로 측정한 SB-728-T 제품의 CD4⁺ T 세포 하위 집합 내의 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도. 선은 평균과 표준 편차를 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Wilcoxon 서명 순위 테스트.

도 10(A 내지 F)는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 및 CD45RA⁺CD45RO⁻ 하위집합에서 CD58⁺CD95⁺ 세포의 빈도가 주입 후 증가하며 CCR5 유전자 편집 세포의 지속성에 기여하는 것을 보여주는 그림을 예시한다. A 내지 B, CD45RA^{int}CD45RO^{int} CCR7⁺CD27⁺CD127⁺CD28⁺ (CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}; A) 및 CD45RA⁺CD45RO⁻ CCR7⁺CD27⁺CD127⁺CD28⁺ (CD45RA⁺ T_{SCM}; B) 하위 집합 BL ($n = 6$)에서 주입 후 중간(6 내지 8개월, $n = 5$), 후기(9 내지 11개월, $n = 5$), 장기 시점(3 내지 4년, $n = 6$) CD58 및 CD95를 발현하는 세포의 평균 빈도를 보여주는 히스토그램. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 만-휘트니 테스트. C 내지 D, 3 내지 4년차에 CD45RA⁺RO⁻ 및 CD45RA^{int}RO^{int} 하위 집합 내 CD58⁺CD95⁺ 세포의 빈도는 장기간 시점에서 PBMC에서 CCR5 유전자 편집된 CD4⁺ T 세포의 추정 배수 확장과 상관관계가 있었다(주입된 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 수(용량)에 비해 3 내지 4년차에 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 수). E, CD45RA⁺RO⁻ CCR7⁺CD27⁺CD127⁺CD28⁺ CD58⁺CD95⁺ (CD45RA⁺RO⁻ T_{SCM}이라고 함) 및 CD45RA⁺RO⁻ CCR7⁺CD27⁺CD127⁺CD28⁺ CD58⁻CD95⁻ (나이브라고 함)의 BL에서의 세포 수(주입 전 최대 3개월), 및 BL 분석이 수행된 6명의 대상에 대한 주입 후 중반(6개월), 후기(8 내지 11개월) 및 장기 시점(3 내지 4년)의 종단 분석. F, CD45RA^{int}RO^{int} CCR7⁺CD27⁺CD127⁺CD28⁺ CD58⁺CD95⁺ (CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}이라고 함) 및 CD45RA^{int}RO^{int} CCR7⁺CD27⁺CD127⁺CD28⁺ CD58⁻CD95⁻ (CD45RA^{int}RO^{int} CD95⁻이라고 함)의 BL에서의 세포 수(주입 전 최대 3개월), 및 BL 분석이 수행된 6명의 대상에 대한 주입 후 중반(6개월), 후기(8 내지 11개월) 및 장기 시점(44개월까지)의 종단 분석.

도 11은 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포는 다른 메모리 하위 집합에 비해 CCR5 유전자 편집 대립 유전자의 수준이 더 높다는 나타내는 그림을 보여준다. 다양한 CCR5 ZFN-유도 돌연변이의 DNA 시퀀싱으로 측정한 주입 후 2 내지 4년차에 분류된 CD4⁺ T 세포 하위 집합 내의 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도의 오버레이된 지터가 있는 박스 플롯. 선은 평균과 표준편차를 나타낸다. 박스 그림은 75번째(위쪽 가장자리), 중앙값(상자 안의 실선) 및 25 번째 백분위수(아래쪽 가장자리)를 보여준다. 수염은 최소값에서 최대값으로 그려진다. Wilcoxon 부호 있는 순위 검정 P 값이 표시된다.

도 12(A 내지 B)는 CCR5 유전자 편집된 T 세포는 T 세포의 다종종 비편향 재구성에 기여하는 것을 나타내는 그림을 보여준다. A, 제조 전 샘플(BL 백혈구 성분채집 샘플에서 정제된 CD4⁺ T 세포, $n = 4$), SB-728-T 제품($n = 4$)의 TCR 다양성을 보여주는 막대 플롯, 정제된 CD4⁺ T 세포 7일째(CCR5 유전자 편집 세포 확장의 피크)($n = 3$) 및 주입 후 7 내지 9개월($n = 4$). Shannon Entropy Index는 TCR 클론의 다양성을 측정하는 데 사용되었다. NA= 이 시점에서 샘플을 사용할 수 없다. B, SB-728-T 제품의 CD4⁺ T 세포 하위 집합에서 CCR5 유전자 편집 대립형질의 다양성과 주입 후 장기간 시점(3 내지 4년)의 하위 집합의 다양성($n = 8$) 새넌 엔트로피 지수. 선은 평균과 표준편차를 나타낸다. Wilcoxon 부호 있는 순위 검정 P 값이 표시된다.

도 13(A 내지 B)는 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포는 전체 HIV 저장소의 미미한 기여자임을 보여주는 그래프를 예시한다. SB-728-T 제품에서 정렬된 CD45RA⁻CD45RO⁺ 하위 집합 (T_{CM}, $n = 9$; T_{TM}, $n = 8$; T_{EM}, $n = 9$; 및 CCR7⁺CD27⁻, $n = 9$), 및 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 하위 집합 (total CD45RA^{int}CD45RO^{int}, $n = 9$; 및 CD45RA^{int}CD45RO^{int} CCR7⁺CD27⁺, $n = 9$) (A), 및 주입 후 3 내지 4년 후 정렬된 CD45RA⁻CD45RO⁺ 하위 집합 ((T_{CM}, $n = 8$; T_{TM}, $n = 7$; 및 T_{EM}, $n = 8$), CD45RA^{int}CD45RO^{int} 하위 집합 (CD95⁺; CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}, $n = 8$; 및 CD95⁻, $n = 8$), 및 CD45RA⁺CD45RO⁻ 하위 집합 (CD95⁺; CD45RA⁺ T_{SCM}), $n = 6$; 및 CD95⁻; Naive, $n = 7$) (B)의 통합된 HIV DNA의 평균 수준을 나타내는 히스토그램(log10 복사/10⁶ 세포) 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. * $P < 0.05$ **; $P <$

0.01; Wilcoxon 서명 순위 테스트.

도 14(A 내지 B)는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포가 이전에 설명된 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ 하위 집합과 별개의 집단을 구성하는 것을 보여주는 그림을 예시한다. A, 다차원 스케일링(MDS 그림)을 사용하여 주입 후 3 내지 4년에 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합의 전사체 변이를 강조하여 표시하였다. 유클리드 거리가 사용되었으며 ANOVA(분산 분석, F-검정, $n = 3358$ 전사체, $P > 0.05$)에 기반한 상위 변이 유전자의 차원 축소가 표시되었다. 첫 번째 차원은 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합 간의 분산의 50%를 설명한다. 다른 하위 집합은 $n =$ 세포 하위 집합당 7개의 샘플로 다른 기호로 표시된다. B, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 과 $CD45RA^{+}T_{SCM}$, T_{CM} , or T_{EM} 사이에서 차등적으로 발현된 유전자의 수(DEG; $P < 0.05$)를 나타내는 막대 그림.

도 15(A 내지 B)는 1101 연구에서 SB-728-T 주입 후 분석 치료 중단(ATI)을 겪은 대상체의 바이러스 부하를 보여주는 그림을 예시한다. A, 1101 임상 시험 요약. 피험자들은 주입 2일 전에 사전 컨디셔닝된 사이토산(CTX)의 증량 용량을 받았다. 피험자는 16주 간격으로 주입 후 6주에 ATI를 받았다. B, 바이러스 부하(VL)는 22주차까지 ART를 재개한 9명의 대상 및 ATI가 연장된 6명의 대상(VL이 10,000 복사/mL 미만으로 유지되고 $CD4^{+}T$ 세포 수가 500 세포/ μl 이상임)에 대해 표시된다. 빨간색 선은 ART 재개를 나타낸다.

도 16(A 내지 B)은 1101 연구에서 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합 분포 및 주입 후(6주차) 및 치료 중단 후(22주차) 세포 수를 보여주는 그림을 예시한다. $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합의 빈도(A) 및 세포 수(B)(naive, $CD45RA^{+}T_{SCM}$, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$, T_{CM} , T_{TM} 및 T_{EM})는 주입 후 6주(ATI 전) 및 주입 후 22주(ATI 종료)에 표시된다; $n = 9$. Wilcoxon 부호 있는 순위 검정 P 값이 표시된다.

도 17은 1101 연구에서 ATI 후 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합에서 CCR5 유전자 편집된 세포의 빈도를 예시한다. DNA 시퀀싱에 의해 결정된 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도는 ATI를 최소 12개월까지 연장한 참가자의 경우 6주(ATI 전), 22주, 7 내지 8개월 및 12개월 후(ATI 동안)에 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합($CD45RA^{+}T_{SCM}$, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$, T_{CM} , 및 T_{EM})에 대해 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 달리 정의되지 않는 한, 여기에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0017] 여기에서 사용된 다음 용어 각각은 이 섹션에서 관련된 의미를 갖는다.
- [0018] 관사 "a" 및 "an"은 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 둘 이상(*i.e.*, 적어도 하나)을 나타내기 위해 여기에서 사용된다. 예를 들어, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.
- [0019] 양, 시간적 지속시간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때 본 명세서에서 사용된 "약"은 명시된 값에서 $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ 또는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미하며, 명시된 값에서 $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ 또는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미한다. 왜냐하면, 이러한 변동은 개시된 방법을 수행하는 데 적합하기 때문이다.
- [0020] 본원에 사용된 "활성화"는 검출가능한 세포 증식을 유도하기에 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 유도된 사이토카인 생산 및 검출 가능한 이펙터 기능과 연관될 수 있다. "활성화된 T 세포"라는 용어는 무엇보다도 세포 분열을 겪고 있는 T 세포를 의미한다.
- [0021] 본 명세서에 사용된 용어 "항체"는 항원 상의 특정 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 의미한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 온전한 면역글로불린일 수 있고 온전한 면역글로불린의 면역활성 부분일 수 있다. 항체는 일반적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 본 발명의 항체는 예를 들어 다클론 항체, 단클론 항체, Fv, Fab 및 F(ab)₂, 뿐만 아니라 단일 사슬 항체 및 인간화 항체(Harlow et al., 1988, Houston et al., 1988, Bird et al., 1988)를 비롯한 다양한 형태로 존재할 수 있다.
- [0022] 본원에 사용된 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발하는 분자로 정의된다. 이 면역 반응은 항체 생산 또는 특정 면역학적으로 적합한 세포의 활성화 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 숙련된 기술자는 사실상 모든 단백

질 또는 펩티드를 포함하는 모든 거대분자가 항원으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 당업자는 뉴클레오타이드 서열 또는 면역 반응을 유발하는 단백질을 코딩하는 부분 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 따라서 그 용어가 본원에서 사용되는 "항원"을 코딩한다는 것을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오타이드 서열에 의해서만 코딩될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 이상의 유전자의 부분적 뉴클레오타이드 서열의 사용을 포함하지만 이에 제한되지 않는 것과 이러한 뉴클레오타이드 서열은 원하는 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것이 쉽게 명백하다. 더욱이, 숙련된 기술자는 항원이 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 전혀 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 합성될 수 있거나 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다는 것은 쉽게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다.

- [0023] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "자가"는 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 의미하며, 이는 나중에 개체 내로 재도입된다.
- [0024] "동종"은 같은 종의 다른 동물에서 파생된 이식편을 나타낸다. "이종"은 다른 종의 동물에서 파생된 이식편을 나타낸다.
- [0025] 본원에 사용된 "유효량"은 치료적 또는 예방적 이점을 제공하는 양을 의미한다.
- [0026] 본원에 사용된 용어 "발현"은 그의 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로 정의된다.
- [0027] 여기에 사용된 용어 "특이적으로 결합하는"은 다른 분자 또는 특징을 인식하고 결합하지만 샘플의 다른 분자 또는 특징을 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체와 같은 분자를 의미한다.
- [0028] 본 명세서에서 "억제하다"라는 용어는 분자, 반응, 상호작용, 유전자, mRNA 및/또는 단백질의 발현, 안정성, 기능 또는 활성을 측정 가능한 양만큼 감소시키거나 완전히 방지하는 것을 의미한다. 억제제는, 예를 들어, 결합, 부분적으로 또는 전체적으로 자극 차단, 감소, 방지, 활성화 지연, 비활성화, 둔감시키거나 단백질, 유전자, mRNA 안정성, 발현, 기능 및 활성, 예를 들어, 길항제를 하향 조절시키는 화합물들이다.
- [0029] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되며 선형 또는 원형 형태, 및 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 이들 용어는 중합체의 길이와 관련하여 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이 용어는 천연 뉴클레오타이드의 알려진 유사체 뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 인산염 모이어티(예: 포스포로티오에이트 골격)에서 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일반적으로 특정 뉴클레오타이드의 유사체는 동일한 염기쌍 특이성을 가지고 있습니다. 즉, A의 유사체는 T와 염기쌍을 이룰 것이다.
- [0030] "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 또한 하나 이상의 아미노산이 상응하는 자연 발생 아미노산의 화학적 유사체 또는 변형된 유도체인 아미노산 중합체에 적용된다.
- [0031] "결합"은 거대분자 간의 서열 특이적, 비공유 상호작용(예: 단백질과 핵산 또는 2개의 핵산 사이)을 의미한다. 상호 작용 전체가 시퀀스 특이적인 한, 결합 상호작용의 모든 구성요소가 서열 특이적일 필요는 없다(예: DNA 백본에 있는 인산염 잔기와 접촉). 이러한 상호작용은 일반적으로 10^{-6} M^{-1} 이하의 해리 상수(K_d)를 특징으로 한다. "친화도"는 결합의 강도를 나타낸다: 증가된 결합 친화도는 더 낮은 K_d 와 상관관계가 있다.
- [0032] "키메라 RNA", "키메라 가이드 RNA", "가이드 RNA", "단일 가이드 RNA" 및 "합성 가이드 RNA"라는 용어는 상호 교환적으로 사용되며 가이드 서열, tracr 서열 및 tracr 메이트 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. "가이드 서열"이라는 용어는 약 10-30(10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) 대상 사이트를 지정하고 "가이드" 또는 "스페이서"라는 용어와 같은 의미로 사용할 수 있는 가이드 RNA 내의 염기쌍 서열을 나타낸다. 용어 "tracr 메이트 서열"은 또한 용어 "직접 반복부(들)"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0033] "상보성"은 전통적인 Watson-Crick 또는 기타 비전통적인 유형에 의해 다른 핵산 서열과 수소 결합을 형성하는 핵산의 능력을 나타낸다. 상보성 백분율은 두 번째 핵산 서열(예: 10 중 5, 6, 7, 8, 9, 10은 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% 보완적)과 수소 결합(예: Watson-Crick 염기 쌍)을 형성할 수 있는 핵산 분자의 잔기 백분율

을 나타낸다. "완전히 상보적인"은 핵산 서열의 모든 인접 잔기가 두 번째 핵산 서열에서 동일한 수의 인접 잔기와 수소 결합한다는 것을 의미한다. 본원에 사용된 "실질적으로 상보적인"은 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%인 상보성의 정도를 지칭한다. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 뉴클레오타이드의 영역에 걸쳐 97%, 98%, 99% 또는 100%는 엄격한 조건에서 교배되는 두 개의 핵산을 가리킨다.

[0034] "결합 단백질"은 다른 분자에 결합할 수 있는 단백질이다. 결합 단백질은 예를 들어 DNA 분자(DNA-결합 단백질), RNA 분자(RNA-결합 단백질) 및/또는 단백질 분자(단백질-결합 단백질)에 결합할 수 있다. 단백질 결합 단백질의 경우, 그것은 그 자체에 결합할 수 있고(동종이량체, 동종삼량체 등을 형성하기 위해) 및/또는 상이한 단백질 또는 단백질의 하나 이상의 분자에 결합할 수 있다. 결합 단백질은 하나 이상의 결합 활성 유형을 가질 수 있다. 예를 들어, 징크 핑거 단백질은 DNA 결합, RNA 결합 및 단백질 결합 활성을 가지고 있다.

[0035] "징크 핑거 DNA 결합 단백질"(또는 결합 도메인)은 아연 이온의 배위를 통해 구조가 안정화된 결합 도메인 내의 아미노산 서열 영역인 하나 이상의 징크 핑거를 통해 서열 특이적 방식으로 DNA에 결합하는 단백질 또는 더 큰 단백질 내의 도메인이다. 징크 핑거 DNA 결합 단백질이라는 용어는 종종 징크 핑거 단백질 또는 ZFP로 축약된다.

[0036] "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"은 하나 이상의 TALE 반복 도메인/단위를 포함하는 폴리펩타이드이다. 반복 도메인은 동족 표적 DNA 서열에 대한 TALE의 결합에 관여한다. 단일 "반복 단위"("반복"이라고도 함)는 일반적으로 길이가 33-35개 아미노산이고 자연 발생 TALE 단백질 내에서 다른 TALE 반복 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다.

[0037] 징크 핑거 및 TALE 결합 도메인은 예를 들어 자연 발생 징크 핑거 또는 TALE 단백질의 인식 나선 영역의 조작(하나 이상의 아미노산 변경)을 통해 미리 결정된 뉴클레오타이드 서열에 결합하도록 "조작"될 수 있다. 따라서 조작된 DNA 결합 단백질(징크 핑거 또는 TALE)은 자연적으로 발생하지 않는 단백질이다. DNA-결합 단백질을 조작하는 방법의 비제한적 예는 설계 및 선택이다. 디자인된 DNA 결합 단백질은 디자인/구성이 주로 합리적인 기준에서 비롯되는 자연에서 발생하지 않는 단백질이다. 디자인을 위한 합리적인 기준에는 기존 ZFP 및/또는 TALE 디자인의 정보와 바인딩 데이터를 저장하는 데이터베이스에서 정보를 처리하기 위한 대체 규칙 및 컴퓨터 알고리즘의 적용이 포함된다. 예를 들어, 미국 특허번호. 8,586,526 6,140,081; 6,453,242; 및 6,534,261; 또한 WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496.

[0038] "선택된" 징크 핑거 단백질 또는 TALE은 자연에서 발견되지 않는 단백질로, 주로 파지 디스플레이, 상호 작용 트랩 또는 하이브리드 선택과 같은 경험적 과정에서 생성된다. 예를 들어, 미국 특허번호. 8,586,526; 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; 또한 WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084.

[0039] "재조합"은 두 폴리뉴클레오타이드 간의 유전 정보 교환 과정을 의미한다. 본 개시내용의 목적을 위해, "상동성 재조합(HR)"은 예를 들어 상동성-지향 수선 메커니즘을 통한 세포의 이중 가닥 파손의 수선 동안 발생하는 이러한 교환의 특수화된 형태를 지칭한다. 이 과정은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하며, "표적" 분자의 주형 복구를 위해 "공여자" 분자를 사용하고(즉: 이중 가닥 파손을 경험한 분자), 공여자로부터 표적으로 유전 정보를 전달하기 때문에 "비교자 유전자 전환" 또는 "단기 유전자 전환"으로 다양하게 알려져 있다. 임의의 특정 이론에 구속되기를 바라지 않고, 그러한 전달은 파손된 표적과 공여자 사이에 형성되는 이중이중체 DNA의 불일치 수정 및/또는 "합성-의존 가닥 어닐링"을 포함할 수 있다. 여기서 공여자가 표적 및/또는 관련 과정의 일부가 될 유전 정보를 재합성하는 데 사용된다. 이러한 특수화된 HR은 종종 공여체 폴리뉴클레오타이드의 서열의 일부 또는 전부가 표적 폴리뉴클레오타이드에 통합되도록 표적 분자의 서열의 변경을 초래한다.

[0040] 본 개시내용의 방법에서, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제(예: CRISPR/Cas)는 표적 서열(예: 세포 염색질)이 미리 결정된 부위에 있고, 파손 부위의 뉴클레오타이드 서열과 상동성을 갖는 "공여자" 폴리뉴클레오타이드가 세포 내로 도입될 수 있다. 이중 가닥 파손의 존재는 공여자 서열의 통합을 용이하게 하는 것으로 나타났다. 공여자 서열은 물리적으로 통합될 수 있거나, 대안적으로 공여자 폴리뉴클레오타이드는 상동 재조합을 통한 파손 복구를 위한 주형으로서 사용되어 공여자에서와 같이 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부가 세포 염색질에 도입되도록 한다. 따라서, 세포 염색질의 첫 번째 서열은 변경될 수 있고, 특정 실시양태에서는 공여자 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 서열로 전환될 수 있다. 따라서 "대체" 또는 "대체"라는 용어의 사용은 하나의 뉴클레오타이드 서열을 다른 것으로 대체하는 것을 나타내는 것으로 이해될 수 있고, (즉: 정보의 미에서 시퀀스의 대체), 하나의 폴리뉴클레오타이드를 다른 폴리뉴클레오타이드로 물리적 또는 화학적으로 대체

할 필요는 없다.

- [0041] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 추가의 CRISPR/Cas 뉴클레아제 및/또는 아연-핑거 또는 TALEN 단백질의 추가 쌍은 세포 내의 추가 표적 부위의 추가 이중 가닥 절단을 위해 사용될 수 있다.
- [0042] 세포 염색질에서 관심 영역의 서열의 표적화된 재조합 및/또는 교체 및/또는 변경을 위한 방법의 특정 실시양태에서, 염색체 서열은 외인성 "공여자" 뉴클레오티드 서열과의 상동 재조합에 의해 변경된다. 이러한 상동 재조합은 절단 영역에 상동 서열이 존재하는 경우 세포 염색질에 이중 가닥 파손의 존재에 의해 자극된다.
- [0043] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 외인성 뉴클레오티드 서열("공여자 서열" 또는 "이식유전자")은 관심 영역의 게놈 서열과 상동하지만 동일하지 않은 서열을 함유할 수 있으며, 이에 의해 관심 영역의 게놈 서열에 상동성 재조합을 자극하여 유전자를 삽입할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 관심 영역의 서열과 상동성인 공여자 서열의 부분은 대체되는 게놈 서열에 대해 약 80 내지 99%(또는 그 사이의 임의의 정수)의 서열 동일성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, 공여자와 게놈 서열 사이의 상동성은 예를 들어 공여자와 100개 이상의 인접 염기 쌍의 게놈 서열 사이에서 1개의 뉴클레오티드만이 상이한 경우 99% 초과이다. 특정 경우에, 공여자 서열의 비-상동성 부분은 관심 영역에 존재하지 않는 서열을 함유할 수 있어, 새로운 서열이 관심 영역에 도입된다. 이러한 경우에, 비-상동성 서열은 일반적으로 관심 영역의 서열과 상동성이거나 동일한 50-1,000개 염기쌍(또는 이들 사이의 임의의 정수 값)의 서열 또는 1,000개보다 큰 임의의 수의 염기쌍의 서열에 의해 플랜킹된다. 다른 실시양태에서, 공여자 서열은 제1 서열과 비-상동이고, 비-상동 재조합 메커니즘에 의해 게놈 내로 삽입된다.
- [0044] 본 명세서에 기술된 임의의 방법은 관심 유전자(들)의 발현을 방해하는 공여자 서열의 표적화된 통합에 의해 세포에서 하나 이상의 표적 서열의 부분적 또는 완전한 불활성화를 위해 사용될 수 있다. 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 유전자를 갖는 세포주가 또한 제공된다.
- [0045] 또한, 본원에 기재된 표적화된 통합 방법은 또한 하나 이상의 외인성 서열을 통합하는데 사용될 수 있다. 외인성 핵산 서열은 예를 들어, 하나 이상의 유전자 또는 cDNA 분자, 또는 임의의 유형의 코딩 또는 비-코딩 서열, 뿐만 아니라 하나 이상의 제어 요소(예: 프로모터)를 포함할 수 있다. 또한, 외인성 핵산 서열은 하나 이상의 RNA 분자(예: 작은 hairpin RNA(shRNA), 억제 RNA(RNAis), microRNA(miRNA) 등)를 생성할 수 있다.
- [0046] "절단"은 DNA 분자의 공유 골격의 파손을 의미한다. 절단은 포스포디에스테르 결합의 효소적 또는 화학적 가수 분해를 포함하지만 이에 국한되지 않는 다양한 방법에 의해 개시될 수 있다. 단일 가닥 절단 및 이중 가닥 절단이 모두 가능하며, 이중 가닥 절단은 2개의 별개의 단일 가닥 절단 이벤트의 결과로 발생할 수 있다. DNA 절단으로 인해 끝이 무딘 끝이나 엇갈린 끝이 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 표적화된 이중 가닥 DNA 절단에 사용된다.
- [0047] "절단 반-도메인"은 제2 폴리펩타이드(동일하거나 상이한)와 함께 절단 활성(바람직하게는 이중 가닥 절단 활성)을 갖는 복합체를 형성하는 폴리펩타이드 서열이다. 용어 "제1 및 제2 절단 반도메인;" "+ 및 - 절단 절반-도메인" 및 "오른쪽 및 왼쪽 절단 절반-도메인"은 이량체화하는 절단 절반-도메인의 쌍을 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다.
- [0048] "조작된 절단 절반-도메인"은 다른 절단 절반-도메인(예: 또 다른 조작된 절단 절반 도메인)과 절대 이중이량체를 형성하도록 변형된 절단 절반-도메인이다. 또한, 전체 내용이 참조로 본원에 포함된, 미국 특허 공개 번호. 2005/0064474, 2007/0218528, 2008/0131962 및 2011/0201055를 참조하십시오.
- [0049] "서열"이라는 용어는 DNA 또는 RNA일 수 있는 임의의 길이의 뉴클레오티드 서열을 의미하며; 선형, 원형 또는 분지형일 수 있으며 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. "공여자 서열"이라는 용어는 게놈에 삽입되는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 공여자 서열은 임의의 길이, 예를 들어 2 내지 10,000개 뉴클레오티드 길이(또는 그 사이 또는 그 이상의 정수 값)일 수 있으며, 바람직하게는 약 100 내지 1,000개의 뉴클레오티드 길이(또는 그 사이의 임의의 정수), 더욱 바람직하게는 약 200 내지 500개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.
- [0050] "상동성, 동일하지 않은 서열"은 제2 서열과 서열 동일성 정도를 공유하지만 그의 서열이 제2 서열의 서열과 동일하지 않은 제1 서열을 지칭한다. 예를 들어, 돌연변이 유전자의 야생형 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 돌연변이 유전자의 서열과 상동이고 동일하지 않다. 특정 실시양태에서, 2개의 서열 사이의 상동성 정도는 정상적인 세포 기전을 이용하여 이들 사이의 상동성 재조합을 허용하기에 충분하다. 2개의 상동성 동일하지 않은 서열은 임의의 길이일 수 있으며 비상동성 정도는 단일 뉴클레오티드(예: 표적 상동 재조합에 의한 게놈 점 돌연변이 수정용)만큼 작을 수 있거나 최대 10개 이상의 길로염기(예: 염색체의 미리 결정된 이소성 부위에 유전자 삽입)만큼 클 수 있다. 상동성 동일하지 않은 서열을 포함하는 2개의 폴리뉴클레오타이드가 동일한 길이일

필요는 없다. 예를 들어, 20 내지 10,000개의 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 쌍의 외인성 폴리뉴클레오타이드 (즉: 공여자 폴리뉴클레오타이드)가 사용될 수 있다.

[0051] 핵산 및 아미노산 서열 동일성을 결정하는 기술은 당업계에 공지되어 있다. 전형적으로, 이러한 기술은 유전자에 대한 mRNA의 뉴클레오타이드 서열을 결정하고/하거나 그에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 결정하고, 이들 서열을 제2 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열과 비교하는 것을 포함한다. 이러한 방식으로 게놈 서열을 결정하고 비교할 수도 있다. 일반적으로, 동일성은 각각 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오타이드 대 뉴클레오타이드 또는 아미노산 대 아미노산 일치율을 의미한다. 둘 이상의 서열(폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산)은 퍼센트 동일성을 결정함으로써 비교할 수 있다. 핵산 서열이든 아미노산 서열이든 두 서열의 동일성 백분율은 정렬된 두 서열 간의 정확한 일치 수를 더 짧은 서열의 길이로 나누고 100을 곱한 것이다. 핵산 서열에 대한 대략적인 정렬은 Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489(1981)의 국소 상동성 알고리즘에 의해 제공된다. 이 알고리즘은 Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences 및 Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl에 의해 개발된 스코어링 매트릭스를 사용하여 아미노산 서열에 적용될 수 있다. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, USA, 및 Gribskov, *Nucl*로부터 정규화. *Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986). 서열의 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 이 알고리즘의 예시적인 구현은 "BestFit" 유틸리티 애플리케이션의 Genetics Computer Group(위스콘신주 매디슨)에 의해 제공된다. 서열 간의 퍼센트 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 적합한 프로그램은 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 다른 정렬 프로그램은 기본 매개변수와 함께 사용되는 BLAST이다. 예를 들어, BLASTN 및 BLASTP는 다음 기본 매개변수를 사용하여 사용할 수 있다: 유전자 코드=표준; 필터=없음; 가닥 = 둘 다; 컷오프 = 60; 기대 = 10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50개 시퀀스; 정렬 기준=높은 점수; 데이터베이스=비중복, GenBank+EMBL+DBJ+PDB+GenBank CDS 전사+Swiss 단백질+Spudate+PIR. 이러한 프로그램에 대한 자세한 내용은 인터넷에서 찾을 수 있다. 본원에 기재된 서열과 관련하여, 서열 동일성의 원하는 정도의 범위는 대략 80% 내지 100% 및 그 사이의 임의의 정수 값이다. 전형적으로, 서열 간의 퍼센트 동일성은 적어도 70-75%, 바람직하게는 80-82%, 보다 바람직하게는 85-90%, 훨씬 더 바람직하게는 92%, 더욱 더 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 98% 서열 동일성이다.

[0052] 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 유사성 정도는 상동성 영역 사이에 안정한 이중가닥의 형성을 허용하는 조건 하에서 폴리뉴클레오타이드의 혼성화에 의해 결정될 수 있고, 이어서 단일 가닥-특이적 뉴클레아제(들)로 분해되고, 분해된 단편의 크기가 결정될 수 있다. 2개의 핵산 또는 2개의 폴리펩티드 서열은 서열이 적어도 약 70%-75%, 바람직하게는 80%-82%, 보다 바람직하게는 85%-90%, 훨씬 더 바람직하게는 92%, 더욱 더 많은 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 98%의 서열 동일성이 상기 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 정의된 분자 길이에 걸쳐 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 실질적으로 상동성은 또한 특정 DNA 또는 폴리펩티드 서열에 대한 완전한 동일성을 나타내는 서열을 지칭한다. 실질적으로 상동성인 DNA 서열은 예를 들어 특정 시스템에 대해 정의된 엄격한 조건 하에서 서던 혼성화 실험에서 확인될 수 있다. 적절한 혼성화 조건을 정의하는 것은 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, Sambrook et al., *supra*; *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, 편집자 BD Hames 및 SJ Higgins, (1985) Oxford; 워싱턴 DC; IRL 보도)를 참조하십시오.

[0053] 2개의 핵산 단편의 선택적 혼성화는 다음과 같이 결정될 수 있다. 2개의 핵산 분자 사이의 서열 동일성의 정도는 이러한 분자 사이의 혼성화 이벤트의 효율 및 강도에 영향을 미친다. 부분적으로 동일한 핵산 서열은 표적 분자에 대한 완전히 동일한 서열의 혼성화를 적어도 부분적으로 억제할 것이다. 완전히 동일한 서열의 혼성화 억제는 당업계(예: Southern (DNA) blot, Northern (RNA) blot, solution hybridization, 아니면 더 유사하게는 Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.)에 잘 알려진 혼성화 분석을 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 분석은 다양한 정도의 선택성을 사용하여, 예를 들어 낮은 엄격도에서 높은 엄격도까지 다양한 조건을 사용하여 수행할 수 있다. 낮은 엄격도의 조건이 사용되는 경우, 부분적인 정도의 서열 동일성조차 없는 2차 프로브(예를 들어, 표적 분자와 약 30% 미만의 서열 동일성을 갖는 프로브)를 사용하여 비특이적 결합의 부재를 평가할 수 있으며, 그 결과 비특이적 결합 이벤트가 없는 경우 2차 프로브는 표적에 혼성화되지 않는다.

[0054] "염색질"은 세포 게놈을 포함하는 핵단백질 구조이다. 세포 염색질은 핵산(주로 DNA)과 히스톤 및 비히스톤 염색체 단백질을 포함한 단백질로 구성된다. 대부분의 진핵 세포 염색질은 뉴클레오솜 형태로 존재하며, 여기서 뉴클레오솜 코어는 히스톤 H2A, H2B, H3 및 H4 각각을 2개 포함하는 팔량체와 관련된 대략 150개의 염기쌍의 DNA를 포함하고; 링커 DNA(유기체에 따라 다양한 길이)는 뉴클레오솜 코어 사이에서 확장된다. 히스톤 H1 분자는 일반적으로 링커 DNA와 연결되어 있다. 본 개시내용의 목적을 위해, 용어 "염색질"은 원핵생물 및 진핵생물

모두의 모든 유형의 세포 핵단백질을 포괄하는 의미이다. 세포 염색질은 염색체와 에피솜 염색질을 모두 포함한다.

- [0055] "염색체"는 세포 게놈의 전체 또는 일부를 포함하는 염색질 복합체이다. 세포의 게놈은 종종 세포의 게놈을 구성하는 모든 염색체의 집합인 핵형에 의해 특징지어진다. 세포의 게놈은 하나 이상의 염색체를 포함할 수 있다.
- [0056] "에피솜"은 복제 핵산, 핵단백질 복합체 또는 세포의 염색체 핵형의 일부가 아닌 핵산을 포함하는 기타 구조이다. 에피솜의 예에는 플라스미드 및 특정 바이러스 게놈이 포함된다.
- [0057] "접근 가능한 영역"은 핵산에 존재하는 표적 부위가 표적 부위를 인식하는 외인성 분자에 의해 결합될 수 있는 세포 염색질의 부위이다. 특정 이론에 얽매이지 않고 접근 가능한 영역은 뉴클레오솜 구조로 패키징되지 않은 영역이라고 믿어진다. 접근 가능한 영역의 독특한 구조는 종종 뉴클레아제와 같은 화학적 및 효소적 프로브에 대한 민감도에 의해 감지될 수 있다.
- [0058] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합을 위한 충분한 조건이 존재한다면, 결합 분자가 결합할 핵산의 일부를 정의하는 핵산 서열이다.
- [0059] "외인성" 분자는 일반적으로 세포에 존재하지 않지만 하나 이상의 유전적, 생화학적 또는 기타 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있는 분자이다. "세포 내 정상적인 존재"는 세포의 특정 발달 단계 및 환경 조건과 관련하여 결정된다. 따라서 예를 들어 근육의 배아 발달 동안에만 존재하는 분자는 성인 근육 세포에 대한 외인성 분자이다. 마찬가지로 열충격에 의해 유도된 분자는 열충격을 받지 않은 세포에 대한 외인성 분자이다. 외인성 분자는, 예를 들어, 오작동하는 내인성 분자의 기능 버전 또는 정상적으로 기능하는 내인성 분자의 오작동 버전을 포함할 수 있다.
- [0060] 외인성 분자는 무엇보다도, 다른 것들 중에서, 조합 화학 공정에 의해 생성되는 소분자일 수 있고, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지단백질, 다당류, 상기 분자의 변형된 유도체와 같은 거대분자일 수 있으며, 상기 분자 중 하나 이상을 포함하는 임의의 복합체일 수도 있다. 핵산에는 DNA와 RNA가 포함되며 단일 또는 이중 가닥일 수 있고; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있고; 어떤 길이든 될 수 있다. 핵산에는 이중체를 형성할 수 있는 것뿐만 아니라 삼중체를 형성할 수 있는 핵산이 포함된다. 예를 들어, 미국 특허 번호. 5,176,996 및 5,422,251를 참조하십시오. 단백질에는 DNA 결합 단백질, 전사 인자, 염색질 리모델링 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 폴리머라제, 메틸라제, 데메틸라제, 아세틸라제, 데아세틸라제, 키나제, 포스파타제, 인테그라제, 재조합효소, 리가제, 토포이소머라제, 자이라제 및 헬리카제를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 따라서, 이 용어는 세포 내로 도입된 외인성 서열인 "이식 유전자" 또는 "관심 유전자"를 포함한다.
- [0061] 외인성 분자는 내인성 분자와 동일한 유형의 분자, 예를 들어 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산은 감염 바이러스 게놈, 세포 내로 도입된 플라스미드 또는 에피솜, 또는 세포에 정상적으로 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 세포 내로 외인성 분자를 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 지질 매개 전달(즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함한 리포솜), 전기천공, 직접 주입, 세포 융합, 입자 충격, 인산칼슘 공침, DEAE-덱스트란 매개 전달 및 바이러스 벡터-중재 전달을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 외인성 분자는 또한 내인성 분자와 동일한 유형의 분자일 수 있지만 세포가 유도된 것과 다른 종에서 유도된다. 예를 들어, 인간 핵산 서열은 원래 마우스 또는 햄스터로부터 유래된 세포주에 도입될 수 있다. 외인성 분자를 식물 세포에 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며 원형질체 형질전환, 탄화규소(예: WHISKERS.TM.), Agrobacterium-매개 형질전환, 지질-매개 전이(즉, 리포솜, 중성 및 양이온성 지질 포함), 전기천공, 직접 주사, 세포 융합, 입자 충격(예: "유전자 총" 사용), 인산칼슘 동시 침전, DEAE-덱스트란 매개 전달 및 바이러스 벡터 매개 전달을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0062] 대조적으로, "내인성" 분자는 특정 환경 조건에서 특정 발달 단계의 특정 세포에 정상적으로 존재하는 분자이다. 예를 들어, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아의 게놈, 엽록체 또는 기타 소기관, 또는 자연 발생 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가적인 내인성 분자는 단백질, 예를 들어 전사 인자 및 효소를 포함할 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 용어 "외인성 핵산의 생성물"은 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 생성물, 예를 들어 전사 생성물(RNA와 같은 폴리뉴클레오티드) 및 번역 생성물(폴리펩티드)을 모두 포함한다.
- [0064] "융합" 분자는 2개 이상의 소단위 분자가 바람직하게는 공유결합으로 연결된 분자이다. 소단위 분자는 동일한 화학적 유형의 분자이거나 다른 화학적 유형의 분자일 수 있다. 첫 번째 유형의 융합 분자의 예에는 융합 단백

질(예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인과 하나 이상의 활성화 도메인 간의 융합) 및 융합 핵산(예를 들어, 상기 기술된 융합 단백질을 코딩하는 핵산)이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 제2 유형의 융합 분자의 예는 삼중체 형성 핵산과 폴리펩타이드 사이의 융합, 및 마이너 그루브 결합제와 핵산 사이의 융합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "융합 폴리펩타이드"는 이중 폴리펩타이드에 융합되거나 결합된 폴리펩타이드 또는 이의 일부(예: 하나 이상의 도메인)를 포함하는 폴리펩타이드이다. 융합 폴리펩타이드의 예는 Cas 단백질의 일부를 번역글로불린 서열과 결합하는 면역부착소, 및 예를 들어 "태그 폴리펩타이드"에 융합된 Cas 단백질 또는 이의 일부를 포함할 수 있는 에피토프 태깅된 폴리펩타이드를 포함한다. 태그 폴리펩타이드는 항체가 만들어질 수 있는 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 갖지만 Cas의 뉴클레아제 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 적합한 태그 폴리펩타이드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기 및 일반적으로 약 6-60개 아미노산 잔기를 갖는다.

[0065] 세포에서 융합 단백질의 발현은 융합 단백질의 세포로의 전달 또는 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 세포로의 전달에 의해 야기될 수 있으며, 여기서 폴리뉴클레오티드는 전사되고 전사체는 번역되어 융합 단백질을 생성한다. 트랜스-스플라이싱(trans-splicing), 폴리펩타이드 절단 및 폴리펩타이드 결합은 또한 세포에서 단백질의 발현에 관여할 수 있다. 세포로의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 전달 방법은 본 개시내용의 다른 곳에 제시되어 있다.

[0066] 본 개시내용의 목적을 위한 "유전자"는 그러한 조절 서열이 코딩 및/또는 전사된 서열에 인접하는지의 여부에 따라 유전자 생성물을 코딩하는 DNA 영역(하기 참조) 뿐만 아니라 유전자 생성물의 생산을 조절하는 모든 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위, 인핸서, 소음기, 절연체, 경계 요소, 복제 기점, 기질 부착 부위 및 유전자와 제어 영역과 같은 프로모터 서열, 종결자, 전사 조절 서열을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. "조작된 유전자"는 야생형 유전자와 동일하지 않은 방식으로 변형된 유전자를 의미한다. 변형은 표적화된 삭제, 삽입 및 절단의 형태일 수 있다. 조작된 유전자는 2개의 이중 유전자로부터의 코딩 서열을 포함할 수 있거나 합성 유전자 서열을 포함할 수 있다. 조작된 유전자는 또한 단백질 서열에서 침묵하는 코딩 서열의 변화를 포함할 수 있다(예: 코돈 최적화). 조작된 유전자는 또한 변경된 조절 서열을 갖는 유전자를 포함할 수 있다.

[0067] "유전자 발현"은 유전자에 포함된 정보를 유전자 산물로 변환하는 것을 의미한다. 유전자 산물은 유전자(예: mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA 또는 기타 유형의 RNA) 혹은 mRNA의 전사에 의해 생성되는 단백질의 직접적인 전사 산물일 수 있다. 유전자 산물에는 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화 및 편집과 같은 과정에 의해 변형된 RNA와 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화 및 글리코실화에 의해 변형된 단백질도 포함된다.

[0068] 유전자 발현의 "조절"은 유전자 활성의 변화를 의미한다. 발현 조절은 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 게놈 편집(예: 절단, 변경, 비활성화, 무작위 돌연변이)을 사용하여 발현을 조절할 수 있다. 유전자 불활성화는 본 명세서에 기재된 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템을 포함하지 않는 세포와 비교하여 유전자 발현의 임의의 감소를 지칭한다. 따라서 유전자 비활성화는 부분적이거나 완전할 수 있다.

[0069] "관심 영역"은 외인성 분자에 결합하는 것이 바람직한, 예를 들어 유전자 또는 유전자 내 또는 이에 인접한 비-암호화 서열과 같은 세포 염색질의 임의의 영역이다. 결합은 표적화된 DNA 절단 및/또는 표적화된 재조합을 위한 것일 수 있다. 관심 영역은 예를 들어 염색체, 에피솜, 소기관 게놈(예: 미토콘드리아, 엽록체), 또는 감염 바이러스 게놈에 존재할 수 있다. 관심 영역은 유전자의 코딩 영역 내에, 예를 들어 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론과 같은 전사된 비암호화 영역 내에, 또는 코딩 영역의 상류 또는 하류에 있는 비-전사 영역 내에 있을 수 있다. 관심 영역은 단일 뉴클레오티드 쌍만큼 작거나 길이가 최대 2,000개 뉴클레오티드 쌍이거나 뉴클레오티드 쌍의 정수 값일 수 있다.

[0070] "진핵" 세포는 진균 세포(예: 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포 및 인간 세포(예: T-세포)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0071] "작동 가능한 연결" 및 "작동적으로 연결된"(또는 "작동 가능하게 연결된")이라는 용어는 두 개 이상의 구성 요소(예: 서열 요소)의 병치를 참조하여 상호 교환적으로 사용되며, 구성 요소는 두 구성 요소가 모두 정상적으로 기능하고 구성 요소 중 하나 이상이 다른 구성 요소 중 하나 이상에 가해지는 기능을 중재할 수 있는 가능성을 허용하도록 배열된다. 예로서, 전사 조절 서열이 하나 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 대한 반응으로 코딩 서열의 전사 수준을 제어하는 경우 프로모터와 같은 전사 조절 서열은 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 전사 조절 서열은 일반적으로 코딩 서열과 시스에서 작동가능하게 연결되지만, 이에 직접 인접할 필

요는 없다. 예를 들어, 인헨서는 인접하지 않더라도 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 전사 조절 서열이다.

[0072] 융합 폴리펩타이드와 관련하여, "작동적으로 연결된"이라는 용어는 각각의 구성요소가 그렇게 연결되지 않은 경우와 같이 다른 구성요소에 대한 연결에서 동일한 기능을 수행한다는 사실을 나타낼 수 있다. 예를 들어, Cas DNA 결합 도메인이 활성화 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드와 관련하여, Cas DNA 결합 도메인과 활성화 도메인은 융합 폴리펩타이드에서 Cas DNA 결합 도메인이 도메인 부분은 표적 부위 및/또는 결합 부위에 결합할 수 있는 반면, 활성화 도메인은 유전자 발현을 상향 조절할 수 있다. Cas DNA 결합 도메인이 절단 도메인에 융합된 융합 폴리펩타이드의 경우, 융합 폴리펩타이드에서 Cas DNA 결합 도메인 부분이 절단 도메인은 표적 부위 부근에서 DNA를 절단할 수 있는 반면, 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합한다.

[0073] 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산의 "기능적 단편"은 서열이 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일하지 않지만 전장 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산과 동일한 기능을 유지하는 단백질, 폴리펩타이드 또는 핵산이다. 기능적 단편은 상응하는 천연 분자와 더 많거나 더 적거나 동일한 수의 잔기를 가질 수 있고/있거나 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 치환을 함유할 수 있다. 핵산의 기능(예: 코딩 기능, 다른 핵산에 혼성화하는 능력)을 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 유사하게, 단백질 기능을 결정하는 방법은 잘 알려져 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드의 DNA-결합 기능은 예를 들어 필터-결합, 전기영동 이동성-이동 또는 면역침전 분석에 의해 결정될 수 있다. DNA 절단은 겔 전기영동으로 분석할 수 있다. 다른 단백질과 상호작용하는 단백질의 능력은 예를 들어 유전 및 생화학적 동시-면역침전, 2-하이브리드 검정 또는 보완에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; 미국 특허 번호. 5,585,245 및 PCT WO 98/44350를 참조하세요.

[0074] "벡터"는 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 구축물", "발현 벡터" 및 "유전자 전달 벡터"는 관심 유전자의 발현을 지시할 수 있고 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 핵산 구축물을 의미한다. 따라서, 이 용어는 클로닝, 발현 비히클, 통합 벡터를 포함한다.

[0075] "리포터 유전자" 또는 "리포터 서열"은 바람직하게는 일상적인 분석에서 반드시 아니지만 바람직하게는 쉽게 측정되는 단백질 생성물을 생성하는 임의의 서열을 지칭한다. 적합한 리포터 유전자에는 항생제 내성(예: 암피실린 내성, 네오마이신 내성, G418 내성, 푸로마이신 내성)을 매개하는 단백질을 인코딩하는 서열, 유색 또는 형광 또는 발광 단백질(예: 녹색 형광 단백질, 강화 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시페라제)을 인코딩하는 서열, 및 강화된 세포 성장 및/또는 유전자 증폭을 매개하는 단백질(예: 디히드로폴레이트 환원효소)이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 에피토프 태그는 예를 들어 FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출 가능한 아미노산 서열의 하나 이상의 사본을 포함한다. "발현 태그"는 관심 유전자의 발현을 모니터링하기 위해 원하는 유전자 서열에 작동가능하게 연결될 수 있는 리포터를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0076] "피험자" 및 "환자"라는 용어는 혼용되어 사용되며 인간 환자 및 인간이 아닌 영장류와 같은 포유동물뿐만 아니라 토끼, 개, 고양이, 쥐, 마우스 및 기타 동물과 같은 실험 동물을 지칭한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본 발명의 줄기 세포가 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대상체를 의미한다. 본 발명의 대상은 예를 들어 신경 독소를 포함하는 하나 이상의 화학적 독소에 노출된 대상을 포함한다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "치료적"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질병 상태의 억제, 완화 또는 근절에 의해 얻어진다.

[0078] "치료학적 유효량"이라는 용어는 연구원, 의사, 의사 또는 기타 임상가가 찾는 조직, 시스템 또는 대상의 생물학적 또는 의학적 반응을 이끌어낼 대상 화합물의 양을 의미한다. 용어 "치료 유효량"은 투여되는 경우 치료되는 장애 또는 질병의 징후 또는 증상 중 하나 이상의 발병을 예방하거나 어느 정도 완화하기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 치료적 유효량은 화합물, 질병 및 그의 중증도 및 치료될 대상체의 연령, 체중 등에 따라 달라질 것이다. 본원에 사용된 용어로 질병을 "치료"한다는 것은 대상이 경험하는 질병 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.

[0079] 본원에 사용된 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포에는 1차 대상 세포와 그 자손이 포함된다.

[0080] "벡터"는 분리된 핵산을 포함하고 분리된 핵산을 세포 내부로 전달하는 데 사용할 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 관련된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는 수많은 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 용어 "벡터"는 자가 복제

플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 이 용어는 또한 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등과 같은 핵산의 세포 내로의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스성 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0081] 범위: 본 개시를 통해, 본 발명의 다양한 측면은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의와 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위와 해당 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 공개한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1에서 6과 같은 범위에 대한 설명은 1에서 3, 1에서 4, 1에서 5, 2에서 4, 2에서 6, 3에서 6 등 뿐만 아니라 해당 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 6과 같은 하위 범위를 구체적으로 공개한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0082] 본원에 기재된 실시양태는 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 유전자 변형 및/또는 변경된 CD4/CD8 T 세포, $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포(CD4/CD8 T 세포), 및 HIV 감염 대상 및 특히 항레트로바이러스 요법을 받았거나 계속 받고 있는 대상의 잠복 HIV 감염을 치료하는 데 사용되는 장기간 농축된 집단에 관한 것이다. 서브세트 CD4/CD8 T 세포는 수명이 긴 만능 줄기 세포의 표현형 및 분자적 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 다른 알려진 줄기 세포 집단과 마찬가지로 이 하위 집단 집단은 낮은 대사 프로파일(지방산 대사 및 산화적 인산화의 상향 조절, 세포 순환 경로의 하향 조절)을 갖고 자가 재생 능력을 유지하고 효과기 세포로 분화할 수 있다. 이 하위 집합은 주로 $CD45RA^{int}$ 및 $CD45RO^{int}(CD45RA^{int}CD45RO^{int})$ 의 중간 공동 발현이 특징이다. $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 또한 CD95(Fas) CD127(IL7R) 및 CD27을 발현할 수 있다. 저용량의 사이토카인 IL-7 및 IL-15를 첨가하면 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 농축된 CD4/CD8 세포 집단이 형성될 수 있다; 반면 고용량의 사이토카인 IL-7 및 IL-15는 세포의 이펙터 분화로 이어질 수 있다.

[0083] 일부 실시양태에서, $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 유전적으로 변형될 수 있다. $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 자가 CD4/CD8 T 세포를 HIV 감염 대상에 투여하면 CD4+ T 세포 수, 회복된 T 세포 항상성의 증가 및 피험자의 HIV 저장소 크기의 상당한 감소를 제공할 수 있다.

[0084] 농축 집단 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 피험자에게 이식 또는 투여 시 피험자에서 장기간 지속하거나 생존하는 능력을 가진다. 지속성은 HIV 감염과 같은 질병의 치료에서 치료적 T 세포 이식의 효능과 상관관계가 있을 수 있다. 치료 T 세포의 지속성이 클수록 치료 요법이 효과적일 가능성이 높아진다. 따라서, $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 장기 수명의 자가 재생 만능 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포는 감소된 생산 비용, 이펙터 분화 촉진, 피험자의 잠복 HIV 감염 치료의 효율성 증가를 가질 수 있다. 더욱이, 현재 이용 가능한 HIV 치료 제품에서 이들 세포의 빈도는 바이오마커로 사용될 수 있고 성공적인 개입을 예측할 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 농축된 집단 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 피험자에게 투여된 후 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형 없는 T 세포보다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48 혹은 72달 동안 더 생체내에서 생존한다. 농축된 집단 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 투여 후 피험자에 정착할 수 있는 능력이 향상된다. 특히, 농축된 집단 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 $CD45RA^{int}CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 조건 없는 수용자에게 접목할 수 있는 능력이 향상된다.

[0086] "생착"이라는 용어는 이식된 세포가 수용자를 채우고 이식 직후에 생존하는 능력을 의미한다. 따라서, 생착은 이식 후 단기간에 평가된다. 예를 들어, 생착은 이식된 세포 또는 그 후손이 수혜자에게서 검출될 수 있는 가장 빠른 시점과 같은 실험과 같이, 임상 시험 또는 치료 프로토콜의 첫 번째 생체내 평가에서 검출된 이식된 세포에서 유래한 세포의 수를 나타낼 수 있다. 한 실시양태에서, 생착은 이식 후 0-12, 0-24, 0-48 또는 0-72시간에 평가된다. 또 다른 실시양태에서, 생착은 이식 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36, 48, 60 또는 72시간에 평가된다. 바람직한 구체예에서, 생착은 이식 후 약 12시간에 평가된다.

- [0087] 도 1은 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 유전적으로 변형될 수 있는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단을 생성하는 방법을 예시하는 흐름도를 보여준다. 이 방법에서, 단계 10에서, T-세포의 나이브 집단이 대상의 생물학적 샘플로부터 분리된다. 생물학적 시료는 피험자의 시료를 포함하는 임의의 T 세포를 포함할 수 있다. 피험자의 예로는 인간, 개, 고양이, 생쥐, 쥐 및 이들의 형질전환 종을 들 수 있다. 바람직하게는, 대상은 인간이다.
- [0088] T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 비장 조직 및 종양을 비롯한 여러 출처에서 얻을 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 치료될 HIV를 갖는 대상체로부터, 즉, 치료될 대상체로부터의 자가 T-세포로부터 획득될 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포는 피콜 분리와 같은 숙련된 기술자에게 공지된 임의의 수의 기술을 사용하여 피험자로부터 수집된 혈액 단위로부터 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집 또는 백혈구 성분채집에 의해 획득된다. 성분채집 제품은 일반적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함한 림프구를 포함한다. 성분채집에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 후속 처리 단계를 위해 적절한 완충액 또는 배지에 세포를 배치하기 위해 세척될 수 있다. 한 구체예에서, 세포는 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척될 수 있다. 대안적인 구체예에서, 세척 용액은 칼슘이 부족하고 마그네슘이 부족할 수 있거나 많은 또는 모든 2가 양이온이 부족할 수 있다. 세척 후, 세포는 예를 들어 Ca-무함유, Mg-무함유 PBS와 같은 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집 샘플의 바람직하지 않은 성분을 제거하고 세포를 배양 배지에 직접 재현탁할 수 있다.
- [0089] 또 다른 실시양태에서, T 세포는 예를 들어 PERCOLL 구배를 통한 원심분리에 의해 적혈구를 용해시키고 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액으로부터 분리될 수 있다. 또는 T 세포를 탱줄에서 분리할 수 있다. 어쨌든, T 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 분리된 T 세포는 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포를 포함할 수 있다. CD4 T 세포 및/또는 CD8 T 세포(CD4/CD8 T 세포)는 양성 또는 음성 선택에 의해 생물학적 시료로부터 분리될 수 있다. 음성 선택은 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대한 항체 조합을 사용하여 수행할 수 있다. 한 가지 방법은 부정적으로 선택된 세포에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단일 클론 항체의 각테일을 사용하는 음성 자기 면역 부착 또는 유세포 분석을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 강화하기 위해 모노클로날 항체 각테일에는 일반적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체가 포함된다.
- [0091] 양성 또는 음성 선택에 의한 원하는 세포 집단의 분리를 위해 세포 및 표면(예: 비드와 같은 입자)의 농도를 변경할 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포와 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 상당히 감소시키는 것이(즉, 세포의 농도를 증가시키는 것이) 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 구체예에서, 20억 세포/ml의 농도가 사용된다. 한 실시양태에서, 10억 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억 개 초과인 세포/ml가 사용된다. 추가 실시양태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 5천만 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 구체예에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 1억 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가 실시양태에서, 1억 2500만 또는 1억 5000만 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하면 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장이 증가할 수 있다.
- [0092] 생물학적 샘플로부터 T 세포를 분리한 후, 단계 20에서 분리된 CD4/CD8 T 세포는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 활성화 및/또는 확장될 수 있다. 본 발명의 구체예에서, T 세포는 활성화되고 T 세포의 수는 하나 이상의 비특이적 T 세포 자극(예: 항-CD3 및 항-CD28) 및/혹은 하나 이상의 사이토카인, 사이토카인(예: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IL-35, TGF- α , IFN α , IFN γ , TNF α) 재조합 단백질, 공동자극 분자, 렉틴, 이온 전달 물질, 합성 분자, 항원 제시 세포(APC: antigen presenting cell), 인공 APC 또는 피더의 존재 하에 확장된다. 일부 실시양태에서, CD4/CD8 T 세포는 활성화될 수 있고 T 세포의 수는 T 세포를 하나 이상의 비특이적 T 세포 자극 및/또는 하나 이상의 사이토카인과 물리적으로 접촉시킴으로써 확장된다. 임의의 하나 이상의 비특이적 T 세포 자극이 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 비특이적 T 세포 자극의 예에는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 포함된다. 일부 실시양태에서, 비-특이적 T 세포 자극은 비드에 접합된 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체일 수 있다. 임의의 하나 이상의 사이토카인이 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 예시적인 사이토카인은 인터루킨(IL)-2, IL-7, IL-21 및 IL-15를 포함한다.
- [0093] 분리된 CD4/CD8 T 세포의 활성화 및/또는 확장 후, 단계 30에서 CD4/CD8 T 세포는, 예를 들어, 유세포 분석을

사용하여 CD45RA 및 CD45RO (CD45RA^{int}CD45RO^{int})의 중간 공동 발현을 특징으로 하는 농축된 CD4/CD8 T 세포 집단으로 분리 또는 분류할 수 있다. 방법은 임의의 적합한 방식으로 세포를 분류하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분류는 유세포 분석을 사용하여 수행된다. 유세포 분석은 당업계에 알려진 임의의 적절한 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 유세포 분석은 적절한 항체와 얼룩을 사용할 수 있다. 일부 구현에서 유세포 분석은 다색 유세포 분석이다.

[0094] 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생성된 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단은 대다수 세포 유형으로 CD45RA^{int}CD45RO^{int}를 갖는 CD4/CD8 T 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 약 99% 이상, 약 98% 이상, 약 97% 이상, 약 96% 이상, 약 95% 이상, 약 95% 이상, 94%, 적어도 약 93%, 적어도 약 92%, 적어도 약 91%, 적어도 약 90%, 적어도 약 89%, 적어도 약 88%, 적어도 약 87%, 적어도 약 86%, 적어도 약 85%, 적어도 약 84%, 적어도 약 83%, 적어도 약 82%, 적어도 약 81%, 적어도 약 80%, 적어도 약 79%, 적어도 약 78%, 적어도 약 77%, 적어도 약 76%, 적어도 약 75%, 적어도 약 74%, 적어도 약 73%, 적어도 약 72%, 적어도 약 71%, 적어도 약 70%, 적어도 약 69%, 적어도 약 68%, 적어도 약 67%, 적어도 약 66%, 적어도 약 65%, 적어도 약 64%, 적어도 약 63%, 적어도 약 62%, 적어도 약 61%, 적어도 약 60%, 적어도 약 59%, 적어도 약 58%, 적어도 약 57%, 적어도 약 56%, 적어도 ab 55% 이상, 약 54% 이상, 약 53% 이상, 약 52% 이상, 약 51% 이상 또는 약 50% 이상의 CD45RA^{int}CD45RO^{int}를 갖는 CD4/CD8 T 세포를 포함하는 세포 배양 및/또는 세포 집단을 생산한다. 바람직한 구체예에서, 세포 배양물 또는 세포 집단의 세포는 인간 세포를 포함한다.

[0095] CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 장수명 CD4/CD8 T 세포는 또한 다른 세포 표면 마커의 발현을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 분리된 CD4/CD8 T 세포는 CD95, CD127 또는 CD27 중 적어도 하나를 발현할 수 있다. 다른 구현예에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 추가로 중간적으로 4-1BB를 발현하고 선택적으로 OX40을 발현할 수 있다.

[0096] 다른 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 분리된 CD4/CD8 T-세포는 더 나아가 IL17RA, CD5, IL2RG, IGF2R, SLC38A1, IL7R, SLC44A2, SLC2A3, CD96, CD44, CD6, CCR4, IL4R, 혹은 SLC12A7의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 혹은 그 이상을 발현할 수 있다.

[0097] 일부 실시양태에서, 분리된 CD4/CD8 T 세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int}CD95+ CD127+CD27+ 표현형을 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 분리된 T-세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int}CD95+ CD127+CD27+IL7R+CD44+SCL38A1+IL2RG+CD6+CD5+ 표현형을 가질 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 분리 또는 분류 전 및/또는 후, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 분리된 CD4-CD8 T 세포는 소량의 IL-7 및/또는 IL-15를 포함하는 배양 배지에서 분리된 CD4/CD8 T 세포를 배양하여 농축할 수 있다. 낮은 IL-7/IL-15 조건에서 배양된 활성화된 CD4/CD8 T 세포(예: 10ng/ml 미만의 IL7/IL15 농도)는 높은 IL-7/IL-15 조건에서 배양된 활성화된 CD4/CD8 T 세포와 비교(예: 10ng/ml 초과 IL-7/IL-15 농도)하여 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단을 촉진하거나 형성할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0099] 일부 실시양태에서, 배양 배지는 IL-7 및/또는 IL-15를, 예를 들어, 약 100ng/ml 미만, 약 95ng/ml 미만, 약 90ng/ml 미만, 약 85ng/ml 미만, 약 80ng/ml 미만, 약 75ng/ml 미만, 약 70ng/ml 미만, 약 65ng/ml 미만, 약 60ng/ml 미만, 약 55ng/ml 미만, 약 50ng/ml 미만, 약 45ng/ml 미만, 약 40ng/ml 미만, 약 35ng/ml 미만, 약 30ng/ml 미만, 약 25ng/ml 미만, 약 20ng/ml 미만, 약 15ng/ml 미만, 약 10ng/ml, 약 5ng/ml 미만, 약 4ng/ml 미만, 약 3ng/ml 미만, 약 2ng/ml 미만, 또는 약 1ng/ml 미만의 일정 농도로 포함할 수 있다.

[0100] 본원에 기재된 저 IL-7/IL-15 농도 배양 배지를 사용하여, 세포 집단 또는 세포 배양은 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형 함량을 갖는 CD4/CD8 T 세포가 처리되지 않은 세포 집단 또는 세포 배양과 비교하여 약 2배 내지 약 1000배 이상 농축될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 처리되지 않은 세포 집단 또는 세포 배양물과 비교하여 적어도 약 5배 내지 약 500배 이상 농축될 수 있다. 다른 실시양태에

서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/C8 T 세포는 처리되지 않은 세포 집단 또는 세포 배양물과 비교하여 적어도 약 10배 내지 약 200배 농축될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/C8 T 세포는 처리되지 않은 세포 집단 또는 세포 배양물과 비교하여 적어도 약 20배 내지 약 100배 농축될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/C8 T 세포는 처리되지 않은 세포 집단 또는 세포 배양물과 비교하여 적어도 약 40배 내지 약 80배 농축될 수 있다. 특정 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/C8 T 세포는 처리되지 않은 세포 집단 또는 세포 배양물과 비교하여 적어도 약 2배 내지 약 20배 농축될 수 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 일단 분리 또는 분류되면, CD4/CD8 T-세포는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 유지하기 위해 TGF α /IL1 α 를 포함하는 배양 배지에서 배양될 수 있다. CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 세포에 TGF α 및/또는 IL1 α 추가는 피험자에게 투여하기 전에 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 유지할 수 있다.

[0102] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 활성화 및/또는 분리 전 또는 후에 CD4/CD8 T 세포를 유전적으로 변형시키는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 그 결과 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없을 수 있다. HIV가 인간 T 세포를 감염시킬 때 T 세포 수용체 CD4 및 두 개의 공동 수용체 중 하나인 케모카인 수용체 CCR5 또는 CXCR4와의 결합에 의존하여 세포로 진입한다. 인간 집단의 천연 CCR5 변이체("CCR5-~~A~~32")는 특히 동형접합 상태에서 HIV 감염에 내성이 있는 것으로 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 HIV가 T 세포를 감염시키는 것을 방지하고 궁극적으로 HIV 감염된 환자에서 T 세포 사멸 및 면역 기능 감소를 초래하는 것을 방지하기 위해, 보조 수용체 중 하나 또는 둘 모두의 파괴를 달성하여 세포가 바이러스에 내성을 갖도록 할 수 있다(미국 특허 번호. 7,951,925 참조). 현재 HIV 환자 T 세포가 CCR5 유전자를 녹아웃시키기 위해 CCR5 유전자와 생체 외에서 편집되는 임상 시험이 진행 중이다. 그런 다음 이 세포를 환자에게 다시 도입하여 HIV를 치료한다.

[0103] 일부 실시양태에서, CD4/CD8 T 세포는 분리된 T 세포에서 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 가지는 CD4/CD8 T 세포의 집단을 분리하기 전에 CD4/CD8 T 세포에 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없도록 유전적으로 변형될 수 있다. 다른 구체예에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단은 분리된 T-세포로부터 분리된 후에 유전적으로 변형될 수 있고 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 집단은 기능적 CCR5 및/또는 CXCR4 HIV 공동 수용체가 없다.

[0104] 일부 실시양태에서, CD4/CD8 T 세포의 유전자 변형 또는 게놈 편집은 형질도입, 형질감염 또는 전기천공에 의해 수행될 수 있다. 형질도입은 렌티바이러스, 감마-, 알파-레트로바이러스 또는 아데노바이러스 또는 핵산(DNA, mRNA, miRNA, 안타고미르, ODN), 단백질, 부위 특이적 뉴클레아제(징크 핑거 뉴클레아제, TALEN, CRISPR/R), 자가 복제 RNA 바이러스(예: 말 뇌병증 바이러스) 또는 통합-결합 렌티바이러스 벡터로부터 전기천공 또는 형질감염으로 수행될 수 있다.

[0105] 일부 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포 및/또는 CD4/CD8 T 세포는 조작된 뉴클레아제를 사용한 게놈 편집에 의해 유전적으로 변형될 수 있다. 게놈 편집은 서열 특이적 뉴클레아제를 사용하여 게놈 서열을 삽입, 삭제 또는 수정하는 과정이다. 현재 메가뉴클레아제, 진-핑거 뉴클레아제(ZFNs), 전사 활성화 인자 유사 효과기 기반 뉴클레아제(TALENs) 및 CRISPR-Cas 시스템을 비롯한 여러 게놈 편집 방법이 존재한다. 이 뉴클레아제는 이중 가닥 DNA 파손을 유도하며, 이는 NHEJ(비상동 말단 연결) 또는 HDR(상동성 의존 복구)에 의해 후속적으로 복구될 수 있으며, 이는 이중 가닥 파손을 둘러싼 DNA와 상동성을 갖는 주형을 사용하여 유전자의 삽입 또는 변형을 허용한다. 전통적으로 게놈 편집은 RNA 또는 DNA로 세포를 형질감염시키거나 형질도입하여 단백질을 생성하고, CRISPR-Cas 시스템의 경우 게놈 편집에 필요한 가이드 RNA를 생성하는 방식으로 수행되었다.

[0106] 예를 들어, 이중 가닥 파손(DSB)은 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 TAL 효과기 도메인 뉴클레아제(TALEN)와 같은 부위 특이적 뉴클레아제에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, Urnov et al. (2010) Nature 435(7042):646-51; 미국 특허. 번호 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054를 참조하면, 그 개시 내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 포함된다.

[0107] 또 다른 뉴클레아제 시스템은 CRISPR/Cas 시스템으로 알려진 박테리아 및 고세균에서 발견되는 소위 획득 면역

시스템의 사용을 포함한다. CRISPR/Cas 시스템은 박테리아의 40%와 고세균의 90%에서 발견되며 시스템의 복잡성이 다르다. 예를 들어, 미국 특허. 번호 8,697,359를 참조하세요. CRISPR 유전자좌(클러스터된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 회문 반복)는 외래 DNA의 짧은 세그먼트가 짧은 반복 회문 서열 사이에 통합되어 있는 유기체 게놈 내의 영역이다. 이 유전자좌는 전사되고 RNA 전사체("pre-crRNA")는 짧은 CRISPR RNA(crRNA)로 처리된다. "Cas" 단백질(CRISPR 관련)로 알려진 이러한 RNA와 단백질을 모두 통합하는 세 가지 유형의 CRISPR/Cas 시스템이 있다. 유형 I 및 III에는 모두 pre-crRNA를 처리하는 Cas 엔도뉴클레아제가 있으며, 이는 crRNA로 완전히 처리될 때 crRNA에 상보적인 핵산을 절단할 수 있는 다중 Cas 단백질 복합체를 조립한다.

[0108] 유형 II 시스템에서 crRNA는 pre-crRNA의 반복 서열에 상보적인 트랜스 활성화 RNA(tracrRNA)가 Cas9 단백질의 존재 하에 이중 가닥 특이적 RNase III에 의한 처리를 촉발하는 다른 메커니즘을 사용하여 생산된다. 그런 다음 Cas9는 성숙한 crRNA에 상보적인 표적 DNA를 절단할 수 있지만, Cas 9에 의한 절단은 crRNA와 표적 DNA 사이의 염기쌍과 PAM 서열(프로토스페이서 인접 모티프)이라고 하는 crRNA의 짧은 모티프의 존재에 의존한다. 또한, tracrRNA는 3' 말단에서 crRNA와 염기쌍을 형성하기 때문에 반드시 존재해야 하며, 이러한 결합은 Cas9 활성을 유발한다.

[0109] Cas9 단백질에는 적어도 2개의 뉴클레아제 도메인이 있다: 하나의 뉴클레아제 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 유사하고 다른 하나는 Ruv 엔도뉴클레아제 도메인과 유사하다. HNH 유형 도메인은 crRNA에 상보적인 DNA 가닥을 절단하는 역할을 하는 것으로 보이며 Ruv 도메인은 비-상보적 가닥을 절단한다.

[0110] crRNA-tracrRNA 복합체의 요구 사항은 crRNA와 tracrRNA의 어닐링에 의해 정상적으로 형성된 헤어핀을 포함하는 조작된 "단일 가이드 RNA"(sgRNA)를 사용하여 피할 수 있다(Jinek et al(2012) Science 337:816 및 Cong et al(2013) Scienceexpress/10.1126/science.1231143 참조). S. pyogenes에서 조작된 tracrRNA:crRNA 융합 또는 sgRNA는 이중 가닥 RNA:DNA 이중이량체가 Cas 관련 RNA와 표적 DNA 사이에 형성될 때 표적 DNA를 절단하도록 Cas9를 안내한다. Cas9 단백질과 PAM 서열을 포함하는 조작된 sgRNA를 포함하는 이 시스템은 RNA 가이드 게놈 편집에 사용되었고(Ramalingam ibid 참조), ZFN 및 TALEN과 유사한 편집 효율성으로 제브라피시 배아 게놈 편집 생체내에 유용했다(Hwang et al(2013) Nature Biotechnology 31(3):227 참조).

[0111] 특정 뉴클레아제는 또한 T 세포의 HIV 감염을 방지하기 위해 HIV 수용체에 펩티드 융합 억제제를 삽입하도록 조작될 수 있으며(공동 소유의 미국 특허 공개 번호 20120093787 참조), 여기서 이러한 펩티드 융합 억제제의 예는 C34 또는 fuzeon이다. 유사하게, HIV는 바이러스와 싸우기 위해 세포 내의 안전한 항구 유전자좌에 항-HIV 이식유전자를 삽입하기 위해 조작된 뉴클레아제를 사용함으로써 치료될 수 있다. 이러한 항-HIV 유전자의 예는 HIV 다단백질을 억제하는 징크 핑거 전사 인자를 코딩하는 서열, HIV 수용체의 발현을 억제하는 징크 핑거 전사 인자를 코딩하는 서열, CCR5 리보자임, HIV 다단백질을 표적으로 하는 siRNA 서열, Trim5alpha 제한 인자, APOBEC3G 제한 인자를 인코딩하는 서열, RevM10 단백질을 인코딩하는 서열, C46을 인코딩하는 서열, 기타 항-HIV 유전자, 자살 카세트 및 이들의 조합으로 선택될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 단일 가이드 RNA가 적합한 항-HIV 이식유전자의 통합을 위해 CCR5 또는 CXCR4 유전자를 표적화하는 서열을 포함하는 CRISPR/Cas 시스템으로 HIV를 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0112] 일부 구현예에서, 게놈 편집은 선택된 게놈 유전자좌로의 표적화된 삽입을 위한 부위 특이적 뉴클레아제를 사용한 절단을 포함할 수 있다(예: 공동 소유의 미국 특허. 번호 7,888,121 참조). 표적화된 유전자에 특이적인 뉴클레아제는 도입유전자 구조가 상동성 유도 복구(HDR)에 의해 또는 비-상동성 말단 연결(NHEJ) 구동 프로세스 동안 말단 포획에 의해 삽입되도록 이용될 수 있다. 표적 유전자좌에는 인간 세포의 AAVS1, HPRT 및 CCR5 유전자와 쥐 세포의 Rosa26과 같은 "세이프 하버" 유전자좌가 포함된다(예: 미국 특허. 번호. 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; 미국 특허 공개 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983 및 20130177960). 뉴클레아제 매개 통합은 전이유전자의 무작위 통합에 의존하는 기존 통합 접근법과 비교하여 개선된 전이유전자 발현, 증가된 안전성 및 발현 내구성의 전망을 제공하며, 이것은 주변 종양유전자의 활성화 또는 유전자 침묵의 위험을 최소화하기 위해 정확한 이식유전자 위치를 지정할 수 있기 때문이다.

[0113] 게놈 편집에는 위에서 설명한 삽입 방법 외에도 유전자 녹아웃이 포함될 수도 있다. 기증자 핵산이 없는 경우 절단된 게놈이 있는 세포는 오류가 발생하기 쉬운 NHEJ 경로에 의존하여 파손을 치유한다. 이 과정은 종종 표적 부위에서 미스센스 또는 넌센스 돌연변이의 도입으로 이어질 수 있는 복구 과정("인텔") 동안 뉴클레오티드를 추가하거나 삭제한다.

- [0114] 예를 들어, CCR5 특이적 징크 핑거 뉴클레아제는 T 세포에서 비기능성 CCR5 수용체를 생성하여 HIV 감염을 예방하기 위한 I/II상 시험에서 사용된다(미국 특허. 번호 7,951,925 참조). 그런 다음 이 세포를 환자에게 다시 도입하여 HIV를 치료한다. 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 단일 가이드 RNA가 인간 CCR5 유전자(chr3:46411633-46417697), 특히 엑손 영역(chr3:46414394-46415452) 또는 그 부근에서 표적화하는 서열을 포함하는 CRISPR/Cas 시스템으로 CCR5 대립유전자를 파괴하는데 사용될 수 있다.
- [0115] 녹아웃을 위한 CCR5 유전자를 표적화하기 위한 특히 바람직한 영역은 델타-32 돌연변이 영역(chr3:46414923-46415020 또는 그 부근) 근처의 영역이다. 또 다른 특히 바람직한 영역은 CCR5 단백질의 두 번째 세포외 루프의 일부를 인코딩하는 chr3: 46414522-46414643 주변이다. ATG 단백질 번역 개시 부위 또는 그 부근(chr3:46414347-46414466 또는 그 부근)은 또한 항 HIV 요법에 대한 표적 통합에 의한 C34 펩티드의 CCR5의 N-말단에의 융합과 같은 게놈 변형을 위해 특히 바람직하다.
- [0116] T 세포의 HIV 감염을 방지하기 위해 CXCR4가 선택적으로 파괴되거나 CCR5와 함께 파괴되는 CXCR4-의존성 HIV의 동물 모델에서 유사한 연구가 진행 중이다(미국 특허 공개 번호 20100291048 참조). 따라서, 여기에 설명된 방법 및 조성물은 CRISPR/Cas 시스템으로 CXCR4 대립유전자를 파괴하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 단일 가이드 RNA는 인간 CXCR4 유전자(chr2:136871919-136875725), 특히 엑손 2 영역(chr2:136872439-136873482) 및 작은 엑손1 주변 영역(chr2:17568756) 또는 그 부근에서 표적화하는 서열을 포함한다. 녹아웃을 위해 CXCR4 유전자를 표적화하기 위한 한 가지 바람직한 영역은 CCR5 유전자의 델타-32 돌연변이 영역과 유사한 chr2:136872863-136872982 또는 그 부근의 영역이다. exon1의 ATG 단백질 번역 개시 부위 부근의 chr2:136875540-136875687 또는 그 부근의 영역이 특히 바람직하고, 항 HIV 치료를 위한 표적 통합에 의한 CXCR4의 N-말단에 대한 C34 펩티드 융합과 같은 exon2의 스플라이싱 부위 근처의 chr2:136873389-136873558 영역이 유전자 변형에 특히 바람직하다. 따라서, sgRNA는 이들 바람직한 표적화 영역 중 하나 이상의 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는 CCR5 또는 CXCR4 유전자와의 임의의 서열에 결합하도록 설계될 수 있다.
- [0117] 뉴클레아제, 이들 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 공여자 폴리뉴클레오티드 및 본원에 기재된 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물은 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포 및/또는 CD4/CD8 T 세포에 생체외로 전달될 수 있다.
- [0118] 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제를 전달하는 방법은 예를 들어, 미국 특허. 번호 6,453,242; 6,503,717; 6,534,261; 6,599,692; 6,607,882; 6,689,558; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824에 기술되어 있으며, 이들 모두의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0119] 본원에 기재된 뉴클레아제 및/또는 공여자 작제물은 또한 CRISPR/Cas 시스템(들) 중 하나 이상을 코딩하는 서열을 함유하는 벡터를 사용하여 전달될 수 있다. 플라스미드 벡터, DNA 미니서클, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터; 헤르페스바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 등, 및 이들의 조합. 또한, 미국 특허. 번호 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824, 및 미국 공개. 번호 20140335063를 참조하세요(그 전체가 본원에 참조로 포함됨). 또한, 이들 벡터 중 임의의 것이 치료에 필요한 하나 이상의 서열을 포함할 수 있음이 명백할 것이다. 따라서, 하나 이상의 뉴클레아제 및 도너 작제물이 세포 내로 도입될 때, 뉴클레아제 및/또는 도너 폴리뉴클레오티드는 동일한 벡터 또는 상이한 벡터 상에서 운반될 수 있다. 다중 벡터가 사용되는 경우, 각각의 벡터는 하나 또는 다중 뉴클레아제 및/또는 공여자 작제물을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다.
- [0120] 기존의 바이러스 및 비바이러스 기반 유전자 전달 방법을 사용하여 뉴클레아제 및 공여자 구성체를 암호화하는 핵산을 세포(예: 포유동물 세포) 및 표적 조직에 도입할 수 있다. 비바이러스 벡터 전달 시스템에는 DNA 플라스미드, DNA 미니서클, 네이키드 핵산, 리포솜 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합된 핵산이 포함된다. 바이러스 벡터 전달 시스템에는 세포로 전달된 후 에피솜 또는 통합 게놈이 있는 DNA 및 RNA 바이러스가 포함된다. 유전자 치료 절차의 검토에 대해서는Anderson, Science 256:808-813 (1992); Nabel & Feigner, TIBTECH 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, TIBTECH 11:162-166 (1993); Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm (eds.) (1995); and Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 (1994)를 참조하세요.
- [0121] 핵산의 비-바이러스 전달 방법에는 전기천공, 리포펙션, 미세주사, 바이오리스틱, 바이로솜, 리포솜, 면역리포

숨, 폴리양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 캡핑된 RNA, 인공 비리온, 및 에이전트에 의해 강화된 DNA 흡수가 포함된다. Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 사용하는 Sonoporation은 핵산 전달에도 사용할 수 있다.

[0122] 추가적인 예시적인 핵산 전달 시스템은 Amaxa Biosystems(독일 쾰른), Maxcyte 회사에서 제공되는 것들을 포함한다. (Rockville, Md.), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, Mass.) 및 Copernicus Therapeutics Inc., (예를 들어, 미국 특허. 번호 6,008,336 참조). 예를 들어, 리포펙션은 미국 특허. 번호 5,049,386; 4,946,787; 및 4,897,355에 기술되어 있으며 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다(예: Transfectam.TM 및 Lipofectin.TM.). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체 인식 리포펙션에 적합한 양이온 및 중성 지질에는 Feigner의 지질이 포함된다, WO 91/17424, WO 91/16024.

[0123] 면역지질 복합체와 같은 표적화된 리포솜을 포함하는 지질:핵산 복합체의 제조는 당업자에게 잘 알려져 있다(예: Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 미국 특허. 번호 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, and 4,946,787 참조).

[0124] 추가 전달 방법에는 EnGeneIC 전달 차량(EDV)에 전달할 핵산을 포장하는 방법이 포함된다. 이러한 EDV는 항체의 한 팔이 표적 조직에 대해 특이성을 갖고 다른 팔이 EDV에 대해 특이성을 갖는 이중특이성 항체를 사용하여 표적 조직에 특이적으로 전달된다. 항체는 EDV를 표적 세포 표면으로 가져온 다음 세포내이입에 의해 EDV를 세포 내로 가져온다. 일단 세포에 들어가면 내용물이 방출된다(MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotechnology 27(7):643 참조).

[0125] 조작된 CRISPR/Cas 시스템을 인코딩하는 핵산 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 바이러스를 신체의 특정 세포로 표적화하고 바이러스 페이로드를 핵으로 수송하는 고도로 진화된 프로세스를 활용한다. 바이러스 벡터는 피험자에게 직접 투여할 수 있거나(생체내), 그들은 세포를 치료하는 데 사용될 수 있고 생체내 변형된 세포가 피험자에게 투여된다(생체외). CRISPR/Cas 시스템의 전달을 위한 기존의 바이러스 기반 시스템에는 유전자 전달을 위한 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련, 백시니아 및 단순 포진 바이러스 벡터가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 숙주 게놈의 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 아데노 관련 바이러스 유전자 전달 방법으로 가능하며 종종 삽입된 이식유전자의 장기간 발현을 초래한다. 또한, 다양한 세포 유형 및 표적 조직에서 높은 형질도입 효율이 관찰되었다.

[0126] 레트로바이러스의 친화성은 외래 외피 단백질을 통합하여 표적 세포의 잠재적인 표적 집단을 확장함으로써 변경될 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비분열 세포를 형질 도입하거나 감염시킬 수 있고 일반적으로 높은 바이러스 역가를 생성할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 레트로바이러스 유전자 전달 시스템의 선택은 표적 조직에 따라 다르다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6-10kb의 외래 서열에 대한 패키징 용량을 갖는 시스 작용 긴 말단 반복부로 구성된다. 최소 시스 작용 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 이 벡터는 치료 유전자를 표적 세포에 통합하여 영구적인 이식유전자 발현을 제공하는 데 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터에는 쥐 백혈병 바이러스(MuLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GaLV), 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 및 이들의 조합을 기반으로 하는 벡터가 포함된다(예: Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739(1992), Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640(1992), Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59(1990), Wilson et al. ., J. Virol. 63:2374-2378(1989); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224(1991); PCT/US94/05700 참조).

[0127] 일시적 발현이 선호되는 응용 분야에서 아데노바이러스 기반 시스템을 사용할 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율이 가능하며 세포 분열이 필요하지 않는다. 이러한 벡터를 사용하여 높은 역가 및 높은 수준의 발현이 얻어졌다. 이 벡터는 비교적 간단한 시스템에서 대량으로 생산할 수 있다. 아데노 관련 바이러스("AAV") 벡터는 또한, 예를 들어, 핵산 및 펩티드의 생체내 생산, 및 생체내 및 생체외 유전자 치료 절차와 같은 표적 핵산으로 세포를 형질도입하는 데 사용된다(예: West et al., Virology 160:38-47 (1987); 미국 특허. 번호. 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin 참조) 투자. 94:1351(1994). 재조합 AAV 벡터의 구성은 미국 특허. 번호 5,173,414; Tratschin et al., Mol. Cell를 포함하여 여러 간행물에 설명되어 있다. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984);

및 Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989).

- [0128] 적어도 6가지 바이러스 벡터 접근 방식이 현재 임상 시험에서 유전자 전달에 이용 가능하며, 형질도입 체제를 생성하기 위해 헬퍼 세포주에 삽입된 유전자에 의한 결합 벡터의 보완을 포함하는 접근 방식을 활용한다.
- [0129] pLASN 및 MFG-S는 임상 시험에서 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다(Dunbar et al., Blood 85:3048-305(1995); Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102(1995)). ; Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN은 유전자 치료 시험에서 사용된 최초의 치료 벡터였다. (Blaese et al., Science 270:475-480 (1995)). MFG-S 패키지 벡터에 대해 50% 이상의 형질도입 효율이 관찰되었다. (Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997)).
- [0130] 재조합 아데노 관련 바이러스 벡터(rAAV)는 결합이 있고 비병원성인 파코바이러스 아데노 관련 2형 바이러스를 기반으로 하는 유망한 대체 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 이식유전자 발현 카세트 옆에 있는 AAV 145 염기쌍(bp) 역 말단 반복만을 보유하는 플라스미드에서 유래한다. 형질도입된 세포의 계능으로의 통합으로 인한 효율적인 유전자 전달 및 안정적인 이식유전자 전달은 이 벡터 시스템의 핵심 기능이다. (Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996)). AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 AAVrh10, 및 이들의 모든 변이체를 포함하는 다른 AAV 혈청형이 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다.
- [0131] 복제-결핍 재조합 아데노바이러스 벡터(Ad)는 높은 역가로 생산될 수 있고 다수의 상이한 세포 유형을 쉽게 감염시킬 수 있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터는 이식유전자가 Ad E1a, E1b 및/또는 E3 유전자를 대체하도록 조작된다; 후속적으로 복제 결핍 벡터는 트랜스에서 결실된 유전자 기능을 공급하는 인간 293 세포에서 증식된다. Ad 벡터는 간, 신장 및 근육에서 발견되는 것과 같은 비분열 분화 세포를 포함하여 생체내 여러 유형의 조직을 형질도입할 수 있다. 기존 Ad 벡터는 전달 용량이 크다. 임상 시험에서 Ad 벡터를 사용한 예는 근육 주사를 통한 항종양 면역을 위한 폴리뉴클레오티드 요법과 관련된 것이다(Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)). 임상 시험에서 유전자 전달을 위한 아데노바이러스 벡터의 사용에 대한 추가 예는 Rosenacker et al., Infection 24:1 5-10 (1996)를 포함한다; Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997); Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998); Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998).
- [0132] 포장 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는 데 사용된다. 이러한 세포에는 아데노바이러스를 포장하는 293 세포와 레트로바이러스를 포장하는 psi.2 세포 또는 PA317 세포가 포함된다. 유전자 치료에 사용되는 바이러스 벡터는 일반적으로 핵산 벡터를 바이러스 입자로 포장하는 생산자 세포주에 의해 생성된다. 벡터는 일반적으로 패키징 및 숙주 내로의 후속 통합(해당되는 경우)에 필요한 최소 바이러스 서열을 포함하며, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 인코딩하는 발현 카세트에 대체된다. 누락된 바이러스 기능은 포장 세포주에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료에 사용되는 AAV 벡터는 일반적으로 패키징 및 숙주 계능으로의 통합에 필요한 AAV 계능의 역 말단 반복부(ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 인코딩하지만 ITR 서열이 없는 헬퍼 플라스미드를 포함하는 세포주에 포장되어 있다. 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스에 감염된다. 헬퍼 바이러스는 AAV 벡터의 복제 및 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부족으로 인해 상당한 양으로 포장되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은, 예를 들어, 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열처리에 의해 감소될 수 있다.
- [0133] 유전자 편집 벡터는, 일반적으로 벡터가 포함된 세포를 선택한 후 환자에게 세포를 다시 이식하고, 체외에서 CD45R^{int}CD45R^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포 및/또는 CD4/CD8 T 세포에 전달될 수 있다. 생체의 투여를 위한 유전자 편집 벡터를 포함하는 제형은 액체 또는 유화 액체의 현탁액을 포함할 수 있다. 활성 성분은 종종 약학적으로 허용되고 활성 성분과 상용성인 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제는 예를 들어 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 및 이들의 조합을 포함한다. 또한, 제형은 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제 또는 약제학적 조성물의 효과를 향상시키는 기타 시약과 같은 보조 물질을 소량 함유할 수 있다.
- [0134] 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생성된 CD45R^{int}CD45R^{int} 표현형을 갖는 선별된 농축 집단 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포는 피험자의 HIV 감염을 치료하기 위한 약학적 조성물과 같은 조성물에 포함될 수 있다. 조성물은 또한 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 약제학적 조성물과 관련하여, 담체는 세포 투여에 통상적으로 사용되는 임의의 것일 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 당업자에게 잘

알려져 있고 대중에게 쉽게 이용가능하다. 약학적으로 허용가능한 담체는 사용조건하에서 유해한 부작용이나 독성이 없는 것이 바람직하다.

[0135] 조성물은 대상체에 투여하기 위한 단위 투여 형태로 제조될 수 있다. 투여량 및 시기는 원하는 결과를 달성하기 위해 치료하는 임상상의 재량에 달려 있다. 조성물은 전신(예: 정맥내) 또는 국소(예: 종양내) 투여를 위해 제형화될 수 있다. 한 가지 예에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단은 정맥내 투여와 같은 비경구 투여용으로 제형화된다. 본원에서 기술된 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단을 포함하는 조성물은, 예를 들어, 피험자의 HIV 치료에 사용될 수 있다.

[0136] 투여용 조성물은 수성 담체와 같은 약학적으로 허용 가능한 담체로 제공된 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 농축 집단의 용액을 포함할 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수가 사용될 수 있다. 이러한 용액은 무균이며 일반적으로 바람직하지 않은 물질이 없다. 이들 조성물은 통상적이고 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제, 보조제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등의 대략적인 생리학적 조건에 필요한 약학적으로 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 이들 제제에서 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포의 수 또는 농도는 매우 다양할 수 있으며 선택된 특정 투여 방식 및 대상체의 필요에 따라 유체 부피, 점도, 체중 등에 따라 주로 선택된다. 유전자 요법, 면역요법 및/또는 세포 요법에 사용하기 위한 이러한 투여 형태를 제조하는 실제 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 자명할 것이다.

[0137] 한 예에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단은 0.9% 염화나트륨, USP를 함유한 주입 백에 추가할 수 있으며 경우에 따라 체중 1kg당 0.5~15mg의 용량으로 투여할 수 있다. CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단은 정맥주사 또는 볼루스보다는 느린 주입에 의해 투여될 수 있다. 한 예에서, 더 높은 부하 용량이 투여되고, 후속적으로 유지 용량이 더 낮은 수준으로 투여된다.

[0138] 용량, 예를 들어, CD45RA^{int}CD45RO^{int}를 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 수 표현형 투여는 합리적인 기간 동안 대상 또는 동물에서 치료 또는 예방 반응과 같은 효과를 나타내기에 충분해야 한다. 예를 들어, CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 수는 투여 시점으로부터 약 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 HIV를 치료하기에 충분해야 한다. 특정 실험시점에서, 기간은 훨씬 더 길 수 있다. CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 수는, 예를 들어, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 효능 및 치료할 동물(예: 인간)의 상태 및 동물(예: 인간)의 체중에 의해서 결정될 것이다.

[0139] CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 수는 또한 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 농축된 집단의 투여에 수반될 수 있는 부작용의 존재, 성격 및 정도에 따라 결정될 것이다. 일반적으로 주치의는 연령, 체중, 일반적인 건강,식이 요법, 성별, 투여 경로 및 치료되는 상태의 중증도와 같은 다양한 요인을 고려하여 각 개별 환자를 치료하면서 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 독창적인 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포의 수를 결정할 것이다. 예로서 본 발명을 제한하려는 것이 아니라, CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포의 수는 주입당 약 10×10^4 에서 약 10×10^{11} 세포, 주입당 약 10×10^5 에서 약 10×10^9 세포, 또는 주입당 약 10×10^7 에서 약 10×10^9 세포일 수 있다.

[0140] CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CD4/CD8 T 세포는 HIV 감염의 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험자에서 HIV 감염을 치료 또는 예방하는 방법으로 사용될 수 있다는 것이 고려된다. 이와 관련하여, 대상에서 HIV 감염을 치료 또는 예방하는 방법은 대상체에서 HIV를 치료하거나 예방하는 데 효과적인 양으로 본원에 기재된 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 가지는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포의 농

축된 집단을 피험자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.

- [0141] 일부 실시양태에서, HIV에 걸린 대상체에 조성물 또는 농축된 T-세포 집단의 투여는 절대 CD4 세포 수의 지속적인 증가, HIV 특이적 T 세포 면역의 회복, 및 대상체에서 HIV 저장소의 실질적인 붕괴 중 적어도 하나를 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 항레트로바이러스 요법을 받았고/받거나 계속 받고 있다.
- [0142] $CD45RA^{int} CD45RO^{int}$ 표현형을 가지는 투여된 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포는 숙주 또는 대상체에 대해 동종이체 또는 자가유래인 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 대상체의 자가 조직이다.
- [0143] 일부 실시양태에서, $CD45RA^{int} CD45RO^{int}$ 표현형을 가지는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포는 잠재적인 HIV 발현의 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. 잠재성 HIV 발현의 여러 활성화제가 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 잠복 HIV 발현의 활성화제는 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제 및 단백질 키나제 C 작용제를 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0144] HDAC 억제제가 HIV-1 프로모터의 전사 활성화를 유도한다는 것이 입증되었다. HDAC 억제제는 히스톤 데아세틸라제의 활성 감소에 영향을 미치는 임의의 분자일 수 있다. 여기에는 단백질, 펩티드, DNA 분자(안티센스 포함), RNA 분자(iRNA 제제 및 안티센스 포함) 및 소분자가 포함된다. 일부 실시양태에서, HDAC 억제제는 작은 간섭 RNA(siRNA), 예를 들어, HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 11에 대한 si/shRNA이다. 이러한 HDAC 억제제의 비제한적인 예는 하기에 제시되어 있다. HDAC 억제제는 본원에 기재된 HDAC 억제제의 임의의 염, 결정 구조, 무정형 구조, 수화물, 유도체, 대사산물, 입체이성질체, 구조적 이성질체 및 전구약물을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0145] 일부 실시양태에서, HDAC 억제제는 단쇄 지방산 (예: 부티르산나트륨, 이소발레레이트, 발레레이트, 4-페닐부티레이트(4-PBA), 페닐부티레이트(PB), 프로피오네이트, 부티라미드, 이소부티르아미드, 페닐아세테이트, 3-브로모프로피오네이트, 트리부티린, 발프로산(Vpa), 발프로에이트, 발프로에이트 반나트륨 및 헥사플루오로발레레이트*(PIVANEX))를 포함할 수 있다.
- [0146] 다른 실시양태에서, HDAC 억제제는 하이드록삼산 유도체(예: 수베로일아닐리드 하이드록삼산(SAHA, vorinostat), 트리코스타틴 A(TSA) 및 트리코스타틴 C와 같은 트리코스타틴 유사체, m-카복시신남산 비스하이드록사미드(CBHA), 피록사미드, 살리실비스하이드록삼산, 수베로일 비스하이드록삼산(SBHA), 아젤라익 비스하이드록삼산(ABHA) 아젤라익-1-하이드록사메이트-9-아닐리드(AAHA), 6-(3-클로로페닐우레이도) 카르포익 하이드록삼산(3C1-UCHA), 옥삼플라틴 [(2E)-5-[3-[(페닐설폰일)아미노]페닐]-펜트-2-엔-4-이노하이드록삼산], A-161906 Scriptaid, PXD-101(Prolifix), LAQ-824, CHAP, MW2796, MW2996, 또는 미국 특허 번호 5,369,108, 5,932,616, 5,700,811, 6,087,367 및 6,511,990에 개시된 임의의 히드록삼산)을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, HDAC 억제제는 SAHA이다.
- [0147] 또 다른 실시양태에서, HDAC 억제제는 벤즈아미드 유도체(예: CI-994; MS-275 [N-(2-아미노페닐)-4-[N-(피리딘-3-일 메톡시카르보닐)아미노메틸]벤즈아미드] 및 3'-MS-275의 아미노 유도체)를 포함할 수 있다.
- [0148] 또 다른 실시양태에서, HDAC 억제제는 고리형 펩티드(예: 트라프신 A(TPX)-고리형 테트라펩티드(시클로-(L-페닐알라닌-L-페닐알라닌-D-피페콜리닐-L-2-아미노-8-옥소-9,10- 에폭시 테카노일), FR901228 (FK 228, 덤시펩티드), FR225497 고리형 테트라펩티드, 아피시딘 고리형 테트라펩티드 [시클로(N-O-메틸-L-트립토판닐-L-이소류시닐-D-피페콜리닐-L-2-아미노-8) 옥소테카노일]), 아피시딘 Ia, 아피시딘 Ib, 아피시딘 Ic, 아피시딘 IIa 및 아피시딘 IIb, CHAP, HC-톡신 고리형 테트라펩티드, WF27082 고리형 테트라펩티드 및 클라미도신을 포함할 수 있다.
- [0149] 추가 HDAC 억제제에는 프삼마플린 및 데푸데신, 트리플루오로메틸 케톤과 같은 친전자성 케톤 유도체, N-메틸-?케토아미드와 같은 ?케토 아미드, LSD1 폴리펩티드, TNF-알파(TNF α), 유도성 전사 인자 NF-AT(활성화된 T 세포의 핵 인자)), 및 항- $I\epsilon B\alpha$ 또는 $I\epsilon B\epsilon$ 제제와 같은 천연 제품을 포함할 수 있다.
- [0150] $CD45RA^{int} CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포는 단독으로 또는 본원에 기술된 잠재성 HIV 발현의 활성제와 조합하여 잠재적으로 HIV에 감염된 피험자, 예를 들어, HIV에 잠재적으로 감염된 인간에게 투여될 수 있다. 피험자는 항레트로바이러스 요법(예: HAART) 치료에도 불구하고 HIV 저장소가 지속되는 피험자를 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 치료 유효량은 잠재적으로 HIV에 감염된 피험자에서 잠재적인 HIV 저장소를 상당히 감소시키기 위한 $CD45RA^{int} CD45RO^{int}$ 표현형을 갖는 CCR5 및/또는

CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포의 양이다.

- [0151] 다른 실시양태에서, CD45RA^{int} CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포 및 선택적으로 잠재적인 HIV 발현의 활성화제의 치료 유효량은 HAART 또는 면역독소에 사용되는 성분과 같은 HIV 감염 치료에 유용한 다른 치료제와 조합하여 피험자에게 투여될 수 있다.
- [0152] 상기 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 CD45RA^{int} CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포는 HIV 감염 치료에 유용한 하나 이상의 추가 치료제와 병용할 수 있다. CD45RA^{int} CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포와 HIV/AIDS 항바이러스제, 면역조절제, 항감염제 또는 백신의 조합 범위는 다음 목록에 국한되지 않으며 원칙적으로 AIDS 치료에 유용한 약학적 조성물과의 조합을 포함한다는 것이 이해될 것이다. HIV/AIDS 항바이러스제 및 기타 제제는 통상적으로 당업계에 보고된 바와 같은 이들의 통상적인 투여량 범위 및 요법으로 이들 조합에 사용될 것이다.
- [0153] 항바이러스제의 예는 항바이러스제 제조업체(상표명 및/또는 약품 이름 위치) 표시(활성)를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: abacavir GlaxoSmithKline HIV infection, AIDS, ARC GW 1592 (ZIAGEN) (nRTI); 1592U89 abacavir+GlaxoSmithKline HIV infection, AIDS, ARC (nnRTI); lamivudine+(TRIZIVIR) zidovudine acemannan Carrington Labs ARC (Irving, Tex.) ACH 126443 Achillion Pharm. HIV 감염, AIDS, ARC(뉴클레오시드 역전사 효소 억제제); acyclovir Burroughs Wellcome HIV 감염, AIDS, ARC, AZT AD-439와 조합 Tanox Biosystems HIV 감염, AIDS, ARC AD-519 Tanox Biosystems HIV 감염, AIDS, ARC 아데포비르 디피복실 Gilead HIV 감염, AIDS, ARC GS 840(RTI) ; AL-721 Ethigen ARC, PGL, HIV 양성, (캘리포니아주 로스앤젤레스), AIDS 알파 인터페론 GlaxoSmithKline Kaposi 육종, HIV, 조합 w/Retrovir AMD3100 AnorMed HIV 감염, AIDS, ARC(CXCR4 길항제); 암프레나비르 글락소스미스클라인 HIV 감염, AIDS, 141 W94(AGENERASE) ARC(PI); GW 141 VX478(Vertex) ansamycin Adria Laboratories ARC LM 427(Dublin, Ohio) Erbamont(Stamford, Conn.) 항체를 증화시키는 항체; Advanced Biotherapy AIDS, ARC pH 불안정한 알파 이상 개념(Rockville, Interferon Md.) AR177 Aronex Pharm HIV 감염, AIDS, ARC atazanavir(BMS 232632) Bristol-Myers-Squibb HIV 감염, AIDS, ARC(ZRIVADA)(PI); beta-fluoro-ddA Nat'l Cancer Institute AIDS 관련 질병 BMS-232623 Bristol-Myers Squibb/HIV 감염, AIDS, (CGP-73547) Novartis ARC(PI); BMS-234475 Bristol-Myers Squibb/HIV 감염, AIDS, (CGP-61755) Novartis ARC(PI); capravirine Pfizer HIV 감염, AIDS, (AG-1549, S-1153) ARC(nnRTI); CI-1012 Warner-Lambert HIV-1 감염 cidofovir Gilead Science CMV 망막염, 헤르페스, 유두종바이러스 황산 커드란 AJI Pharma USA HIV 감염 거대세포바이러스 면역 MedImmune CMV 망막염 글로빈 사이토벤 Syntex 시력 위협 CMV 간 시클로비르 말초 CMV hn조성 망막염, 텔라비르 약품 (RESCRIPTOR) ARC(nnRTI); 텍스트란 황산염 Ueno Fine Chem. 공업 AIDS, ARC, HIV Ltd. (일본 오사카) 양성 무증상 ddC Hoffman-La Roche HIV 감염, AIDS, ARC (잘시 타빈, (HIVID) (nRTI), 디데옥시시타딘 ddI 브리스톨-마이어스 스텝 HIV 감염, AIDS, ARC; AZT/d4T와 디데옥시 이노신(VIDEX) 조합 (nRTI) DPC 681 & DPC 684 DuPont HIV 감염, AIDS, ARC(PI) DPC 961 & DPC 083 DuPont HIV 감염 AIDS, ARC(nnRTI), emvirine Triangle Pharmaceuticals HIV 감염, AIDS, ARC(COACTINON)(비뉴클레오사이드 역방향 EL10 Elan Corp, PLC HIV 감염(Gainesville, Ga.) efavirenz DuPont HIV 감염, AIDS, (DMP 266) (SUSTIVA) ARC(nnRTI), Merck(STOCRIN) famciclovir Smith Kline 대상 포진, 단순 포진 엠트리시타빈 삼각형 의약품 HIV 감염, AIDS, ARC FTC(COVRACIL)(nRTI), Emory University emvirine Triangle Pharmaceuticals HIV 감염, AIDS, ARC(COACTINON)(비뉴클레오시드 역전사효소 억제제), HBY097 Hoechst Marion Roussel HIV 감염, AIDS, ARC(nnRTI)), 하이페리신 VIMRx Pharm. HIV 감염, AIDS, ARC 재조합 인간; Triton Biosciences AIDS, Kaposi 육종, 인터페론 베타(Alameda, CA); ARC 인터페론 알파-n3 인터페론 사이언스 ARC, AIDS 인디나비르; Merck(CRIXIVAN) HIV 감염, AIDS, ARC, 무증상 HIV 양성, 또한 AZT/ddI/ddC(PI)와 병용; ISIS 2922 ISIS 제약 CMV 망막염 JE2147/AG1776; Agouron HIV 감염, AIDS, ARC(PI); KNI-272 국립 암 연구소 HIV-assoc. 질병 라미부딘; 3TC Glaxo Wellcome HIV 감염, AIDS, (EPIVIR) ARC; 또한 AZT(nRTI)와 함께; 로부 카비르 Bristol-Myers Squibb CMV 감염; 로피나비르(ABT-378) 에보트 HIV 감염, AIDS, ARC(PI); 로피나비르+리 토나비르 에보트(KALETRA) HIV 감염, AIDS, ARC(ABT-378/r)(PI); mozenavir AVID(Camden, N.J.) HIV 감염, AIDS, ARC(DMP-450)(PI); nelfinavir Agouron HIV 감염, AIDS, (VIRACEPT) ARC(PI); 네비라핀 베헤링거 HIV 감염, AIDS, Ingleheim ARC(nnRTI); (VIRAMUNE) 노바프렌 Novaferon Labs, Inc. HIV 억제제(Akron, Ohio); 펜타 푸사이드 트리메리스 HIV 감염, AIDS, ARC T-20(융합 억제제); 펩타이드 T 페닌술라 랩스 AIDS 옥타펩타이드 (Belmont, CA) 서열 PRO 542 Progenics HIV 감염, AIDS, ARC(부착 억제제); PRO 140 Progenics HIV 감염, AIDS, ARC(CCR5 공동 수용체 억제제); 삼 나트륨 아스트라 약품. 제품, CMV 망막염, HIV 감염, 포스포노포르메

이트 Inc 기타 CMV 감염; PNU-140690 Pharmacia Upjohn HIV 감염, AIDS, ARC(PI); probucol Vyrex HIV 감염, AIDS; RBC-CD4Sheffield Med. Tech HIV 감염, AIDS, (Houston Tex.) ARC; 리토나비르 Abbott HIV 감염, AIDS, (ABT-538) (RITONAVIR) ARC (PI); 사퀴나비르 호프만-라로슈 HIV 감염, AIDS, (FORTOVASE) ARC(PI); 스타부딘 d4T Bristol-Myers Squibb HIV 감염, AIDS, ARC 디테히드로데옥시-(ZERIT.)(nRTI); 티미딘 T-1249 Trimeris HIV 감염, AIDS, ARC(융합 억제제); TAK-779 다케다 HIV 감염, AIDS, ARC(주사 가능한 CCR5 수용체 길항제); 테노포비르 길리어드(VIREAD) HIV 감염, AIDS, ARC(nRTI); 티프라나비르(PNU-140690) 베링거인겔하임 HIV 감염, AIDS, ARC(PI); TMC-120 & TMC-125 Tibotec HIV 감염, AIDS, ARC(nnRTI); TMC-126 Tibotec HIV 감염, AIDS, ARC(PI); valaciclovir GlaxoSmithKline 생식기 HSV 및 CMV 감염 virazole Viratek/ICN(Costa 무증상 HIV 양성, 리바비린 메사, 캘리포니아) LAS, ARC; 지도부딘; AZT GlaxoSmithKline HIV 감염, AIDS, ARC, (RETROVIR) 카포시 육종과 다른 요법(nRTI) 병용; [PI=프로테아제 억제제 nnRTI=비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제 NRTI=뉴클레오시드 역전사효소 억제제].

- [0154] 추가 치료제는 개별적으로, 순차적으로, 또는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포와 조합하여 사용될 수 있다. 피험자에 대한 투여는 동일하거나 상이한 투여 경로에 의해 또는 동일한 제약 제제로 함께 투여될 수 있다.
- [0155] 이 실시양태에 따르면, CCR5 및/또는 CXCR4 유전자는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형과 잠재성 HIV 발현의 활성제를 갖는 편집된 CD4/CD8 T 세포는 모든 HAART 요법 또는 그 구성요소와 함께 투여될 수 있다. HAART를 사용하는 현재의 치료 표준은 일반적으로 적어도 3개의 뉴클레오시드 역전사효소 억제제의 조합이며 종종 프로테아제 억제제 또는 대안적으로 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 포함한다. CD4⁺ 세포 수가 낮거나 혈장 RNA 수준이 높은 피험자는 더 공격적인 HAART가 필요할 수 있다. CD4⁺ 세포 수가 비교적 정상이고 장기간에 걸쳐 혈장 HIV RNA 수치가 측정할 수 없는 수준 이하인 피험자(즉, 느리거나 비진행자)의 경우 덜 공격적인 HAART가 필요할 수 있다. 초기 항레트로바이러스 요법으로 치료받는 항레트로바이러스 경험이 없는 피험자의 경우 항레트로바이러스 스 약물의 다른 조합(또는 콕테일)을 사용할 수 있다.
- [0156] 따라서, 일부 실시양태에서, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포 및 임의로, 잠재된 HIV 발현의 활성제는 뉴클레오사이드 역전사효소 억제제, 비뉴클레오사이드 HIV 역전사효소 억제제 및 프로테아제 억제제의 "콕테일"과 함께 피험자에게 공동 투여될 수 있다. 예를 들어, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집 CD4/CD8 T 세포 및 HDAC 억제제는 2개의 뉴클레오시드 역전사효소 억제제(예: ZIDOVUDINE(AZT) 및 LAMIVUDINE(3TC)) 및 하나의 프로테아제 억제제(예: INDINAVIR(MK-639))의 콕테일과 함께 투여할 수 있다. CCR5 및/또는 CXCR4 유전자는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 편집된 CD4/CD8 T 세포 및 HDAC 억제제와 같은 선택적으로 잠재적인 HIV 발현의 활성화제는 또한 하나의 뉴클레오시드 역전사효소 억제제(예: STAVUDINE(d4T)), 하나의 비뉴클레오시드 역전사효소 억제제(예: NEVIRAPINE(BI-RG-587))의 콕테일) 및 하나의 프로테아제 억제제(예: NELFINAVIR(AG-1343))와 공동으로 피험자에게 투여될 수 있다. 대안적으로, CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포 및 선택적으로 HDAC 억제제는 하나의 뉴클레오시드 역전사효소 억제제(예: ZIDOVUDINE(AZT))와 두 개의 프로테아제 억제제(예: NELFINAVIR (AG-1343) and SAQINAVIR (Ro-31-8959))와 공동으로 피험자에게 투여될 수 있다.
- [0157] 본 발명의 맥락에서 공동투여는 개선된 임상 결과를 달성하기 위해 조정된 치료 과정에서 하나 이상의 치료제를 투여하는 것을 의미하는 것으로 정의된다. 이러한 공동 투여는 또한 동시 확장일 수 있다. 즉, 겹치는 기간 동안 발생할 수 있다.
- [0158] 추가 실시양태에서, 면역독소는 CD45RA^{int}CD45RO^{int} 표현형을 갖는 CCR5 및/또는 CXCR4 유전자 편집된 CD4/CD8 T 세포를 가진 대상에게 공동 투여될 수 있다. 면역독소의 예는 바이러스 외피 당단백질 또는 이의 일부와 같은 세포 외부에서 발현되는 HIV 당단백질을 표적으로 하는 면역독소이다. 용어 "면역독소"는 항 HIV 외피 당단백질 항체와 같은 항체에 대한 독소의 공유 또는 비공유 결합을 지칭한다. 독소는 항체에 직접 연결되거나, 예를 들어 링커 분자를 통해 간접적으로 연결될 수 있다. 독소는 리신-A 및 아브린-A로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0159] 잠복 HIV 발현의 활성화(잠재 HIV 발현의 재활성화라고도 함)는 잠복 감염 세포를 생산적으로 감염된 세포로 전

환시키는 결과를 낳는다. 이 전환은 활성 바이러스 감염의 모든 특성(예: 감염성 입자 생성, 역전사효소 활성, 분비 항원, 세포 표면 항원, 가용성 항원, HIV RNA 및 HIV DNA 등)으로 측정할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 선택적으로 잠재성 HIV 발현의 활성화를 결정 또는 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 방법은 mRNA, 예를 들어, HIV mRNA를 결정 또는 검출하는 것을 포함한다. Tat mRNA, NF- κ B mRNA, NF-AT mRNA 및 폴리펩타이드를 암호화하는 기타 mRNA와 같은 다른 mRNA도 혼성화 및 증폭 기반 분석을 포함하나 이에 제한되지 않는 잘 알려진 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0160] 또 다른 실시양태에서, 증폭 기반 검정을 사용하여 HIV 유전자의 발현 수준을 측정한다. 한 실시양태에서, 잠재성 HIV 발현의 활성화는 HIV 폴리펩타이드의 발현 수준을 결정함으로써 검출할 수 있다. HIV 폴리펩타이드의 발현 수준은 친화성 포획, 질량 분석, HIV 단백질에 대한 전통적인 면역분석(예: gp120 및 역전사효소), PAGE, 웨스턴 블롯팅 또는 HPLC을 포함하지만 이에 국한되지 않는 여러 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0161] 이를 위해 사용할 수 있는 검출 패러다임에는 광학 방법, 전기화학적 방법(전압 측정 및 전류 측정 기술), 원자력 현미경, 무선 주파수 방법, 예를 들어, 다극 공명 분광법이 포함된다. 공초점 및 비공초점 모두에 대한 현미경 검사 외에 광학 방법 설명(예: 표면 플라즈몬 공명, 타원 측정법, 공진 거울 방법, 격자 결합기 도파관 방법 또는 간섭 측정법)은 형광, 발광, 화학 발광, 흡광도, 반사율, 투과율, 복굴절 또는 굴절률의 감지들이다.

[0162] 일부 실시양태에서, HIV 기반 벡터 구축물 및 본원에 기술된 PCR 산물의 글로벌 시퀀싱 및 454 파이로시퀀싱을 수행하여 자가 바이러스 집단의 생산 및 순도를 확인할 수 있다. 454는 샘플에서 대략적인 유전적 다양성을 얻기 위한 간단하고 효율적이며 비용 효율적인 수단이다. 예시적인 실시형태에서, DNA 벡터 및 혈장 RNA는 바코드 프라이머로 증폭된 다음 454 JR을 사용하여 시퀀싱되어 앰플리콘/샘플당 평균 ~2000개 판독값을 얻는다.

[0163] 본 발명은 하기 실험예를 참조하여 더욱 상세하게 설명된다. 이러한 예는 설명의 목적으로만 제공되며 달리 명시되지 않는 한 제한하려는 의도가 아니다. 따라서, 본 발명은 하기 실시예로 제한되는 것으로 결코 해석되어서는 안 되며, 오히려 여기에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 모든 변형을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0164] 실시예

[0165] 이 예에서 우리는 HIV에 감염된 성인이 CCR5 유전자 편집 CD4+ T 세포의 단일 주입을 받은 두 개의 독립적인 임상 시험에서 면역 재구성 및 바이러스학적 결과를 보여준다. 첫 번째 연구(SB-728-0902 임상 시험)에서 우리는 이 개입이 이전에 장기적인 효과적인 ART에도 불구하고 CD4+ T 세포 수를 정상화하는 데 실패한 개인 그룹에서 더 높은 CD4+ T 세포 수와 전반적인 T 세포 항상성의 회복을 초래한다는 것을 발견하였다. 중요하게도, 우리는 대다수의 참가자에서 HIV DNA가 1 log10 이상 감소하면 9명 중 4명이 100만 세포당 DNA를 복제하는 전체 HIV 저장소 크기의 상당한 장기적 붕괴를 관찰하였다. 이러한 결과는 HIV 복제 가능 저장소를 포함하지 않는 HIV DNA 측정을 사용하여 생성되었지만, HIV 저장소에서 매우 유의하게 관찰된 감소는 장기간 ART 동안 보고된 매우 안정적인 수준과 잠복기 역전제를 사용한 최근 임상 시험과 극명한 대조를 이룬다. 이러한 결과는 감염되지 않은 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 유래 세포에 의한 단명 HIV 감염 세포의 지속적인 교체로 인한 것으로 보인다. 두 번째 연구(SB-728-1101 임상 시험)에서 우리는 이러한 CCR5 유전자 편집 세포의 단일 주입으로 이 새로운 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 하위 집합이 생성되었음을 확인하였고, 이러한 세포의 더 높은 빈도는 ART 중단 후 개선된 HIV 복제 제어와 관련이 있었다. 이러한 관찰은 기억 CD4+ 줄기 세포의 CCR5 유전자 편집이 이러한 세포가 확장 및 바이러스 존재 하에서 다른 기억 하위 집합으로 분화할 수 있게 하고 감염으로부터 자손에 대한 보호를 제공하는 모델을 지원한다.

[0166] 재료 및 방법

[0167] SB-728-0902 임상 시험은 ART(ClinicalTrials.gov # NCT01044654)로 치료한 만성 HIV 감염 개인에 대한 1상, 공개 라벨, 비통제, 비무작위 연구이다. 이 연구는 Sangamo Therapeutics의 후원으로 2009년 12월부터 2014년 4월까지 미국의 두 센터에서 수행되었다. 연구의 1차 목적은 ZFN(SB-728-T 세포)에 의해 CCR5 유전자에서 편집된 자가 CD4+ 농축 T 세포의 상승하는 용량의 안전성과 내약성을 평가하는 것이었다. 2차 목표에는 CD4+ T 세포 수의 증가, CCR5 유전자 편집 세포의 장기 지속성, 장 점막으로의 귀환, HIV 바이러스 지속성(HIV RNA 및 프로바이러스 DNA)에 대한 영향 평가가 포함되었다. 총 9명의 참가자가 3개의 상승 용량 집단에 등록되었으며 각 집단에는 3명의 참가자가 포함되었다. 모든 참가자는 초기 4주 동안은 매주 추적 관찰되었으며 그 후 1년 동안은 매월 추적 관찰되었으며 그 후 3년 간의 안전성 연구에 등록되었다. 참여자 1-01은 12개월에서 31개월 사이

에 치료가 중단되었다.

- [0168] SB-728-1101 임상 시험은 ART(ClinicalTrials.gov #NCT01543152)로 치료받은 만성 HIV 감염 환자에 대한 1상, 공개 라벨, 비통제, 비무작위 연구이다. 이번 연구는 상가모 테라퓨틱스의 후원으로 2012년 3월부터 2017년 1월까지 미국 내 12개 센터에서 진행됐다. 연구의 주요 목적은 단일 용량의 SB-728-T 세포를 투여한 후 CD4+ T 세포 확장을 촉진하기 위해 사이클로포스파미드(CTX) 전처리 용량을 증량하는 것의 안전성과 내약성을 평가하는 것이었다. 참가자는 SB-728-T 세포 주입 하루 전 0.1(집단 1, $n = 3$), 0.5(집단 2, $n = 6$), 1.0(집단 3, $n = 3$), 1.5(집단 5, $n = 3$) 및 2.0g/m²(집단 4, $n = 3$) 용량으로 CTX를 받았다. 참가자들은 이후 ~100~400억 개의 SB-728-T 세포를 받았다. 모든 참가자는 초기 4주 동안 매주, 14주차까지 격월로, 22주차까지 매월, 그리고 12개월차까지 2개월마다 추적되었다. ART는 16주의 기간 동안 SB-728-T 주입 후 6주에 중단되었다(그림 17A). 2차 목표에는 ART 중단 후 혈장 HIV-1 RNA 수준에 대한 SB-728-T 세포의 영향 평가가 포함되었다. 치료 중단 동안, ART는 CD4+ T 세포 수가 <500 세포/μL로 떨어졌고/또는 HIV-RNA가 3주 연속 매주 측정에서 >100,000복제/mL로 증가한 참가자에게 다시 시작되었다. 모든 참가자는 1년 연구를 완료하고 연구에서 철회한 1명의 참가자를 제외하고 3년 장기 안전성 연구에 등록하였다. 한 참가자(03-003)는 ART를 중단하지 않았다.
- [0169] 최종 임상 프로토콜, 수정 사항 및 동의 문서가 각 연구 센터의 기관 검토 위원회 및 기관 생물 안전 위원회(필요 시)뿐만 아니라 NIH Recombinant DNA Advisory 위원회에서 검토 및 승인되었다. 모든 참가자는 서면 동의서를 제공하였다.
- [0170] 這 瀟
- [0171] SB-728-0902 戻*
- [0172] 적격한 참가자 는 ELISA에 의해 문서화된 바와 같이 18세 이상이고 HIV에 감염되었다. 참가자는 바이러스 혈증(검출할 수 없는 HIV RNA)이었고 CD4+ T 세포 수가 200~500세포/μL인 안정적인 ART를 받았으며 적절한 정맥 접근이 가능했으며 백혈구 성분채집에 대한 금기 사항이 없었다. 주요 제외 기준에는 CCR5 징크 핑거 뉴클레아제 표적 부위의 SNP, 현재 또는 이전 AIDS 진단, 마라비록 또는 면역억제제 치료를 받고 있는 경우, B형 간염 또는 C형 간염 동시 감염이 포함된다.
- [0173] SB-728-1101 戻*
- [0174] 적격 참가자는 18세 이상이고 ELISA 문서에 따르면 HIV에 감염되었다. 참가자는 CD4+ T 세포 수가 >500/μL인 안정한 ART에 대해 바이러스 감염이 있었고, R5 트로픽 HIV가 있었으며, 치료 중단 동안 현재 ART를 중단할 의향이 있다. 주요 배제 기준에는 아데노바이러스 중화 항체 >40, CCR5 징크 핑거 뉴클레아제 표적 부위의 SNP, 현재 또는 이전 AIDS 진단, 마라비록 또는 면역억제제 치료를 받고 있는 경우, B형 간염 또는 C형 간염 동시 감염이 포함되었다.
- [0175] 세포 제조
- [0176] 간단히 말해서, 참가자는 자가 CD4+ T 세포를 수집, 농축, 수정 및 확장하기 위해 10L 백혈구 성분채집술을 받았다. SB-728-T 는 CCR5 특이적 ZFN (SBS8196z 및 SBS8267)을 인코딩하는 복제 결함 제조합 Ad5/35 바이러스 벡터인 SB-728로 생체의 형질도입된 자가 CD4+ 농축 T 세포를 나타내며, 유전자 편집 세포와 편집되지 않은 세포의 혼합물을 포함한다. CCR5-특이적 ZFN의 발현은 세포의 DNA에서 이중 가닥 파손을 유도하며, 이는 세포 기계에 의해 복구되어 형질도입된 세포의 ~25%에서 무작위 서열 삽입 또는 결실(인델)을 유발한다. 이러한 삽입결실은 CCR5 코딩 서열을 방해하여 프레임시프트 돌연변이 및 단백질 발현 중절을 초래한다.
- [0177] 냉동보존된 말초혈액 단핵세포(PBMC) 샘플
- [0178] SB-728-0902
- [0179] 다양한 시점에서 냉동보존된 샘플의 가용성은 참가자마다 다르다; 결과적으로 시점은 주입 후 시점 초기(14~28일), 중기(4~7개월 또는 9~10개월), 후기(11~12개월) 및 장기(2~3년 또는 3~4년)로 그룹화되었다. 기준 샘플에는 초기 백혈구 성분채집술(주입 2~3개월 전)과 주입 1~2주 전 소량 채혈에서 냉동보존된 PBMC가 포함되었다. 참가자 1-01, 1-02 및 1-03의 PBMC는 주입 후 6개월 또는 8개월까지 동결보존되지 않았다. 대부분의 참가자는 분류된 CD4+ T 세포 하위 집합에서 CCR5 시퀀싱 및 통합 HIV DNA 정량과 같이 많은 양의 세포가 필요한 분석을 허용하기 위해 장기 추적 기간 동안 대량 채혈($n = 9$, 2 내지 3년) 및/또는 백혈구 성분채집술($n = 7$, 3 내지 4년)에 동의하였다. ICS 분석 및 CD95 유세포 분석 염색을 포함한 특정 분석의 경우 6명의 참가자에 대한 기준

샘플만 사용할 수 있었다. 모든 참가자에게 제조 샘플(SB-728-T 제품)도 제공되었다.

[0180]

SB-728-1101

[0181]

임상 측정(CD4, CD8 카운트, 바이러스 로드(VL) 및 Pentamer Duplication marker)을 모든 시점에서 수행하였다. 기준선 및 사전 ATI에서 동결보존된 PBMC의 가용성은 코호트 1 및 2 참가자에게 제공되지 않았다; 결과적으로 면역학적(T 세포 표현형, 분류된 CD4+ 하위 집합에서 ZFN 매개 돌연변이의 CCR5 DNA 시퀀싱) 및 바이러스학적(통합 HIV DNA) 측정은 집단 3 내지 5의 참가자에서만 수행되었다. 기준 샘플에는 초기 백혈구 성분 채집술(주입 2 내지 3개월 전)과 주입 1 내지 2주 전에 채취한 소량의 혈액에서 냉동보존된 PBMC가 포함되었다. 제조 샘플(SB-728-T 제품)은 집단 3-5 참가자에게도 제공되었다.

[0182]

特 *? * 雰 * 塵

[0183]

기준선, 14일, 3, 6, 12개월에 SB-928-0902 시험 참가자에 대해 직장 생검을 수행하였다(n 는 시점당 참가자 3명에서 9명 사이에서 다양함). 콜라게나제 소화 및 18G 바늘로 조르기를 조합하여 내시경으로 얻은 S상 결장 생검에서 점막 단핵 세포를 분리하였다. 서해부 림프절은 한 시점(SB-728-T 주입 후 9개월에서 18개월 사이)에서 3명의 지원자로부터 생검되었다. Anton et al.⁴⁷에 설명된 대로 조직을 단일 세포로 처리하였고 CCR5 유전자 변형 평가를 위해 게놈 DNA를 분리하였다.

[0184]

중합효소 연쇄 반응에 의한 CCR5 유전자 편집 CD4+ T 세포의 정량화

[0185]

ZFN 매개 유전자 변형은 광범위한 프레임 이동 돌연변이를 생성하여 CCR5 유전자 좌를 파괴할 수 있다. PCR 기반 분석은 유전자 편집 대립유전자의 약 25%에서 ZFN 절단 부위에서 5-뉴클레오타이드(Pentamer) DNA 서열 CTGAT의 고유한 복제 획득을 측정하기 위해 개발되었다. 상업적으로 이용 가능한 키트(Masterpure DNA Purification 키트, Epicenter, Madison, WI)를 사용하여 PBMC에서 게놈 DNA(gDNA)를 추출하였다. CCR5 유전자 변형을 포함하는 1.1kb 영역을 증폭하기 위해 5μg의 gDNA로 표준 PCR을 수행하였다. 이 1.1kb 앰플리콘은 이후에 두 개의 독립적인 qPCR, 하나는 Pentamer Duplication-CCR5 유전자 편집 대립유전자에 대해 특이적이고(Pentamer Duplication이 포함된 프라이머를 사용하여), 다른 하나는 모든 CCR5 대립유전자를 증폭하는 것으로 평가된다. Pentamer Duplication 특정 템플릿의 비율과 CCR5 대립유전자의 총 수는 1백만 PBMC당 Pentamer Duplications를 산출한다. 분석은 총 CCR5 대립유전자 10^5 당 하나의 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 민감도를 갖는다. PBMC에서 CCR5 유전자 편집 세포의 빈도는 Pentamer Duplication 유전자 편집 세포의 빈도를 4로 곱하여 추정하였다.

[0186]

Cel-I를 사용한 SB-728-T 제품의 CCR5 유전자 변형 정량화

[0187]

Cel-I 뉴클레아제는 이중 나선 DNA 구조의 돌출 또는 불일치에 의해 생성된 왜곡 부위에서 DNA 이중가닥을 특이적으로 절단한다. 우리는 일반적으로 ZFN 매개 유전자 변형에 의해 유도된 사소한 삽입결실의 정량화를 위해 이 효소를 사용하여 프로토콜을 조정하였다. 간단히 말해서, 관심 게놈 영역(CCR5)은 PCR 증폭되고, PCR 산물은 변성된 다음 다시 어닐링되어 야생형 및 비-상동 말단 결합-편집된 대립유전자가 함께 다시 어닐링되고 이중 이중체를 생성할 수 있다. 다시 어닐링된 PCR 산물은 Cel-I 뉴클레아제로 분해되어 불일치 부위에서 PCR 증폭된 DNA를 절단한다. 후속적으로, ZFN-매개 유전자 변형의 수준은 2개의 더 낮은 이동 절단 생성물에 대한 절단되지 않은 모 단편의 비율을 결정함으로써 정량화될 수 있다.

[0188]

차세대 시퀀싱/MiSeq를 통한 CCR5 유전자 변형의 정량화

[0189]

관심 유전자좌(CCR5의 ZFN 결합 부위)는 게놈 DNA로부터 PCR 증폭되었고, 각 유전자좌의 변형 수준은 Illumina MiSeq 시퀀서에서 페어드 엔드 딥 시퀀싱에 의해 결정되었다. 쌍을 이루는 시퀀스는 SeqPrep(John St. John, <https://github.com/jstjohn/SeqPrep>, 미공개)를 통해 병합되었다. Needleman-Wunsch 정렬은 indel을 매핑하기 위해 표적 앰플리콘 게놈 영역과 획득된 Illumina 서열 사이에 수행되었다. CCR5 시퀀싱은 SB-728-0902 참가자의 분류된 CD4+ T 세포 하위 집합에서 SB-728-T 제품($n = 9$) 및 3 내지 4년차 샘플($n = 8$) 및 SB-728-1101 집단에서 SB-728-T 제품($n = 7$) 및 6주 및 22주 샘플($n = 7$)의 3 내지 5명의 참가자에서 수행되었다. CCR5 유전자 편집된 메모리 서브세트 세포 수는 CCR5 시퀀싱에 의해 결정된 각 메모리 서브세트 내의 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도로 각 기억 서브세트 세포 수를 곱하여 추정되었다.

[0190]

SB-728-T 주입 후 CCR5 유전자 편집 CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}의 세포 추적

[0191] 분류된 CD4⁺ T 세포 서브세트에서 CCR5 ZFN-매개 돌연변이의 시퀀싱을 사용하여 주입 후 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포의 분화를 추적하였다. 첫째, 야생형 CCR5(엠폴리콘) 및 시퀀싱된 샘플 중 단 1개에서만 검출된 서열은 추가 분석에서 제외되었다(고유한 CCR5 서열의 ~80%). 그런 다음 각 기증자에 대해 SB-728-T 제품에서 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포에서만 발현되는 서열을 확인하였고, 이후 3 내지 4년차 샘플(SB-728-0902) 또는 6주차 및 22주차 샘플(SB-728-1101)에서 CD4⁺ T 세포 메모리 하위 집합의 분포를 분석하였다.

[0192] 주입 후 SB-728-T의 확장 추정

[0193] 주입된 CCR5 유전자 편집 세포의 양과 관련하여 참가자에게 지속되는 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 수준은 가정에 펜타머 복제 마커 및 CD4⁺ 세포 수에 의한 CCR5 변형 측정값을 사용하여 추정할 수 있다; 1) 혈액량은 4.7리터 2) 모든 CD4⁺ T 세포의 약 2.5%가 주변⁴⁹에서 발견된다. 3) SB-728-T 제품 분포는 내인성 CD4⁺ T 세포와 유사하다(S상 결절과 서혜부 결절의 CD4⁺ T 세포에서 CCR5 변형 수준은 주변부와 유사, 그림 8E).

[0194]

$$\text{생각 의 SB-728-T} = \frac{(\% \text{ CD4 with the 펜타머 복사 재점자}) \times (\text{CD4 카운트}) \times (\text{피 용량}) \times \frac{1}{25\%}}{(\% \text{ SB-728-T with the 펜타머 복사 메이커}) \times (\text{총 SB-728-T 주입된})}$$

[0195] 滯*?* SB-728-T 盧 荷~ SB-728-T ㄱ* 숙 X*

[0196] CD4⁺ 및 CD8⁺ 하위 집합에 대한 공동 억제 수용체의 분석 및 평가는 T_{SCM} 패널 또는 음성 조절 패널 중 하나를 4℃에서 30분간 유지한 후 2% FA(Sigma Aldrich)로 22℃에서 15분간 고정하고 표면 염색된 백만 개의 해동된 PBMC를 사용하여 수행되었다. 두패널 모두 CD3 Alexa 700 (clone UCHT1) (BD Biosciences), CD4 Qdot 605 (clone S3.5) (Invitrogen), CD27 APCe780 (clone O323) (eBioscience), CD8 PerCP (clone SK1), CD45RA BV650 (clone HI100), CD45RO PerCPe710 (clone UCHL1) (Biolegend). 및 아쿠아 형광 반응성 염료 (죽은 세포 마커) (Invitrogen)를 포함하였다. T_{SCM} 패널은 CD95 PE-Cy7 (clone DX2), CD58 PE (clone 1C3), CD127 BV421 (clone HIL-7R-M21), CD28 APC (clone CD28.2), CD14 V500 (clone M5E2) (BD Biosciences), CD19 BV510 (clone H1B19) (Biolegend), 및 CCR7 FITC (clone 150503) (R&D)를 포함하였다. 음성 조절 패널에는 CCR7 PE-CF594 (clone 150503), CTLA-4 APC (clone BNI3), CD31 PE (clone WM59) (BD Biosciences), Tim-3 BV421 (clone F38-2E2), PD-1 PE-Cy7 (clone EH12.2H7) (Biolegend), 및 LAG-3 FITC (clone 17B4) (Novus Biologicals)를 포함하였다. BD LSR-II를 사용하여 24시간 이내에 최소 100,000개의 살아있는 세포를 획득하고 FlowJo 버전 9를 사용하여 분석하였다.

[0197] 숙 ㄱ

[0198] Pentamer Duplication maker 및 CD4⁺ T 세포 하위 집합 내의 통합된 DNA 수준의 정량화를 위해 CD4⁺ T 세포는 음성 자기 선택(StemCell)에 의해 PBMC에서 먼저 분리되었고, 이후 표면이 CD3 Alexa 700 (clone UCHT1), CD95 PE-Cy7 (clone DX2), CD58 PE (clone 1C3), CD127 BV421 (clone HIL-7R-M21), CD28 APC (clone CD28.2), CD14 V500 (clone M5E2) (all BD Biosciences), CD4 Qdot 605 (clone S3.5) (Invitrogen), CD27 APCe780 (clone O323) (eBioscience), CD8 PerCP (clone SK1), CD45RA BV 650 (clone HI100), CD45RO PerCPe710 (clone UCHL1), CD19 BV 510 (clone H1B19) (Biolegend), CCR7 FITC (clone 150503) (R&D) 및 아쿠아 형광 반응성 염료 (Invitrogen)로 얼룩진다. 그런 다음 최대 200,000개의 총 CD4⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포 하위 집합을 FACSria(Becton Dickinson)로 분류하고 분석할 때까지 -80° C에서 건조 펠릿으로 보관하였다. 면역 하위 집합의 유전자 배열 분석을 위해 10,000개의 정렬된 세포를 1% ?메르캅토에탄올이 포함된 500 μL의 RLT 완충액이 포함된 RNase가 없는 1.5mL 에펜도르프 튜브에 직접 수집하고 분석할 때까지 -80° C에서 보관하였다.

[0199] PBMC HIV DNA, 純*?* 己* CD4+ T 숙 垢 凶

[0200] PBMC의 총 HIV DNA는 액적 디지털 중합효소 연쇄 반응에 의해 측정되었다. 간단히 말해서, 상업적으로 이용 가능한 키트(Masterpure DNA Purification 키트, Epicenter, Madison, WI)를 사용하여 PBMC에서 게놈 DNA(gDNA)를 추출하였다. 2 μg의 gDNA를 제한효소 DdeI로 37℃에서 1시간 동안 분해하였다. PCR 액적은 제조업체의 권장 사항에 따라 준비되었다. 간단히 말해서, 20 μL의 다중 PCR 혼합물은 250 또는 500ng의 소화된 gDNA를 ddPCR제 2x 마스터 믹스 및 2개의 Taqman 프라이머/프로브 세트와 혼합하여 준비한다. PCR 액적은 QX-100 액적 생성기를 사용하여 DG8제 카트리지에서 생성되었으며, 여기서 각 20 μL PCR 혼합물은 약 15,000나노리터 크기 액적으로

분할되었다. PCR 액적을 96-웰 PCR 플레이트로 옮기고 호일로 밀봉하였다. Bio-Rad C1000 Thermal Cycler(95°C(60초), 94°C(30초)/60°C의 40 사이클(60초), 98°C(초))로 표준 PCR을 수행하였다. HIV DNA 복제 수는 QX-100 Droplet Digital PCR 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 평가되었다. HIV gag 및 RPP30에 대한 PCR-양성 및 PCR-음성 액적을 결정하고 주형 농도를 푸아송 분석에 의해 계산하였다. HIV 복제 수는 HIV 개그 농도를 RPP30 농도로 정규화하여 결정하였다. 통합 DNA는 기준선에서 SB-728-T 제품, 2-3년차 샘플($n = 9$) 및 SB-728-T 제품 및 3-4년차 샘플($n = 8$)로 SB-728-0902 참가자의 정제된 CD4+ T 세포에서 이전에 설명한 대로 측정되었다. 통합된 DNA는 SB-728-1101 집단 기준선 참가자 3 내지 5명, 2 내지 6주 및 14 내지 22주 샘플($n = 8$)로 정제된 CD4+ T 세포와 분류된 CD4+ T 세포 하위 집합에서도 측정되었다.

[0201] HIV -* 規

[0202] HIV Tropism*?* 綵* Trofile® DNA 規(Monogram BioSciences/LabCorp, South San Francisco, CA)*?* 倍軀 咫 猓*. 牧? 汎 DNA ?* PBMC~ 穡猓*. HIV -뭉 HIV ? 捧* ?* PBMC 荷~ 沖猓, 察垣? ??輪*, 猓牧? 𠂆* 逵' *, 貶 穡* 𠂆* 穡軀 倍軀 咫 穡 穡 數돏 規* 倍軀 誠猓.

[0203] 穡* 鍊氏* 𠂆

[0204] 해동된 PBMC를 Brefeldin A(5 µg/mL)(Sigma Aldrich) 및 개그 펩티드(1 µg/peptide/mL; NIH AIDS 시약 프로그램), 포도상구균 장독소 B(SEB; 1 µg/mL) 또는 6시간 동안 완전 배지(모의) 중 하나로 각각 2백만 개의 세포를 자극하기 전에 12시간 동안 휴지시켰다. 그런 다음 세포 표면은 CD3 Alexa 700(클론 UCHT1), CD8 Pacific Blue(클론 RPA-T8), CCR7 PE-CF594(클론 150503), CD14 V500(클론 M5E2)(BD Biosciences), CD4 Qdot 605(클론 S3.5), CD20 APC (클론 0323) (Invitrogen), CD45RA BV 650 (클론 HI100), CD19 BV 510 (클론 H1B19) (Biolegend), 및 아쿠아 형광 반응성 염료 (Invitrogen)로 염색되었고, 0.05% 사포닌으로 투과되었고, 2% 포름 알데히드로 고정하기 전에 IL-2 PerCP-Cy5.5(클론 MQ1-17H12), IFN γ APC(클론 B27) 및 TNF α Alexa Fluor 488(클론 MAB11)(BD Biosciences)로 세포 내 염색되었다. BD LSR-II를 사용하여 24시간 이내에 세포를 획득하였다. 최소 500,000개의 라이브 이벤트가 획득되었다. FlowJo 버전 9를 사용하여 세포를 분석했으며 부울 게이팅 기능을 사용하여 다작용성 CD8+ T 하위 집합의 분포를 결정하였다.

[0205] T 穡 穡*(TCR) 𠂆猓

[0206] TCR 레퍼토리 분석은 면역 서열 분석(Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA)으로 수행되었다. 면역 서열 분석 방법은 다중 PCR로 재배열된 TCR CDR3 서열을 증폭하여 분리된 게놈 DNA에서 모든 Vβ 및 Jβ 조합을 탐색하고, 고처리량 시퀀싱 기술을 사용하여 TCR CDR3 사슬을 시퀀싱하여 각 샘플 내 다양한 T 세포 클론의 구성을 결정한다. TCR 다양성은 각 샘플에 존재하는 TCR Vβ CDR3 서열의 고유한 클론 수(농축됨)와 클론 분포(균일함)를 모두 설명하는 Shannon 엔트로피 지수를 사용하여 평가된다. 더 큰 Shannon 엔트로피 지수는 TCR Vβ CDR3 서열의 더 다양한 분포를 반영한다.

[0207] ?* 𠂆(b)穡* ?* 規

[0208] 선택된 CD4+ 또는 CD8+ 서브세트를 위에서 설명한 대로 RLT 버퍼로 분류하였다. 구체적으로, CD4+ T_{CM}, CD4+ T_{TM}, CD4+ T_{EM} 및 CD8+ 총 메모리 셀은 기준선과 12개월째에 분류되었다. 또한 CD4+ 메모리 하위 집합도 3-4년차에 정렬되었고, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}, T_{CM}, 및 T_{EM} 세포가 포함되었다. 분류된 세포는 제조업체의 지침(Qiagen, Valencia, CA)에 따라 RNA 추출을 위해 용해되었다. T7 oligo(dT) 프라이밍된 역전사 반응을 수행한 후 생체내 전사를 수행하였다. 이 제품은 제조업체의 지침에 따라 Illumina Human HT-12 버전 4 Expression BeadChip에 혼성화되고 Illumina iScan 시스템을 사용하여 정량화된 바이오틴 표지된 aRNA를 생성하는 두 번째 증폭(Life Technologies의 MessageAmp II aRNA 증폭 키트)을 거쳤다.

[0209] 유전자 어레이 출력 데이터의 분석은 R 통계 언어와 생체전도체의 LIMMA(Linear Models for Microarray Data) 통계 패키지를 사용하여 수행되었다. 간단히 말해서, 스캔된 어레이 이미지에서 칩 내 인공물 및 비정상적인 신호 분포를 검사하고 전체 강도 또는 변동성이 낮은 어레이는 분석에서 제거하였다. 밀도 플롯, 상자 플롯 및 어레이 간 거리의 히트맵과 같은 진단 플롯을 사용하여 칩 간의 혼성화 품질을 평가하였다. 분위수 정규화 방법을 사용하여 정규화되기 전에 강도를 log2로 변환하였다. 주석이 달린 RefSeq 유전자와 대조 프로브에 매핑되지 않은 프로브는 제거되었다. 차별적으로 발현된 유전자 분석은 기준선과 비교하여 12개월째에 CD4+ T_{CM} ($n = 6$), CD4+ T_{TM} ($n = 9$), CD4+ T_{EM} ($n = 7$) 및 CD8+ 총 메모리 세포($n = 9$) 및 3-4년차($n = 7$)의 CD4+ T_{CM} 및

T_{EM} 하위 집합과 비교하여 $CD4^+ CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 에서 수행되었다. 서로 다른 시점 또는 하위 집합 간의 유전자 발현 수준의 차이는 종단 기증자 쌍 분석을 수행하여 결정되었다. LIMMA 패키지에 구현된 완화된 t-검정을 사용하여 기준선과 월간 유전자의 차등 발현의 통계적 유의성($P < 0.05$)을 평가하였다. 모든 마이크로어레이 데이터는 등록 번호 GSE66214로 GEO에 기탁되었다.

[0210] 우리는 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)를 사용하여 주입 후 T 기억 세포에서 조절되는 농축된 생물학적 경로를 식별하였다(그림 4). GSEA는 특정 유전자 집합의 구성원이 관심 결과와의 연관성 강도에 따라 순위가 매겨지는 순위 지정 유전자 목록의 맨 위 또는 맨 아래 우선적으로 발생하는지 여부를 결정하는 통계적 방법이다. 보다 구체적으로, GSEA는 다르게 발현된 유전자 중에서 유전자 세트가 과대 표현되는 정도를 반영하는 농축 점수(NES)를 계산한다. 관찰된 NES의 중요성은 순열 테스트를 통해 얻는다: 즉, 관찰된 NES가 우연히 발생하는 빈도를 결정하기 위해 유전자 목록에 의존한다. Leading Edge 분석은 농축에 가장 많이 기여하는 유전자 세트의 특정 유전자를 검사하기 위해 수행된다. GSEA의 사전 순위 유전자 목록 옵션을 사용하였고 데이터 내에서 Treg 및 STAT3 경로의 농축을 테스트하기 위해서 MSigDB(<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>) 맞춤형 유전자 세트 및 선별된 유전자 세트의 농축을 테스트하였다. 우리는 거짓 발견률(FDR) > 25% 및 명목 P 값 > 0.05인 유전자 세트를 폐기하였다.

[0211] 우리는 $CD4^+ CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 대비 $CD4^+ T_{CM}$ 및 $CD4^+ CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 대비 $CD4^+ T_{EM}$ 를 비교하여 농축된 경로를 식별하기 위해 Fisher 결합 테스트 접근 방식과 함께 위에서 설명한 대로 GSEA를 사용하였다. T_{EM} 및 T_{EM} 에 비해 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 에서 유도되거나 억제된 유전자가 상당히 농축된 선택된 경로 T_{CM} 은 여러 생물학적 기능으로 그룹화되었다; 세포 주기, 세포 대사, 사이토카인 신호, 노치 신호 및 세포자멸사(그림 4A).

[0212] $CD4^+ T_{CM}$, T_{EM} , T_{TM} , $CD8^+$ 및 $CD4^+ T_{SCM}$ 의 유전자 발현을 비교하여 농축된 경로를 식별하기 위해 Fisher 결합 테스트 접근 방식과 함께 위에서 설명한 대로 GSEA를 사용하였다. T_{EM} 및 T_{EM} 에 비해 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 에서 유도되거나 억제된 유전자가 상당히 농축된 선택된 경로 T_{CM} 은 여러 생물학적 기능으로 그룹화되었다; 세포 주기, 세포 대사, 사이토카인 신호, 노치 신호 및 세포자멸사(그림 4A).

[0213] $CD4^+ T_{CM}$, T_{EM} , T_{TM} , $CD8^+$ 및 $CD4^+ T_{SCM}$ 의 유전자 발현을 비교하여 농축된 경로를 식별하기 위해 Fisher 결합 테스트 접근 방식과 함께 위에서 설명한 대로 GSEA를 사용하였다. T_{EM} 및 T_{EM} 에 비해 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 에서 유도되거나 억제된 유전자가 상당히 농축된 선택된 경로 T_{CM} 은 여러 생물학적 기능으로 그룹화되었다; 세포 주기, 세포 대사, 사이토카인 신호, 노치 신호 및 세포자멸사(그림 4A).

[0214] 2-4년차에 PBMC 10^6 개당 총 HIV DNA 복제 및 3-4년차에 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 계산 빈도와 상호 관련이 있는 3 내지 4년차 샘플에서 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 에 의해 발현된 유전자를 식별하기 위해 선형 회귀 분석을 사용하였다. $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 의 유전자 발현과 이러한 결과의 수준 사이의 선형 모델(R 언어 사용)을 연속 변수로 맞추었으며 GSEA를 사용하여 경로를 두 관독값과 긍정적 또는 부정적으로 연관시켰다. 우리는 유사한 방식으로 변조된 경로와 다른 방향으로 변조된 경로를 그림 4g에 표시하였다. 우리는 2-4년차에 전체 HIV DNA로 측정된 HIV 저장소 크기와 양의 상관관계가 있고 3-4년차에 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 수와 음의 상관관계가 있는(그림 4H,I) 상위 경로를 정규화된 농축 점수를 플로팅하여 강조 표시하였다. 이 분석은 참가자 7명 중 6명에서 수행되었다; 주입 후 $CD45RA^{int} RO^{int} T_{SCM}$ 세포의 생착이 낮은 참가자 1-02는 탐색적 분석에서 이상값으로 식별되어 분석에서 제외되었다.

[0215] 泣規

[0216] HIV 저장소 분석

[0217] 시간(일)에 따른 주입 후 HIV 저장소의 전체 감쇠(10^6 PBMC당 총 HIV DNA로 측정됨)는 R 패키지 lme4의 lmer 함수에서 구현된 무작위 절편이 있는 혼합 효과 선형 회귀 모델을 사용하여 모델링되었다. 모델과 관련된 P 값은

R의 multcomp 패키지에 구현된 cftest 함수를 사용하여 추정되었다.

- [0218] 각 개인에 대한 HIV 저장소의 붕괴를 분석하기 위해, GraphPad Prism v7.0 소프트웨어를 사용하여 선형 회귀 모델을 사용하여 시간 경과에 따른 10^6 PBMC당 총 HIV DNA의 빈도를 각 개인에 맞게 조정하였다. P 값과 회귀 계수를 계산하였다(그림 2A). 참가자 1-01 및 1-02의 누락된 기준선 값은 모델 적합 절편에 의해 계산되었다.
- [0219] 임상 데이터, CCR5 변형 및 유세포 분석
- [0220] 쌍을 이루는 Wilcoxon 순위-합 양측 검정 은 기준선과 비교하여 CD4+ 총 T 세포 및 하위 집합 수, CD4:CD8 비율, T 세포 기능, 면역 체크포인트 차단제 및 통합된 HIV DNA의 주입 후 변화에 대한 비모수 기증자 쌍 양측 분석을 수행하는 데 사용되었다. 하위 집합 간의 CCR5 유전자 편집 대립 유전자 수준을 비교하고 SB-738-T 제품과 장기 시점 간의 TCR 레퍼토리 및 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 다양성을 비교하기 위해 Wilcoxon 순위 합 양측 검정 이 사용되었다. Mann-Whitney 양측 검정은, 예를 들어, 기준선과 비교하여 주입 후 CD95+ 세포의 빈도, 및 SB-728-0902 연구(Pentamer Duplication 및 CCR5 DNA 시퀀싱)에서 서로 다른 CD4+ 메모리 하위 집합 간의 CCR5 유전자 편집 대립유전자 수준과 같이 일치된 참가자의 수가 시점에 따라 다양하고 주어진 시점에서 6개 미만의 일치된 쌍을 포함하는 경우 쌍을 이루지 않은 비모수적 양측 비교를 수행하는 데 사용되었다. Spearman의 ρ 테스트는 델타 CD4+ T 세포 수(SB-728-0902), 기준선(SB-728-0902)에 대한 마지막 측정 값(2 내지 4년차 시점)의 비율을 사용하여 계산된 저장소 크기의 변화, 및 바이러스 복제(SB-728-1101)를 포함하여 다양한 측정값과 임상 결과 간의 비모수적 상관 관계 분석을 수행하는 데 사용되었다. Benjamini와 Hochberg의 원래 FDR 방법을 사용하여 FDR 값을 계산하여 다중 비교 테스트를 제어하였다. A P 값 < 0.05 및 Q 값 < 0.25 가 유의한 것으로 간주되었다. 이러한 통계 분석은 GraphPad Prism v7.0을 사용하여 수행되었다.
- [0221] SB-728-0902에 SB-728-T 제품 주입 후 총 HIV DNA 붕괴에 대한 통계 분석
- [0222] 비선형 혼합 효과 모델 접근 방식을 사용하여 매개변수를 추정하는 Marc Lavielle이 개발하고 Matlab에서 구현된 통계 소프트웨어 패키지 및 Monolix version 2016R1 (<http://lixoft.com/products/monolix/>)을 사용하여 6명의 참가자에게서 관찰된 주입 후 HIV DNA의 붕괴를 설명하기 위해 통계 분석이 수행되었다. 개별 접근 방식과 인구 접근 방식(6명의 환자 모두를 함께 집계)을 사용하여 방정식, $Y = a + b_1 \exp(-r_1 \text{time}) + b_2 \exp(-r_2 \text{time})$ (Eq.1),을 이용한 이상 지수 감쇠를 추정하였다. Monolix는 MCMC(Monte Carlo Markov Chain) 반복 알고리즘을 사용하여 예상 최대화 알고리즘의 확률적 근사치를 구현하였다. MCMC 반복 방법은 Metropolis-Hastings 접근 방식을 사용하였다. 적합을 수행하기 위해 우리는 2상 붕괴 모델 방정식 각각에 대해 서로 다른 분포를 고려하였다. 두 가지 감쇠율 r_1 및 r_2 는 (0, 1) 사이의 값을 갖는 로짓 정규 분포에 따라 추정되었다. 저속 및 고속 절편 매개변수 b_1 및 b_2 는 고원 매개변수 a 와 함께 양수 값만 취하는 로그 정규 분포를 사용하여 추정되었다. 모델 수렴을 보장하기 위해 시뮬레이션 단계에서 2000개의 Monte Carlo 반복이 사용되었다. Monolix 개별 맞춤의 모양은 동일한 2상 감쇠 함수에 대해 비선형 최소 제곱 추정 방법인 R의 nlslm 패키지를 사용하여 확인되었다.
- [0223] HIV DNA의 빠른 단계와 느린 단계가 각각 지배하기 시작한 시간을 추정하기 위해 다음 방정식을 사용하여 빠른 단계와 느린 단계 각각과 관련된 기울기를 플로팅하였다.
- [0224] $\text{Slope}_{\text{fast}} = (a + b_1 + b_2) \exp(-r_1 \text{time})$ (Eq. 2)
- [0225] $\text{Slope}_{\text{slow}} = (a + b_2) \exp(-r_2 \text{time})$ (Eq. 3)
- [0226] 두 슬로프 사이의 교차점 (Eq. 2&3)은 느린 단계가 빠른 감쇠 단계를 지배하기 시작하는 시간이다. 유사하게, 느린 단계 사이의 교차점 (Eq. 3) 및 고원 선은 느린 붕괴 단계가 끝나고 HIV DNA가 고원에 의해 추정된 새로운 빈도 수준에 도달한 시간을 나타낸다. 6명의 환자 각각에 대한 계산은 MATLAB.2016을 사용하여 수행되었다.
- [0227] 마찬가지로, 전체 HIV DNA 붕괴에 대한 빠른 단계와 느린 단계의 기여도를 추정하기 위해 다음 방정식을 사용하였다.
- [0228] Percent_Fast: $\Phi = b_1 / (Y_0 - \text{고원}) * 0.01$; $Y_0 = a + b_1 + b_2$ ($t=0$ 일에서 HIV DNA 복사)
- [0229] Percent_Slow: $Y = 100 - \Phi$
- [0230] 모델 선정 및 진단
- [0231] 모집단 접근법 결과와 비교하여 개별 접근법이 더 나은 적합도를 보였다. R과 Monolix 각각의 적합도와 개인 대 모집단 적합 결과 간의 차이를 평가하기 위해 Akiake Information Criterion(AIC) 및 Bayesian Information

Criterion(BIC)을 사용하였다. AIC와 BIC가 더 작을수록 가장 간결한 모델을 나타내며 Monolix에서 개별 접근 방식을 사용하여 더 잘 달성할 수 있다.

[0232] CD4+ T 속 ぱ의? 飭* 帝

[0233] CCR5 유전자 편집 메모리 CD4+ T 세포의 지속성을 조사하기 위해 메모리 CD4+ T 세포 집단의 역학을 설명하는 수학적 모델을 개발하였다. 우리는 기억 CD4+ T 세포를 CCR5 유전자 편집된 메모리 CD4+ T 세포와 편집되지 않은 기억 CD4+ T 세포의 두 집단으로 나누었다. 모델은 나이브(N), 스템 메모리 CD45RA^{int}RO^{int} (TSCM2, TSCM2_{GE}), 스템 메모리 CD45RA⁺ (TSCM1, TSCM1_{GE}), 중앙 메모리(CM, CM_{GE}), 전환 메모리(TM, TM_{GE}) 및 이펙터 메모리(EM, EM_{GE}), GE 첨자는 CCR5 유전자 편집 CD4 T 세포를 나타냄,를 고려한다. 이 시스템을 설명하는 미분 방정식은 다음과 같다.

$$\frac{dN}{dt} = \lambda - dN - \varphi N + pN$$

$$\frac{dTSCM1}{dt} = -dTSCM1 - \varphi TSCM1 + pTSCM1$$

$$\frac{dTSCM2}{dt} = -dTSCM2 - \varphi TSCM2 + pTSCM2$$

φ φ φ φ φ φ φ φ φ φ

$$\frac{dCM}{dt} = -dCM - \varphi CM + pCM + \varphi TSCM2 + \varphi TSCM1 + \varphi N$$

$$\frac{dTM}{dt} = -dTM - \varphi TM + pTM + \varphi CM$$

[0234]

$$\frac{dEM}{dt} = -dEM + \varphi TM + pEM$$

[0235]

$$\frac{dTSCM1_{GE}}{dt} = -dTSCM1_{GE} - \varphi TSCM1_{GE} + pTSCM1_{GE}$$

$$\frac{dTSCM2_{GE}}{dt} = -dTSCM2_{GE} - \varphi TSCM2_{GE} + pTSCM2_{GE}$$

φ φ φ φ φ φ φ φ φ φ

$$\frac{dCM_{GE}}{dt} = -dCM_{GE} + \varphi TSCM1_{GE} + pCM_{GE} + \varphi TSCM2_{GE} - \varphi CM_{GE}$$

$$\frac{dTM_{GE}}{dt} = -dTM_{GE} + \varphi CM_{GE} + pTM_{GE} - \varphi TM_{GE}$$

[0236]

$$\frac{dEM_{GE}}{dt} = -dEM_{GE} + \varphi TM_{GE} + pEM_{GE}$$

[0237]

[0238] Monolix R2018에서 개별 피팅 접근 방식 사용하여, ODE 모델에 대해 연장된 ATI 중단 기간(6주차 - 12개월차)을 가지는 5명의 환자에 대해 CCR5-유전자 편집 및 비-유전자 편집 CD4+ T-세포 기억 하위 집합 데이터 수에 적합 하도록 하였다. 표본 크기가 작기 때문에 이전 섹션(SB-728-0902)에 SB-728-T 제품 주입 후 전체 HIV DNA 봉

괴에 대한 통계 분석)에서 설명한 대로 모델 매개변수를 매개변수화하기 위해 개별 피팅 루틴을 채택하였다. 모든 모델 매개변수에 대해 양수 값만 취하는 로그 정규 분포를 가정하였다.

[0239] 背景 顯 微

[0240] 세포 집단 크기에 가장 큰 영향을 미치는 매개변수를 결정하기 위해 LHS(Latin Hypercube Sampling) 및 PRCC(Partial Rank Correlation Coefficients)를 사용하여 모델 매개변수와 모델 출력 간의 라이너 연관성을 측정하는 민감도 분석 테스트를 수행하였다. 이 테스트를 통해 여러 매개변수와 모델 출력 간의 민감도를 동시에 연구할 수 있다. 매개변수 분포의 불확실성이 주어지면 균일 분포를 사용하여 모델 매개변수를 변경하며, 여기서 최대값과 최소값은 각 주제에 대해 얻은 5개의 개별 맞춤에서 가져온다. 모델 매개변수와 출력 사이의 단조성 관계가 확인되었다. 정확성을 보장하기 위해 MATLAB에서 100,000개의 빈을 사용하여 PRCC 값을 얻었다.

[0241] SB-728-0902에서 주입된 세포의 회식으로 인한 HIV DNA 붕괴 추정

[0242] Pentamer Duplication marker에 의한 CCR5 유전자 변형 및 Cel-I 뉴클레아제를 사용한 SB-728-T 제품의 CCR5 유전자 변형의 가정을 통한 측정값을 사용하여 주입된 세포의 양에 의한 회식으로 인한 SB-728-0902 연구 참가자의 주입 후 HIV DNA 붕괴를 추정할 수 있다; 1) 하나의 유전자 편집된 대립유전자는 하나의 유전자 편집된 세포를 나타내고, 2) SB-728-T 제품의 CD4+ T 세포에는 HIV DNA가 있는 세포가 포함되어 있지 않으며, 3) 편집되지 않은 세포는 주입 후 CCR5 유전자 편집된 세포와 유사하게 유지된다(참가자는 ART에 남아 있음).

[0243] PBMC에서 CCR5 유전자 편집 세포의 추정 빈도 = 각 시점에서 10^6 PBMC당 Pentamer Duplication의 빈도 * 4/1000

[0244] PBMC에서 주입된 세포의 예상 빈도 = 각 시점의 PBMC에서 CCR5 유전자 편집된 세포의 빈도 * (100/SB-728-T 제품에서 CCR5 유전자 편집 세포의 빈도, Cel-I 뉴클레아제로 측정)

[0245] 주입된 세포로 인한 HIV DNA의 예상 붕괴 = HIV DNA가 있는 세포의 기준 주파수 * 각 시점의 PBMC에서 주입된 세포의 빈도/100

[0246] 주입된 세포로 인한 HIV DNA의 예상 빈도 = HIV DNA가 있는 세포의 기준 빈도 - 각 시점에 대해 주입된 세포로 인한 HIV DNA의 추정 붕괴

[0247] 이상치

[0248] CCR5 유전자 편집 세포의 생착 및 유전자 편집 세포가 매우 농축된 집단(SB-728-T 제품은 ZFN을 표적으로 하는 CCR5를 인코딩하는 재조합 Ad5/F35 아데노바이러스 벡터를 사용한 형질도입에서 파생됨)의 지속성 수준을 방해하는 항아데노바이러스 역가를 참가자 1-02가 증가시켰고, 그 결과 CCR5 유전자 편집 세포 및 HIV 저장소 붕괴가 있는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 하위 집합의 확장 상관 관계에 초점을 맞춘 선택적 분석에서 제외되었다(예: 그림 1c-d, 그림 2d-e 및 그림 3g-i).

[0249] 결과

[0250] 단일 SB-728-T 주입은 CCR5 유전자 편집 세포의 확장 및 지속성과 상관관계가 있는 HIV 저장소의 크기를 지속적으로 감소시켰다.

[0251] 임상 연구 SB-728-0902는 CD4+ T 세포 수를 500 세포/ μ L 이상의 수준으로 증가시키는 데 실패한 장기간 ART에서 HIV 감염 성인 9명을 평가하였다. 기준선에서 참가자는 7 내지 22년 동안 효과적인 ART를 받았으며 평균 CD4+ T 세포 수가 363 세포/ μ L였다. CD4+ T 세포 수는 기준선 방문($P = 0.017$)에서 통합된 HIV DNA(여기서는 HIV 저장소라고 함)의 수준과 역 상관관계가 있었다. 모든 참가자는 ZFN 매개 CCR5 유전자 편집 CD4+ T 세포의 단일 주입을 받았다.

[0252] 말초 CD4+ T 세포 수(및 CD4:CD8 비율)는 예상대로 주입 후 7일 이내에 증가하였다(온라인 토론 참조; 그림 10A, 10B). 현재하게, 이러한 증가는 지속되었고, CD4+ T 세포 수는 종단 관찰 동안 3 내지 4년 동안 기준선보다 상당히 높게 유지되었다($P = 0.024$)(그림 10A). CCR5 유전자 편집 세포의 확장은 주입 후 7 내지 21일에 최고조에 달했으며(21일에 중앙값 2.4배 확장; 그림 10c) 증가된 CD4+ T 세포 수와 관련이 있었다. PBMC에서 최대 4년(0.8% 표시된 PBMC 및 평균 2.7%로 표시된 CD4+ T 세포) 및 직장 생검 및 림프절에서 최대 12개월(마지막 측정 시점) 동안 CCR5 유전자 편집된 CD4+ T 세포가 검출되었다(그림 10d, 10e).

[0253] 다음으로 우리는 SB-728-T 주입 후 CD4+ T 세포 수의 복원이 HIV DNA를 포함하는 순환 세포의 빈도를 감소시켰

는지 여부를 결정하였다. 우리는 기준선과 비교할 때 주입 후 2년 동안 관찰된 총 HIV DNA 수준의 상당한 감소를 관찰하였다($P = 0.0195$; 평균 감소 $-0.91 \log_{10}$, 95% 신뢰 구간(CI) $-1.71 \sim -0.11$)(그림 2A). 또한, DNA가 통합된 CD4+ T 세포의 빈도에서 상당한 감소(그림 2B)도 주입 후 관찰되었다. 초기(21일) 및 장기 시점(~3 내지 4년)에서 CCR5 유전자 편집 세포 확장의 더 높은 수준은 HIV DNA 수준의 더 큰 지속적인 감소와 상관관계가 있었다($r^2 = 0.62$, $P = 0.0014$ 및 $r^2 = 0.91$, 0.0003 , 각각)(그림 2C 및 2D). 이러한 결과는 주입된 CD4+ T 세포의 지속성이 HIV 저장소 크기의 붕괴에 영향을 미친다는 것을 강력하게 시사한다.

[0254] 흥미롭게도 SB-728-T 제품의 CD4+ T 세포는 기준선의 CD4+ T 세포보다 잠복 감염 세포의 빈도가 현저히 낮았다($P = 0.004$, 그림. 16A). 낮은 수준의 통합 HIV DNA를 가진 주입된 세포의 지속성이 주입된 세포의 피크 증식 동안 회식을 통해 HIV 저장소의 붕괴에 단독으로 기여했는지 여부를 결정하기 위해 2상 붕괴 모델이 사용되었다. HIV DNA 붕괴의 기울기는 주입 첫 1 내지 15일 동안 가장 컸으며 그 동안 평균 30.47%(95% CI, 9.664-51.28) 감소가 관찰되었다. 그 후 HIV DNA 수준은 211일의 반감기로 더 느린 속도로 계속 감소하였다(95% CI; 56-365). 이 느린 붕괴 단계는 HIV DNA 감소의 대부분을 차지하였다(감소의 평균 69.5%)(그림 2E). 회식의 결과로 HIV DNA가 있는 세포의 추정 빈도는 이후에 각 시점에 대해 계산되었다(그림 2F). 우리는 HIV DNA가 있는 세포의 관찰된 빈도가 약 100일 후에 회식 단독으로 추정된 것보다 더 낮아졌다는 것을 발견했으며, 이는 회식만으로는 HIV 감염 세포의 빈도의 장기간 감소를 설명할 수 없음을 입증하였다. 우리의 분석은 주입된 세포의 지속성이 회복된 T 세포 항상성 및/또는 감염되지 않은 세포에 의한 CD4+ T 세포 풀의 보충을 포함할 수 있는 메커니즘을 통해 HIV 붕괴로 이어진다는 것을 시사한다.

[0255] 새로운 기억 줄기 세포 유사 CD4+ T 세포 하위 집합은 T 세포 항상성의 회복에 기여하고 저장소 붕괴와 상관 관계가 있다.

[0256] CD4+ T 세포의 재구성으로 이어지는 메커니즘을 조사하기 위해 주입 후 CD4+ T 세포 하위 집합의 분포에 대한 종단 분석을 수행하였다. 우리의 연구는 중간 수준의 CD45RA^{int}RO^{int} 및 CD45RO를 발현하는 T 세포의 특정 증가를 보여 주었다("CD45RA^{int}RO^{int}"이라고 함)(그림 3A). CD45RA^{int}RO^{int} 세포는 SB-728-T 제품에 존재했으며 CCR5 유전자 편집 대립유전자가 매우 농축되었고 주입 후 분석의 모든 시점에서 절대 숫자가 크게 증가하였다. 중요하게도, 주입 후 CD45RA^{int}RO^{int} 세포 수의 변화는 CD4+ T 세포 수의 장기간 증가와 유의한 상관관계가 있는 다른 기억 하위 집합의 변화가 아니다(표 1). CD95+CD58+ 세포의 빈도(CD45RA^{int}RO^{int} 및 CD45RA⁺RO⁻ 하위 집단에서 T_{SCM}로 표현된 마커)는 CCR5 유전자 편집 세포의 확장과 긍정적인 상관관계였다. Pentamer Duplication marker(CCR5 유전자 편집 세포의 서열 태그) 수준은 3 내지 4년차의 중앙 기억(T_{CM}) 또는 이행 기억(T_{EM}); 각각 (그림. 3B) 세포와 비교하여 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}에서 약 14배 및 21배 더 높은 수준을 가진 CD45RA^{int}RO^{int} CD95+ 세포(CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}라고 함) 및 CD45RA⁺RO⁻ CD95+ 세포(CD45RA⁺ T_{SCM}라고 함)에서 특별히 농축되었다. 유전자 편집 기반 CCR5 DNA 돌연변이의 시퀀싱은 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} (범위 T_{CM}에서 2.5% 내지 16.7%, T_{EM}에서 1% 내지 16.7% 및 T_{EM}에서 0.7% 내지 2.59%와 비교하여 범위 14.4% 내지 37.7%)에서 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 장기간 농축을 확인하였다. 참고로, 이러한 돌연변이의 다양성은 SB-728-T 제품과 3 내지 4년차 시점 샘플 사이에 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}에서 다양하지 않았고 이것은 이들 세포는 CCR5 유전자 편집 세포의 장기간 다클론 지속성에 기여하는 수명이 긴 기억 하위 집합을 나타낼 가능성이 가장 높다는 것을 보여준다. 더욱이, 3 내지 4년차 시점의 CD45RA^{int}RO^{int} CD95- 또는 CD45RA⁺ T_{SCM} 세포는 아니지만 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}의 지속성은 증가된 총 CD4+ T 세포 수와 상당한 관련이 있었다(표 1). 종합하면, 이러한 결과는 SB-728-T의 주입이 CCR5 유전자 돌연변이의 장기간 지속 및 CD4+ T 세포의 재구성과 관련된 새로운 T_{SCM} 유사 하위 집합을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0257] 표 1 - 초기(14일차), 중반(4 내지 7월), 후기(11 내지 12월) 및 장기 시점(3 내지 4년)에서 동일한 시점에서 면역 재구성(델타 CD4+ 수)과 함께 순환 CD4+ T 세포 하위 집합(델타 세포 수)의 증가와의 상관관계

		Shearman의 로 p	P 값	q 값(FDR)	n
델타 CD4+ 수(세포/ μ L) 일 14 내지 28	델타 TCM(세포/ μ L) d14 내지 28	0.9429	0.0167	0.0417	6
	델타 TTM(세포/ μ L) d14-28	1	0.0028	0.0139	6
델타 CD4+ 수(세포/ μ L) 4 내지 7 개월	델타 TCM(세포/ μ L) m4 내지 7	0.8333	0.0154	0.0769	8
	델타 TTM(세포/ μ L) m4 내지 7	0.7619	0.0368	0.0867	8
델타 CD4+ 수(세포/ μ L) 11 내지 12개월	델타 TCM(세포/ μ L) m11 내지 12	0.9	0.0255	0.0101	9
	델타 TTM(세포/ μ L) m11 내지 12	0.75	0.0255	0.0319	9
	델타 총 CD45RAintROint(세포/ μ L) m11 내지 12	0.8667	0.0045	0.0113	9
델타 CD4+ 수(세포/ μ L) 3 내지 4 년	델타 총 CD45RAintROint(세포/ μ L) yr3 내지 4	0.8870	0.0014	0.0143	9
	델타 CD45RAintROint TSCM(세포/ μ L) yr3-4	0.8857	0.0333	0.1417	6
	델타 RAintROint CD95-	0.1429	0.8028		6
	델타 RA+RO- CD95+	0.7143	0.1361		6
	델타 RA+RO- CD95-	-0.2000	-0.2000		6

[0258]

[0259]

TCM 세포는 CD45RA-, CD45RO+, CCR97+, 및 CD27+으로 정의된다. T_{TM}세포는 CD45RA-, CD45RO+, CCR79-, 및 CD27+으로 정의된다.

[0260]

CD45RAintROint TSCM 는 CD45RAint, CD495ROint, CCR7+, CD27+, CD127+, CD28+, CD58+으로 정의되고, CD95 결과는 $P < 0.05$ 및 FDR(False Discover Rate) < 0.25 와의 유의한 상관 관계에 대해서만 표시된다.

[0261]

주입 후 3 내지 4년차에 T_{EM}과 같은 단기 기억 세포에서 CCR5 유전자 돌연변이의 존재(그림 3B)는 T_{SCM} 및 T_{CM}과 같은 장수명 메모리 세포 내의 CCR5 유전자 편집 세포는 T_{EM}으로 분화하여 주입 후 최대 3 내지 4년차까지 CCR5 유전자 편집 T_{EM} 세포의 작은 부분집합을 유지하는 것을 시사한다. HIV 저장소의 붕괴에 대한 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}의 역할을 조사하기 위해, 우리는 먼저 SB-728-T 제품과 CD4+ T 세포 하위 집합의 3 내지 4년차 샘플에서 통합된 HIV DNA의 수준을 정량화하였고, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포는 다른 기억 하위 집합에 비해 통합 HIV DNA 수준이 상당히 낮았다(1.99 log10, 95% CI: 3 내지 4년차 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}에서 1.64 내지 2.34 vs. 2.8 log10, 95% CI: 2.48 내지 3.13 in T_{CM} $P = 0.016$, 2.79 log10 95% CI: 2.31 내지 3.28 in T_{TM} $P = 0.016$, 2.87 log10 95% CI: 2.28 내지 3.45 in T_{EM} $P = 0.023$)는 것을 발견했다. 더욱이, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포의 5.3%만이 3 내지 4년차 샘플에서 CD4+ T 세포 HIV 저장소에 기여한 반면, (Fig. 3c) 다른 기억 하위 집합은 HIV tot DNA가 있는 세포 풀에 상당히 더 높은 빈도의 세포를 기여하였다[45.5% for T_{CM} ($P = 0.0078$), 16.5% for T_{TM} ($P = 0.0156$), 및 29.6% for T_{EM} ($P = 0.0156$)].

[0262]

다른 기억 하위 집합에 통합된 HIV DNA 수준이 낮은 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포의 분화는 전체 CD4+ T 세포에서 HIV 저장소의 붕괴의 기본 메커니즘을 제공할 수 있다. 이의 조사를 위해서, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포 수를 포함하는 주입 후 총 HIV DNA를 보유하는 PBMC의 복제 빈도, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 셀의 Pentamer 복제 빈도 및 가능한 독립 변수로서 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 및 T_{EM} 간의 공유 돌연변이 수의 변화를 예측하기 위해 최소 선형 다변수 모델이 구축되었다. 우리의 분석은 주입 후 HIV 저장소의 더 큰 붕괴가 더 높은 3 내지 4년차 ($P = 0.0018$) CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포 수, 더 높은 3 내지 4년차 ($P = 0.005$) CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} Pentamer 복제 빈도, 및 3 내지 4년차 ($P = 0.0014$) (조정된 $R^2 = 0.99$, F-test: $P = 0.0008$; Fig. 3D) T_{EM} Pentamer 복제 빈도 대비 3 내지 4년차 ($P = 0.005$) CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} Pentamer 복제 빈도의 더 낮은 비율로 가장 잘 예측되었음을 나타낸다.

이러한 결과는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포 수의 장기 지속성 및 T_{EM} 집단 내에서 CCR5 유전자 편집 세포의 하위 집합 유지는 HIV 저장소 감소에 중요하다는 것을 증명하며, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포는 감염에 저항할 수 있는 CCR5 유전자 편집 대립유전자를 보유하는 세포의 검출 가능한 비율로 더 분화된 기억 세포 풀로 분화하고 보충할 수 있다는 것을 제안한다.

[0263] $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 은 정지 및 자가 재생과 관련된 유전자를 발현하며 다른 기억 하위 집합으로 분화할 수 있다.

[0264] $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 의 지속성과 장기 $CD4^+$ T 세포 재구성에 미치는 영향을 보여주는 우리의 결과는 이 세포들이 장기간 지속성을 부여하는 유전자와 경로를 발현한다고 제안하였다. 분류된 $CD4^+$ T 세포 서브세트의 전사 분석을 주입 후 3 내지 4년차의 샘플에 대해 수행하였다. 유전자 발현 변이의 다차원적 스케일링은 $CD45RA^+T_{SCM}$ 보다 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 및 T_{CM} 및 T_{EM} 사이에서 더 큰 차이를 보였다. 또한, 더 많은 수의 차등 발현 유전자(DEG)가 T_{CM} 및 $CD45RA^+T_{SCM}$ (5022 vs. 2943, vs. 2136) 보다 T_{EM} 에 $CD45RA^+T_{SCM}$ 를 비교할 때 발견되었다.

유전자 세트 농축 분석(GSEA)은 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포가 줄기세포(미분화 HSC의 Wnt 매개 유지 관리에 필요한 Notch 신호 경로와 같은)와 관련된 유전자 및 지방산 산화, 산화적 인산화 및 피루브산 대사와 같은 세포 지속성에 기여하는 대사 경로에 농축되어 있었다는 것을 보여주었다. 아포토시스, 이펙터 기능, 세포 주기 및 JAK-STAT 신호 전달과 관련된 유전자는 T_{CM} 및 T_{EM} 과 비교할 때 하향 조절되었으며(그림 4A), $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포가 다른 메모리 하위 집합보다 더 조용함을 시사한다.

[0265] $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 의 용량을 평가하여 다른 메모리 하위 집합으로 구분하기 위해, 우리는 분류된 $CD4^+$ T 세포 하위 집합에서 CCR5 ZFN 매개 돌연변이를 시퀀싱하였고 SB-728-T 제품 ($n = 3,881$)에서 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포에 고유한 시퀀스를 식별하였다. 다양한 $CD4^+$ T 세포 기억 하위 집합에서 주입 후 3 내지 4년 후 이러한 서열의 분포 분석(그림 4B)은 단기 T_{EM} (0.49%(95% CI: 0% 내지 1.36%))을 포함한 모든 기억 T 세포 하위 집합에서 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 고유 돌연변이가 감지된 것을 보여주었다. 이러한 결과는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포가 더 분화된 기억 세포 풀로 분화하고 보충할 수 있음을 보여준다. 다른 메모리 하위 집합과 비교하여 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 의 차별화 상태를 추가로 특성화하기 위해, 우리는 항 $CD3/28$ 코팅된 비드(그림 4c), SEB 또는 PMA/Ionomycin으로 자극한 후 유동 세포 계측법으로 다작용성 반응을 조사하였다. 우리의 분석은 $CD4^+$ $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포를 T_{CM} , T_{TM} , 및 T_{EM} 보다 덜 분화된 것으로 배치하였다. $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포의 미분화 상태는 Th1(T-bet 및 Eomes), Th2(GATA-3) 및 Th17(RORgt) 계통 투입과 관련된 전사 인자의 발현 수준 분석으로 확인되었다. naïve와 유사한 세포나 $CD45RA^+T_{SCM}$, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포는 Th 특이적 전사 인자를 발현하지 않았다(그림 3d). 면역 체크포인트 마커의 추가 분석은 $CD45RA^{int}RO^{int}CD95^+$ 세포가 T_{TM} 및 T_{EM} 보다 PD-1, TIGIT, 및 SLAMF7의 현저하게 낮은 수준을 가진다는 것을 보여주었고, $CD45RA^{int}RO^{int}CD95^+$ 세포가 다른 메모리 하위 집합보다 덜 소모됨을 시사하였다(그림 28B). 종합하면, 이러한 결과는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 가 수명과 다분화능을 포함하는 줄기 세포 특성을 나타내고 T_{CM} , T_{EM} 및 T_{EM} 메모리 세포보다 더 차별화된 전구체라는 것을 보여준다.

[0266] 다음으로 우리는 유전자 발현의 차이 및 특히 Wnt-signaling cascade(그림 4F)를 포함한 자가 재생에 관여하는 경로 - T 세포의 "줄기 유사" 표현형 유지와 관련된 경로를 조사하기 위해서 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 및 $CD45RA^+T_{SCM}$ 세포의 전사체를 비교하였다. 유전자 발현 변이의 다차원적 스케일링은 이전에 특성화된 $CD45RA^+CD95^+$ T 기억 줄기 세포(T_{SCM})가 이 연구(그림 4E)에서 설명된 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 집단과 전사적으로 구별되었다는 것을 보여주었다. 이러한 유전자 집합의 결합된 집단 유전자를 자세히 살펴보면 줄기를 유지하는 데 중요한 여러 유전자의

발현이 상향 조절되는 것으로 나타났다. 여기에는 Wnt 인자와 그 수용체(Frizzled - FZD)가 포함되며, 위에서 설명한 바와 같이 줄기 유지 캐스케이드를 시작하는 것으로 알려져 있다(그림 4G). 이것은 DVL, 베타-카테닌 및 TCF7(이펙터 T 세포 분화를 방지하는 것으로 알려진 유전자)을 포함하는 다운스트림 신호 전달 캐스케이드와 결합되었다. SOX 유전자의 상향 조절에 의해 정의된 줄기의 추가 다운스트림 메커니즘도 관찰되었다(그림 4g). 흥미롭게도, $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 는 그들의 $CD45RA^{+}T_{SCM}$ 대응물과 비교할 때 전염증성(MAPK, Jun, NFAT) 및 세포자멸사(PSM) 유전자 세트가 농축되었다(그림 4G). 이 하위 집합에서 염증 유발 신호의 향상은 세포와 같은 "이펙터"로 분화하는 능력의 증가를 가리킬 수 있다. 흥미롭게도, Wnt 신호 전달 캐스케이드와 관련된 결합된 침단 유전자는 $CD4^{+}T$ 세포 수의 장기간 증가와 양의 상관관계가 있었고 주입 후 HIV 저장소의 감소와 음의 상관관계가 있었다.

[0267] 모두 함께, 이러한 결과는 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 표현형의 세포가 수명이 길고 미분화된 기억 세포의 특징을 갖는 새롭고 독특한 T_{SCM} 하위 집합을 구성한다는 것을 확인시켜준다.

[0268] CCR5 유전자 편집 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 의 빈도는 SB-728-T 주입 후 6주에 치료 중단을 겪은 참가자의 바이러스 부하 조절과 상관관계가 있다.

[0269] 다음으로 ART 치료 중단 시 바이러스혈증 조절의 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 를 포함하여 CCR5 유전자 편집 $CD4^{+}T$ 세포 주입의 영향을 평가하였다. 우리는 독립적인 임상 시험의 샘플(SB-728-1101 연구, $n = 15$, 5개 집단, 자료 및 방법 참조)을 분석하였고, 여기서 참가자는 SB-728-T 제품 주입 후 6주에 분석 치료 중단(ATI: analytical treatment interruption)을 받았다. 바이러스 부하 수준의 분석은 ATI 동안(22주차) 역사적인 pre-ART 바이러스 부하 설정점($P = 0.0067$)보다 훨씬 더 낮은 바이러스 부하를 보여주었으며(그림 5A), SB-728-T 제품의 주입은 대부분의 참가자에서 일시적이지만 불완전한 바이러스 혈증 조절을 유발할 수 있음을 나타내었다. 22주차에 10,000복제/mL 미만의 바이러스 부하 측정 및 500세포/ μL 이상의 $CD4^{+}T$ 세포 수를 나타낸 6명의 개인에서 ATI가 확장되었으며 ATI에 0.5 내지 2년을 보냈다. 그 시점에서 ATI에 남아 있던 5명의 참가자에 대한 12개월째의 바이러스 부하는 130에서 16,000복제/mL 범위였다. 이 개인 중 한 명(01-060)은 보호 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 가지고 있었다; HLA-B57.

[0270] 흥미롭게도, 역사적인 pre-ART 바이러스 로드 설정점과 비교하여 22주 바이러스 로드의 더 큰 감소는 피크 세포 확장에서 $CD4^{+}T$ 세포 수의 더 큰 변화(그림 5B) 및 ATI(6주차) 이전에 CCR5 유전자 편집된 대립유전자의 더 높은 빈도와 유의하게 상관관계가 있었다(그림 5C). 이러한 결과는 SB-728-T 주입 시 CCR5 유전자 편집 세포의 확장과 바이러스 부하 조절 간의 연관성을 강조하며, 1101 시험(그림 5d, e)에서 CCR5 유전자 돌연변이가 농축된 것으로 나타난 T_{SCM} 하위 집합이 ATI 후 바이러스 부하 감소에 대한 역할을 제안한다. 바이러스 부하 조절과 $CD4^{+}T$ 세포 하위 집합 수 간의 상관 관계 분석은 ATI 이전(6주차) 오직 더 높은 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 및 $CD45RA^{+}RO^{-}T_{SCM}$ 세포 수(특히 CCR5 유전자 편집 T_{SCM} 세포 수)가 과거 바이러스 부하 설정점과 비교하여 22주차 바이러스 부하의 더 큰 감소와 상관관계가 있었다(그림 5F, G)는 것을 보여주었다.

[0271] 우리는 다음으로 이전에 ATI 이후 바이러스 복제(REFS) 제어에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났던 HIV 특이적 $CD8^{+}T$ 세포의 기능적 반응을 조사하였고 ATI 이후의 HIV 특이적 $CD8^{+}T$ 세포 하위 집합 및 ATI(6주차) 이전의 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 숫자로부터 사이토카인 ($IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-2) 생산의 피크 빈도를 사용하여 과거의 ART 이전 바이러스 부하 설정값과 비교하여 22주차에 바이러스 부하의 변화를 예측하기 위해 다변량 회귀 모델을 구축하였다. 우리의 분석은 역사적 사전 ART 설정점에 비해 22주차에 바이러스 부하 감소가 IL-2 생성 생산하는 $CD8^{+}T_{TM}$ 세포의 피크 주파수와 함께 ATI 이전의 더 높은 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포수로 가장 잘 예측된다는 것을 바이러스 부하 변화의 95%를 설명하면서 보여주었다(그림 5H). 이러한 결과는 HIV 저장소의 붕괴가 $CD45RA^{int}RO^{int}T_{SCM}$ 세포 ($p = 0.05$)의 확장 및 IL-2($P = 0.02$)를 생산하는 $CD8^{+}T_{TM}$ 세포와 유의미하고 부정적으로 관련이 있다는 것을 증명해준다.

[0272] CCR5 유전자 편집 T_{EM} 의 빈도는 SB-728-T 주입 후 6주에 치료 중단을 겪은 참가자의 바이러스 부하 조절과 상관

관계가 있다.

[0273] CCR5 유전자 편집 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포는 ATI 동안 다른 기억 하위 집합으로의 분화를 통해 바이러스 부하 조절에 기여한다는 가설을 테스트하기 위해, 우리는 먼저 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 제품에 고유한 CCR5 돌연변이를 식별하고 주입 후 및 ATI 후 다른 기억 세포에서 지속성을 추적하였다. 우리의 결과는 CCR5 유전자 편집 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포의 분화 가능성을 강조하면서, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 제품에 고유한 CCR5 돌연변이가 6주와 22주에 모든 CD4+ 메모리 하위 집합에서 감지되었음을 보여준다(추가 주파수 번호, 그림 6A).

[0274] 장기간 바이러스 복제가 CCR5 유전자 편집 CD4+ T 세포 기억 하위 집합의 지속성 및 분화 능력에 미치는 영향을 조사하기 위해, 우리는 다음으로 상미분 방정식 모델을 사용하여 ATI가 12개월 또는 그 이후까지 연장된 5명의 개인에서 바이러스 혈증(6주에서 12개월) 동안 CCR5 유전자 편집 및 편집되지 않은 CD4+ T 세포 하위 집합의 항상성을 모델링했다. Monolix에서 개별 피팅 루틴을 사용하여 죽음(g), 증식(r) 및 전환(j) 비율(세포/일)은 각 CCR5 유전자 편집 및 편집되지 않은 CD4+ T 세포 하위 집합에 대해 획득되었다. 우리는 CCR5 유전자 편집 CD45RA⁺ T_{SCM}, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 및 T_{CM} 메모리 CD4+ T-세포의 사망률은 편집되지 않은 대조군의 사망률에 비해 평균 3등급 낮다는 것을 관찰하였다(그림 6B). 또한 CCR5 유전자의 사망률은 CD45RA⁺ T_{SCM}, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 및 T_{CM} 메모리 CD4+ T 세포는 전환 속도보다 낮았다(그림 6B). 또한, 매개변수와 세포 수 간의 관계를 식별하기 위해 Matlab에서 민감도 분석 테스트를 사용하여, 우리는 전환의 모델 매개변수는 CCR5 유전자 편집 CD45RA⁺ T_{SCM}, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}, 및 ATI 주입 후 T_{CM} 세포 수와 유의한 음의 상관관계를 가졌다는 것을 관찰하였다(Fig. 6B). 종합하면, 이러한 결과는 CCR5 돌연변이의 존재가 CD4+ 초기 기억 하위 집합에 보호 효과가 있고 시간이 지남에 따라 이러한 세포의 손실이 세포 사멸보다 이러한 세포의 분화로 인한 것일 가능성이 훨씬 더 높다는 것을 시사한다. 게다가, 민감도 분석은 또한 CCR5 유전자 편집 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}의 증식 속도는 다른 하위 집합의 증식 속도에 대해서는 관찰되지 않았던 T_{EM} 포함하여 모든 CCR5 유전자 편집 세포의 세포 수와 유의한 양의 상관관계가 있었다는 것을 보여주었다(Fig. 6B). 이것은 CCR5 유전자 편집 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM}의 자가 재생이 다른 기억 하위 집합에서 CCR5 돌연변이의 보충 및 유지에 중요함을 시사한다.

[0275] 이러한 발견을 뒷받침하기 위해, 바이러스혈증이 T_{SCM}의 T_{EM} 세포로의 점진적 분화를 유발할 수 있음을 확인하면서, 더 높은 CCR5 유전자 편집 CD45RA⁺RO⁻ T_{SCM}, CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 및 ART 중단(6주차) 전 T_{CM} 세포 수는 ATI(22주차) 후 더 많은 수의 CCR5 유전자 편집 T_{EM} 세포와 관련이 있었다(그림 6C-E).

[0276] T_{EM} 세포는 다른 메모리 세포에 비해 가장 높은 수준의 CCR5를 발현하는 것으로 나타났기 때문에, 바이러스 복제 동안 T_{EM} 하위 집합 내에서 CCR5 유전자 편집된 세포의 하위 집합을 유지하면 *de novo* 감염으로부터 보호할 수 있다. 이를 조사하기 위해 우리는 기준선 및 주입 후 6주 및 22주에 분류된 CD4+ T 세포 하위 집합에서 HIV 저장소의 크기(통합 HIV DNA 수준으로 추정)를 측정하였다. 우리의 결과는 통합된 HIV DNA를 포함하는 T_{EM}의 빈도가 ATI 동안 크게 변하지 않았음을 나타낸다(그림 6F). 자세히 조사한 결과 분석된 참가자의 50%가 6주에서 22주 사이에 T_{EM} 세포의 저장소 크기가 증가했으며 나머지 절반은 통합 HIV DNA의 빈도에 변화가 없거나 감소한 것으로 나타났다. 중요하게도, ATI 동안 T_{EM} 세포 내 통합된 HIV DNA를 보유하는 세포의 빈도 변화는 T_{EM} 집합에서 CCR5 유전자 편집 대립유전자의 빈도와 반비례한다(그림 6G). 우리는 또한 T_{EM} 하위 집합에서 22주차에 CCR5 유전자 편집된 대립유전자의 더 높은 빈도(다른 하위 집합에서는 아님)는 역사적 pre-ART 바이러스 부하 설정점과 비교하여 22주 바이러스 부하의 더 큰 감소와 관련이 있었다는 것을 발견하였다. 종합적으로, 이러한 결과는 CCR5 유전자 편집 T_{EM} 세포의 전구체로부터 분화의 결과로 지속적인 보충은 바이러스혈증 동안 T_{EM}의 저장소 크기를 제한하고 T_{EM} 하위 집합의 *de novo* 감염에 대한 더 큰 보호는 ATI 동안 활성 바이러스 복제의 제어에 영향을 미친다는 것을 보여준다.

[0277] 이 연구의 관찰은 새로운 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 하위 집합은 최고 수준의 CCR5 유전자 편집 대립 유전자를 가지며

다른 기억 하위 집합으로 분화할 수 있다는 것을 입증하는 SB-728-0902 집단으로부터 생성된 우리의 발견을 더욱 입증한다. CCR5 돌연변이를 발현하는 단기 T_{EM} 을 포함한 분화된 기억 T 세포는 바이러스 감염으로부터 보호됩니다; 이것은 두 연구에서 관찰된 바와 같이 바이러스 혈증의 조절과 HIV 저장소의 점진적인 붕괴로 이어진다.

[0278] CD45RA+ T_{SCM} 하위 집합은 기존 메모리 T 세포의 특성, 향상된 자가 재생 및 다른 메모리 하위 집합의 분화 능력과 함께 이전에 설명되었다. A CD45RA+CD45RO+CCR7+CD27+CD95+ T_{SCM} 유사 표현형은 이전에 IL-2, IL-7, IL-15 또는 IL-21과 같은 사이토카인의 존재 하에 공동 자극되었던 정제된 CD4+ 및 CD8+ 나이브 T 세포의 생체내 확장 후에 보고되었다; 그러나 이러한 세포가 생체내 지속할 가능성과 이들 세포의 일부가 CD45RA+CD45RO- 표현형으로 되돌아갈 수 있는지 여부는 조사되지 않았다. 게다가, 낮은 수준의 CD45RA 및 CD45RO를 발현하는 CD4+ 하위 집합은 CD4+ T 세포 증가와 관련된 IL-2 요법과 결합된 ART 시작 시 생체내에서 나타나는 것으로 나타났으며, CD45RA^{int}RO^{int} 세포는 항상성 증식에 대한 반응으로 생체내에서 생성될 수도 있다는 것을 입증하였다. 우리가 이 연구에서 식별한 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 하위 집합은 또한 Wnt 신호 캐스케이드의 유전자 세트 농축에 의해 관찰된 바와 같이 자가 재생 능력을 입증하였다. 우리는 또한 줄기세포(SOX 유전자) 뿐만 아니라 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 하위 집합에 고유한 전염증성 및 세포자멸사 서명의 향상 CD45RA+ T_{SCM} 하위 집합은 이러한 T_{SCM} 모집단의 차이를 더욱 강조하는 추가 메커니즘의 상향 조절을 추가로 관찰하였다.

[0279] T_{SCM} 은 이전에 HIV 감염을 허용하는 것으로 나타났다. CD4+ T 세포 항상성의 보존을 위해 초기 기억 세포에서 HIV 감염을 제한하는 것의 중요성은 인간이 아닌 영장류와 바이러스에 감염되지 않은 HIV에 감염된 개인에게서 나타났다. 이차 림프 조직 내 T_{SCM} 세포(CCR5 유전자 편집 대립유전자가 농축됨(3 내지 4년차에 말초에서 최대 40%))의 존재 - 여기서 HIV 복제는 완전히 억제되는 않더라도 부분적으로는 장기 생존으로 이어질 수 있다. 이것은 차례로 적응 면역 기능의 전반적인 개선, CD4+ T 세포 수의 증가, HIV 및 기타 병원체의 제어, 결과적으로 현재 연구에서 보여준 바와 같이 저장소 크기의 감소로 이어질 것이다. 실제로, 우리는 3-4년차에 T_{TM} 및 T_{EM} 과 같은 수명이 짧은 세포에서 SB-728-T 제품의 T_{SCM} 하위 집합에 고유한 CCR5 유전자 편집 세포를 검출하여 T_{SCM} 의 T_{EM} 으로의 분화 가능성을 확인하였다. 또한, 이러한 관찰은 사망률 감소를 관찰한 CCR5 유전자 편집 CD4+ T 세포 기억 하위 집합의 항상성 모델링을 지원한다. 또한, HIV DNA의 2상 붕괴 분석은 회석이 HIV 붕괴의 원인일 가능성을 배제하였다. 그러나, 우리의 다변수 모델은 CCR5 유전자 편집 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 의 장기 지속성이 주입 후 HIV 저장소의 붕괴에 기여한다는 것을 입증하였다.

[0280] 중심 가설은 HIV 감염으로부터 T 세포의 작은 부분 집합에 대한 보호를 제공하는 것이 전 세계적인 이점을 제공하고 바이러스 복제의 제어를 허용한다는 것이었다. 이를 뒷받침하기 위해, SB-728-0902 및 SB-728-1101 연구 모두의 결과는 T 세포 항상성의 회복 및 T_{SCM} 을 HIV 감염으로부터 보호되는 T_{EM} 으로 분화시킬 수 있는 HIV 특이적 CD8 T 세포에 대한 동족의 도움에서 SB-728-T 주입의 역할을 확인한다. 제공된 동족 도움은 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 세포 및 GAG-특이적 CD8+ T_{TM} IL-2 생성 세포의 확장 모두와 음의 상관관계가 있는 HIV 저장소의 관찰된 붕괴에 의해 더욱 강조된다. 바이러스 복제에 대한 HIV-특이적 CD8+ T 세포에 의한 IL-2 생산의 역할은 이전에 밝혀졌다.

[0281] 우리는 우리의 결과가 주입된 제품 내에서 편집된 CCR5 유전자와 유전자 비변형된 T_{SCM} 세포 모두의 생체의 확장으로 인한 것일 수 있으며 이러한 세포가 ART에 의해 생체내 보호된다는 것을 인식하였다. 이 가설을 뒷받침하기 위해 우리는 주입 후 CCR5 변형된 세포와 변형되지 않은 세포 모두의 명확한 확장을 관찰하였다. 흥미롭게도 우리 모델은 CD45RA^{int}RO^{int} T_{SCM} 가 모든 CCR5 유전자 편집 세포의 세포 수와 양의 상관관계가 있었다는 것을 보여준다. 그러나 주목해야 할 것은 이전 연구에서 입양 전달된 항-CD3/CD28 공동 자극된 CCR5 비변형 세포는 HIV+ 참가자의 CD4+ T 세포 수의 지속적인 증가를 초래하지 못하였다. 우리는 현재 이 질문을 보다 확실하게 해결하기 위해 CCR5 변형 세포와 변형되지 않은 세포를 주입할 수 있는 무작위 임상 시험을 수행하고 있다.

[0282] 여기에 설명된 결과는 CCR5 유전자 편집 세포의 단일 주입이 안전하고 잘 견디며 HIV DNA 수준(및 아마도 복제

유능한 HIV 저장소)의 상당한 감소로 이어질 수 있음을 보여준다. 또한, 유전자 편집된 기억 줄기 세포의 장기 간 지속은 기능 장애/감염된 오래된 기억 세포를 감염으로부터 보호되어 면역 체계를 다시 채우는 새로운 세포로 대체하도록 한다. 이 치료법의 비침습적이고 자가조직적인 측면은 조혈모세포 이식보다 접근이 용이하고 번거롭지 않다. 전기천공법을 통한 징크 핑거 뉴클레아제 mRNA 전달의 발전은 다중 용량 요법을 가능하게 하여 CD4+ T 세포 수를 크게 향상시킬 것으로 예상된다. 이에 따라, 8주마다 비변형된 항-CD3/CD28 공동 자극된 비변형 CD4+ T 세포의 다중 주입은 이전에 주입 후 1년에 세포 수의 상당한 증가를 초래하였다. 게다가, CD4+ T 세포 수가 더 많은 HIV+ 대상의 제품은 CD4+ T 세포 수가 적은 제품에 비해 생체내에서 더 잘 확장되는 것으로 나타났던 것처럼, 또한 각 주입 후 CD4+ T 세포 수가 증가함에 따라 이후에 생성된 생성물도 더 큰 생착 및 지속성을 제공할 것으로 예상된다. 또한, HIV DNA의 통계적 분석 결과는 주입 6주에 의해 저장소의 부분적 감소를 보여주었으며, 이는 붕괴의 두 번째 단계에 따라 장기간 치료가 중단되었을 경우 바이러스 부하 조절의 최적 달성이 발생할 수 있음을 시사하였다.

[0283] 요약하면, 우리의 결과는 CCR5 유전자 편집 세포의 주입이 T 세포 항상성을 개선하고 전체 HIV 저장소를 감소시키는 독특한 치료 개입을 제공함을 나타낸다. 이론적으로 이 접근 방식을 다른 개입과 결합하면 결과가 더욱 향상될 수 있다.

[0284] 본 발명은 그의 바람직한 실시예를 참조하여 특히 도시되고 설명되었지만, 첨부된 특허청구범위에 포함된 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 전술한 명세서에 인용된 모든 특허, 간행물 및 참고문헌은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

도면

도면1

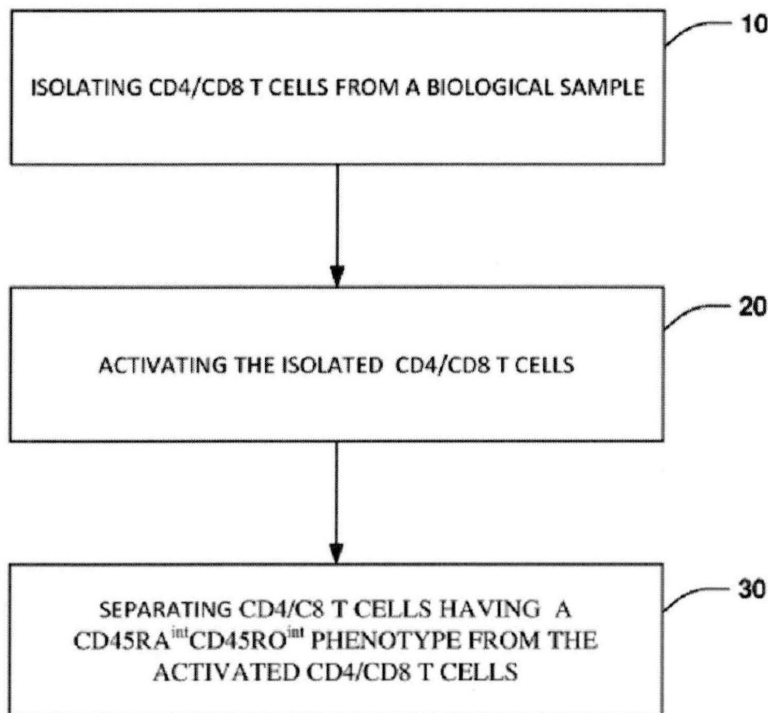
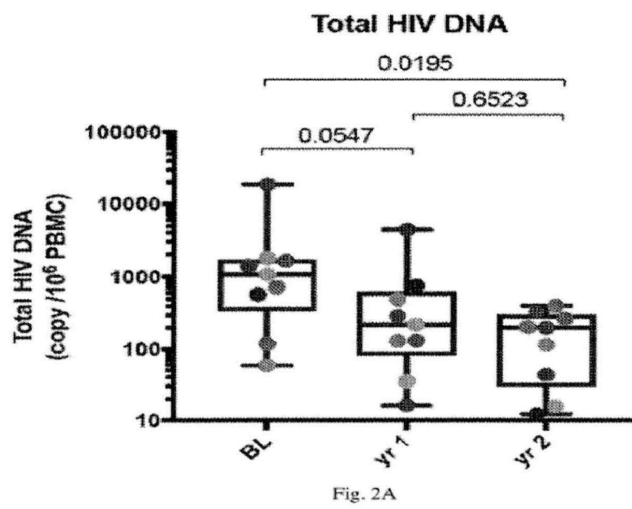
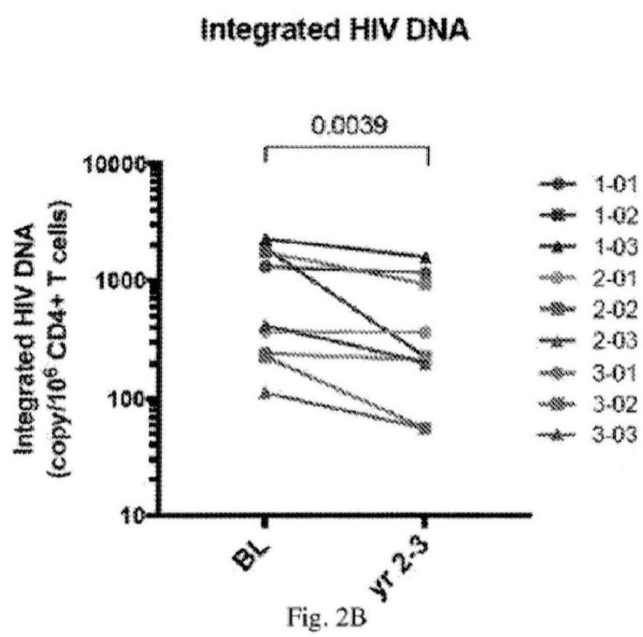


Fig. 1

도면2a



도면2b



도면2c

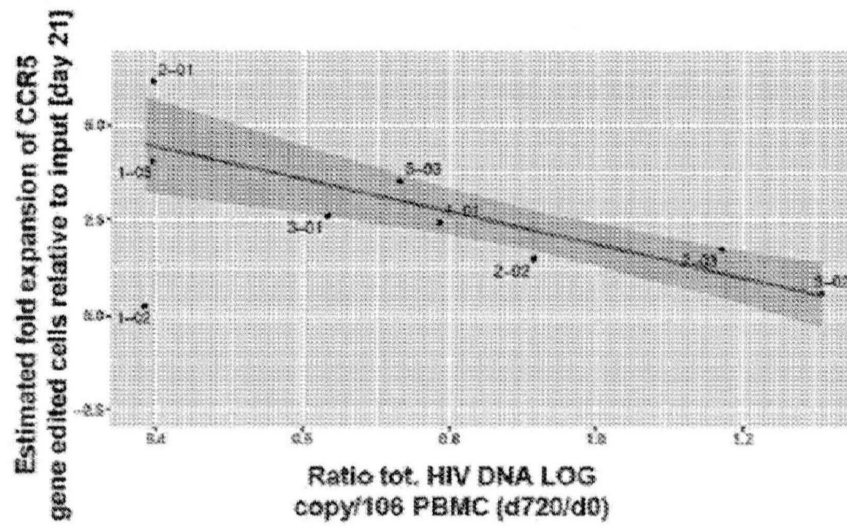


Fig. 2C

도면2d

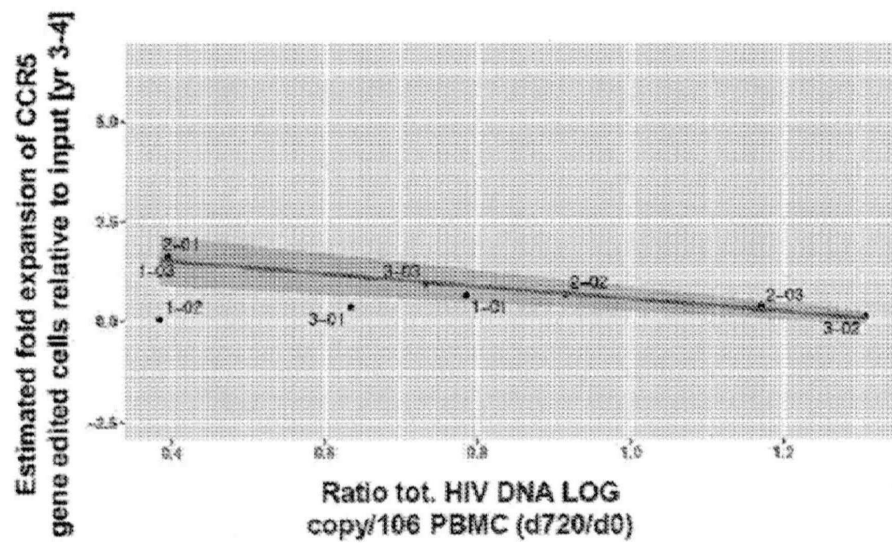


Fig. 2D

도면2e

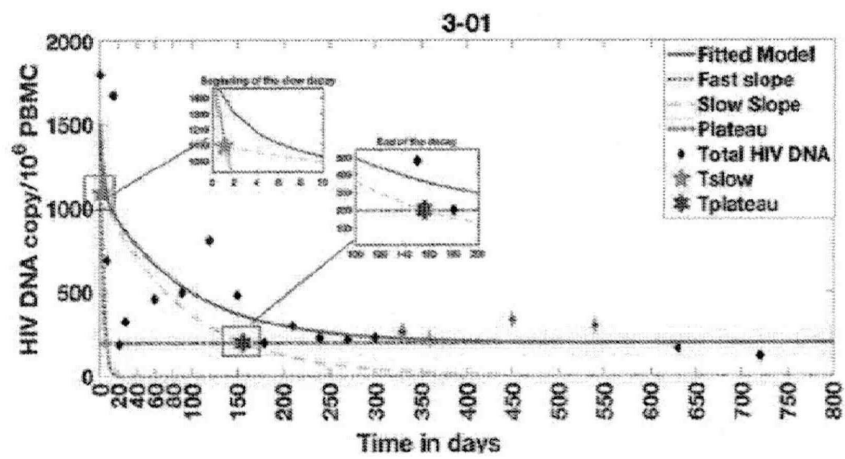


Fig. 2E

도면2f

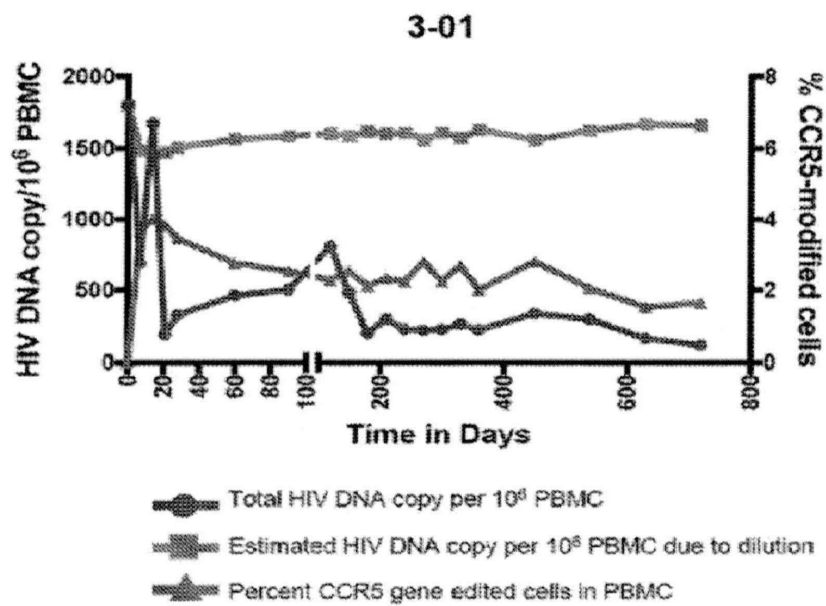


Fig. 2F

도면3a

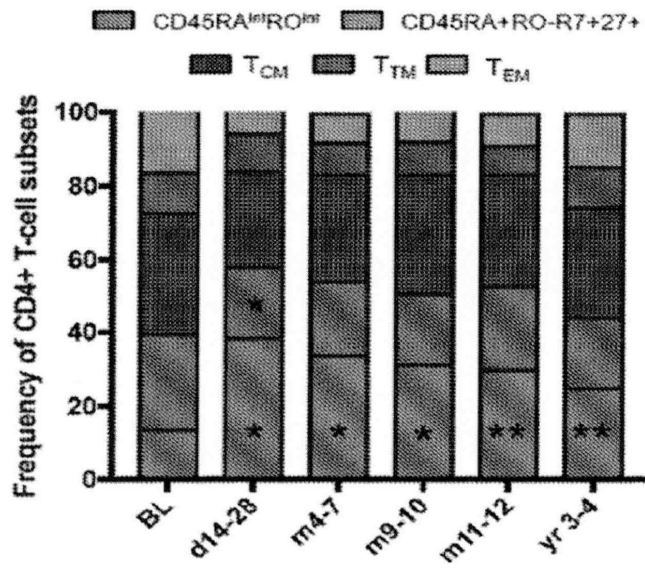


Fig. 3A

도면3b

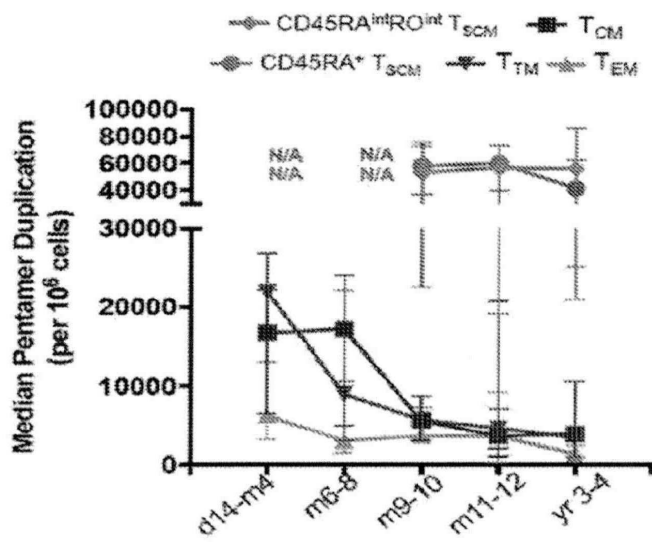


Fig. 3B

도면3c

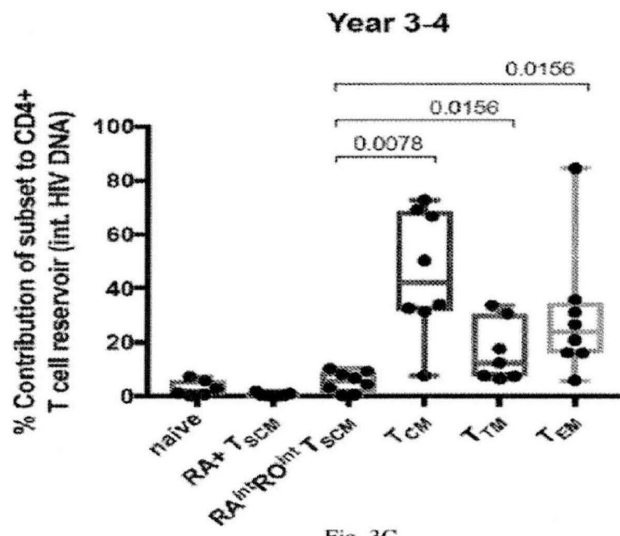


Fig. 3C

도면3d

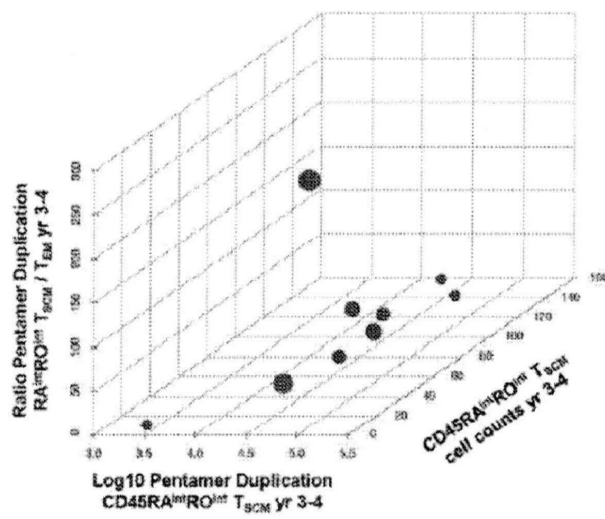


Fig. 3D

도면4a

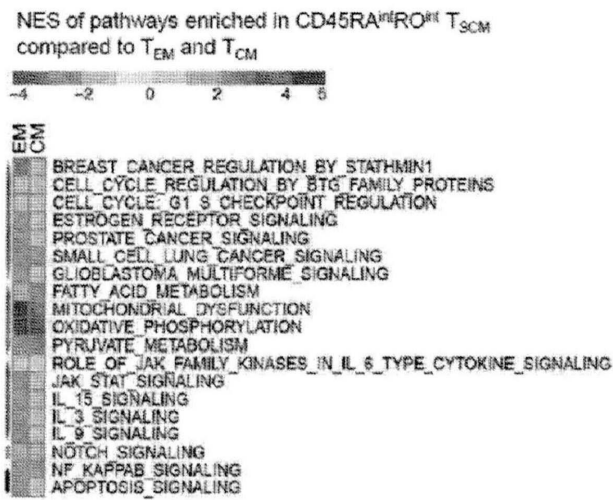


Fig. 4A

도면4b

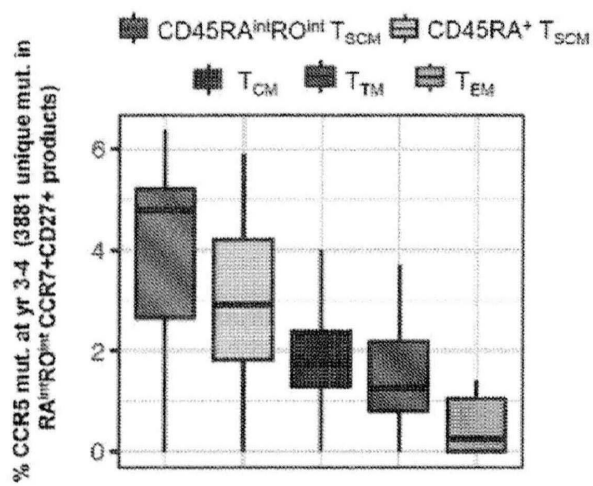


Fig. 4B

도면4c

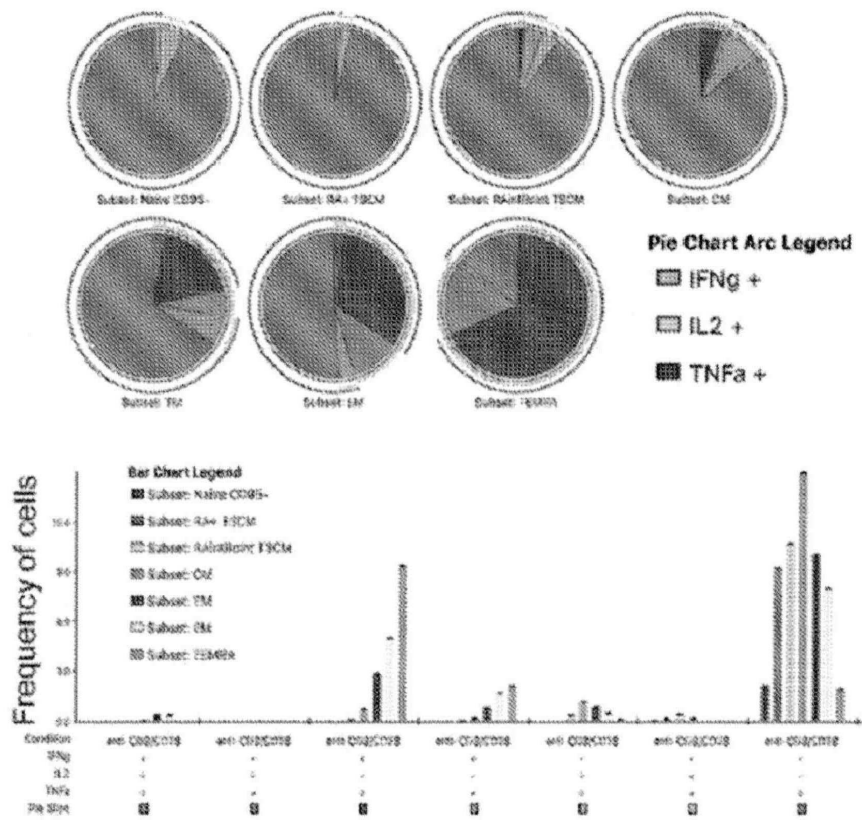


Fig. 4C

도면4d

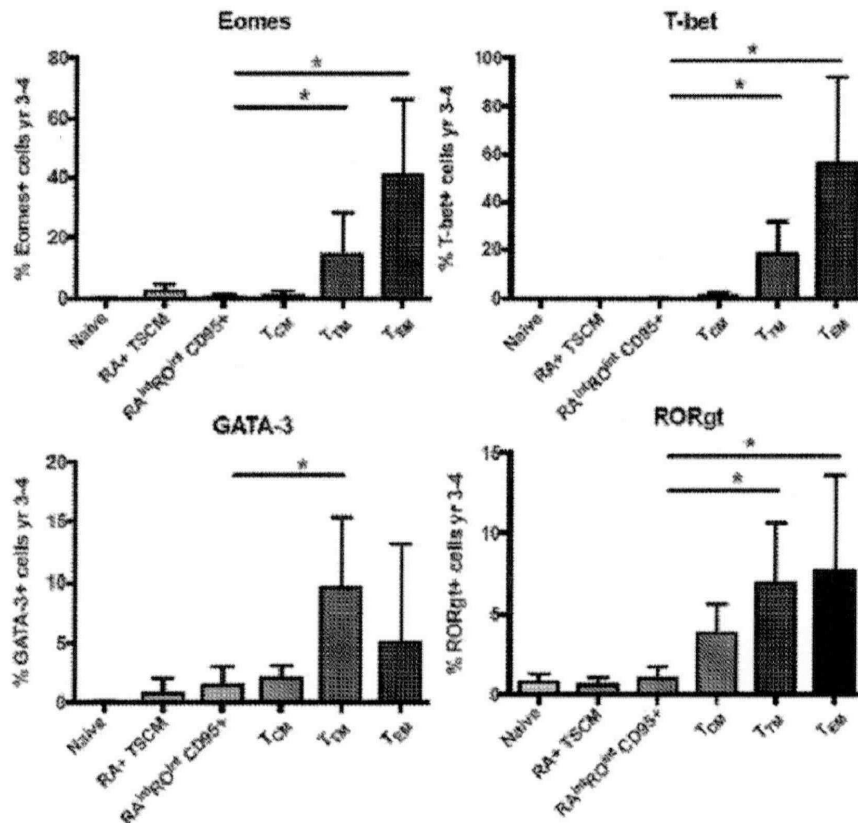


Fig. 4D

도면4e

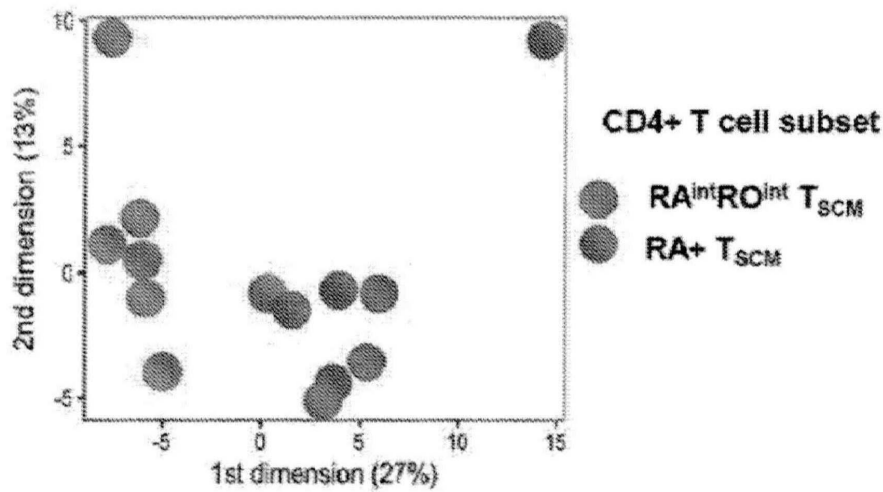


Fig. 4E

도면5a

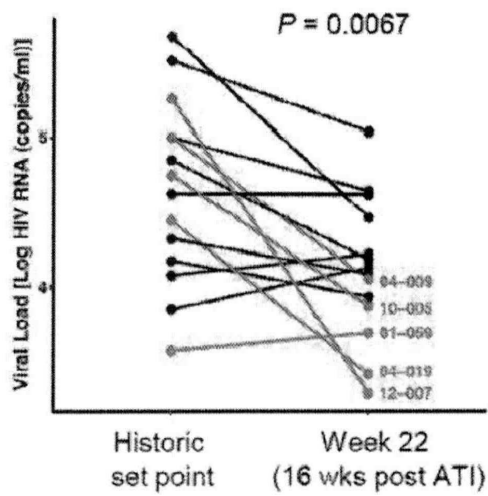


Fig. 5A

도면5b

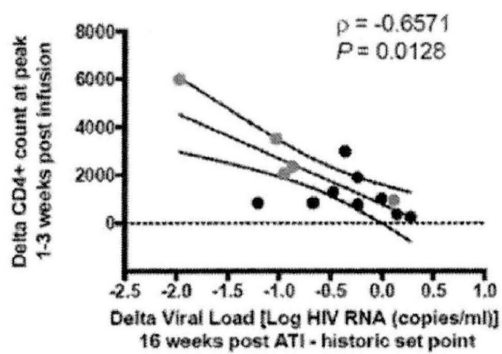


Fig. 5B

도면5c

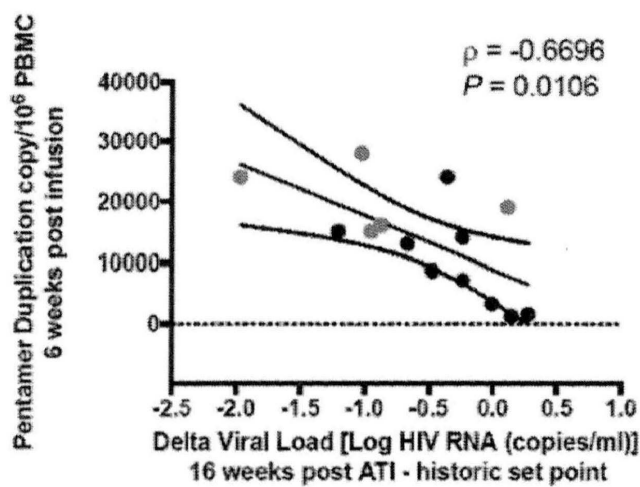
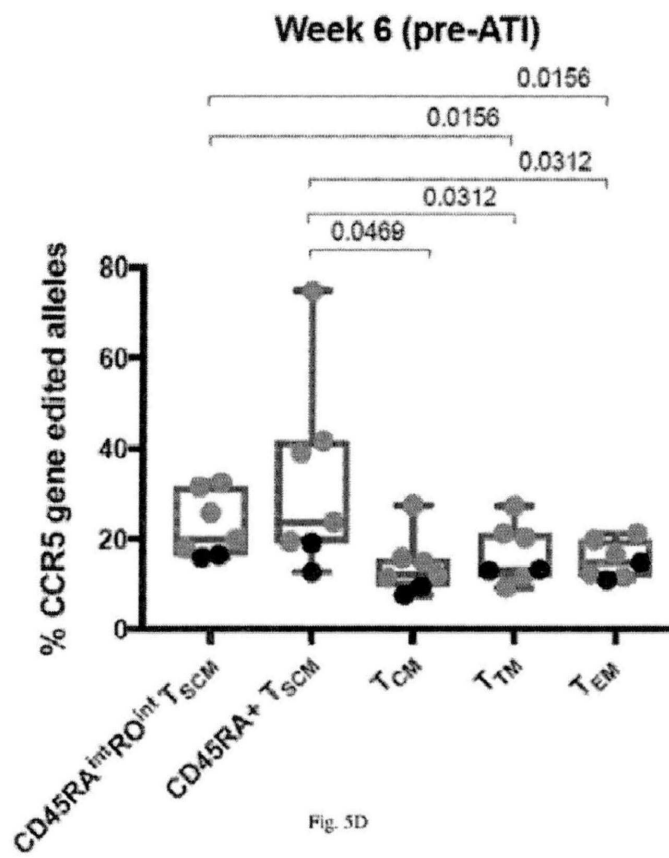
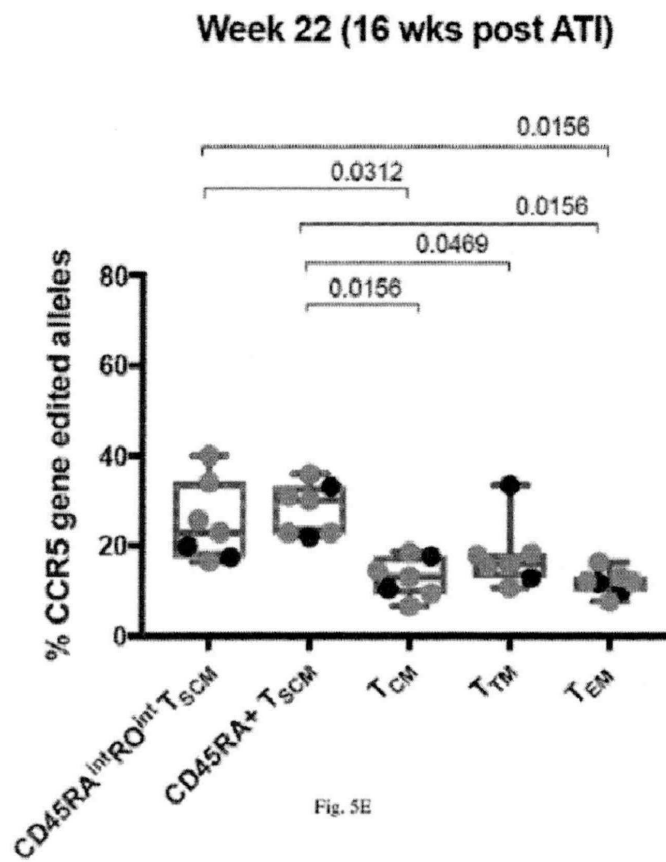


Fig. 5C

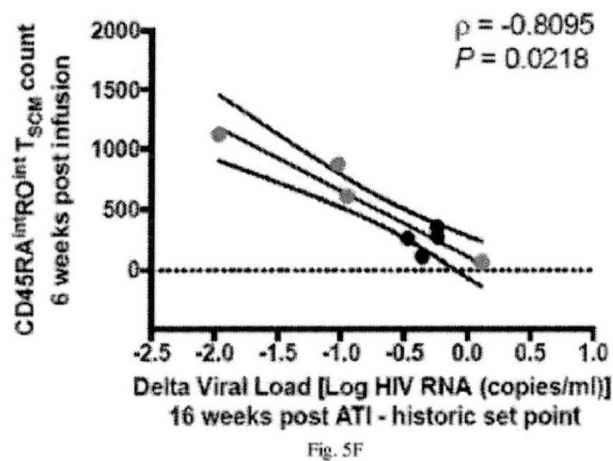
도면5d



도면5e



도면5f



도면5g

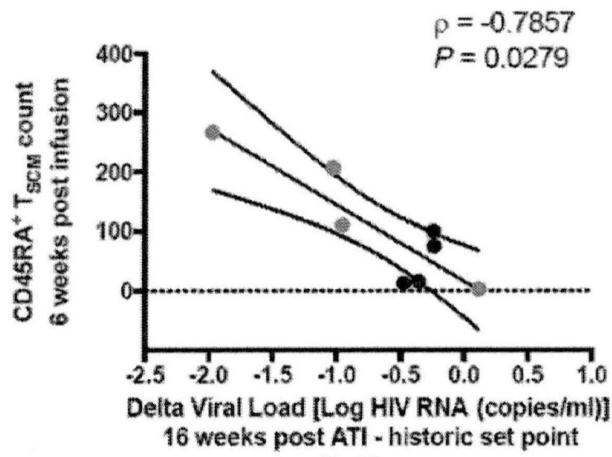


Fig. 5G

도면5h

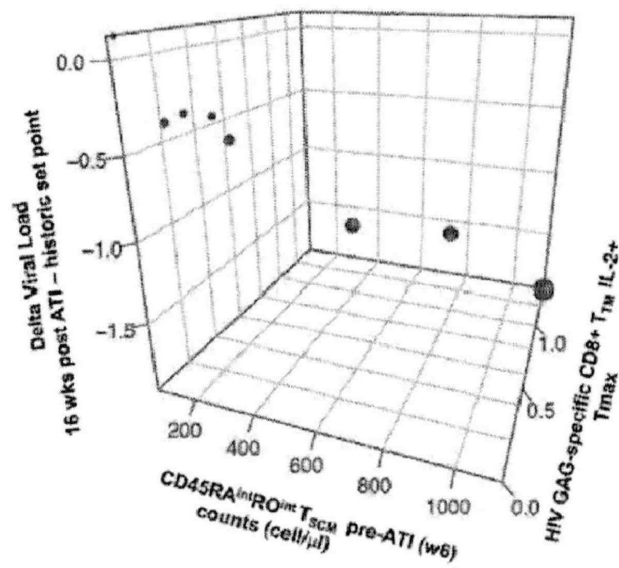


Fig. 5H

도면6a

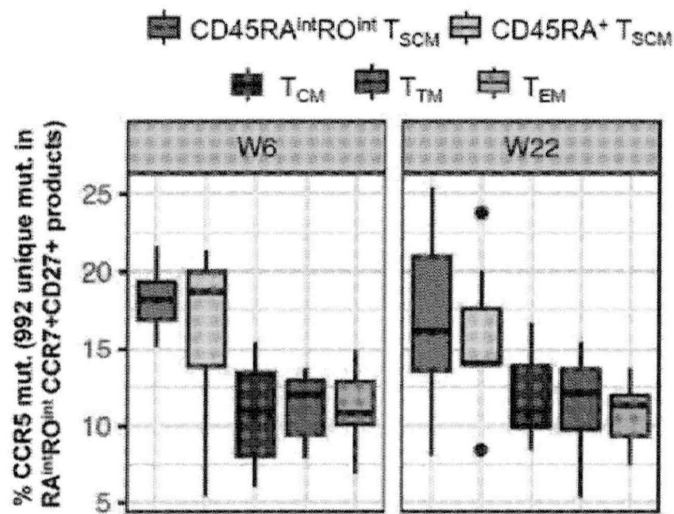


Fig. 6A

도면6b

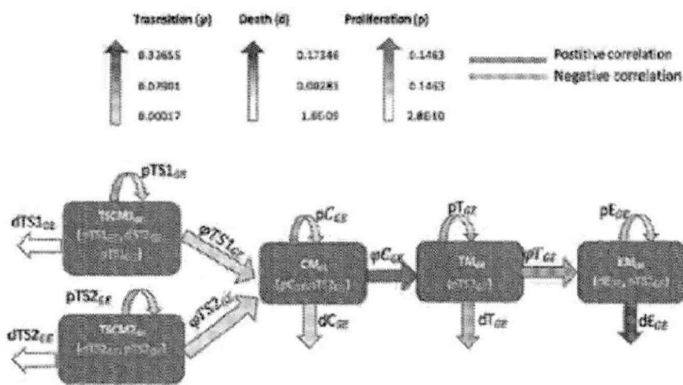


Fig. 6B

도면6c

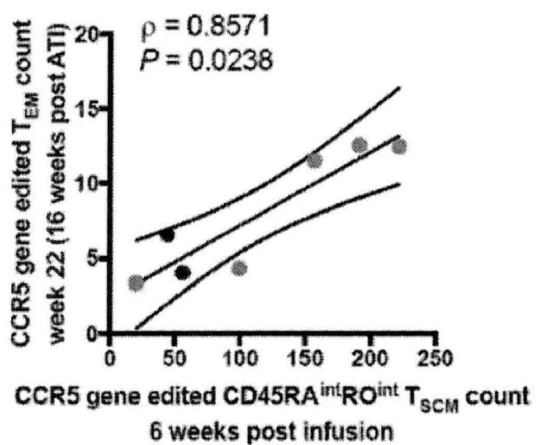


Fig. 6C

도면6d

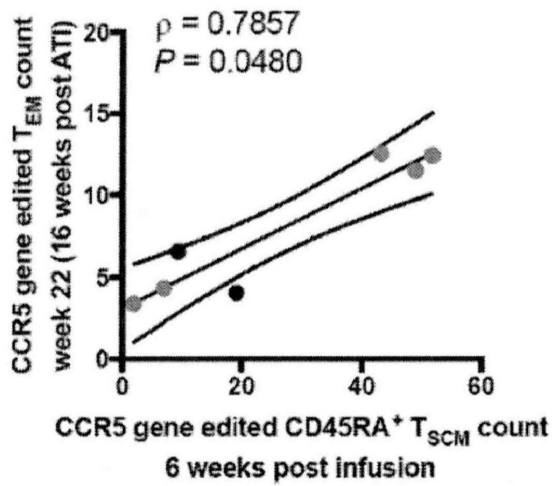


Fig. 6D

도면6e

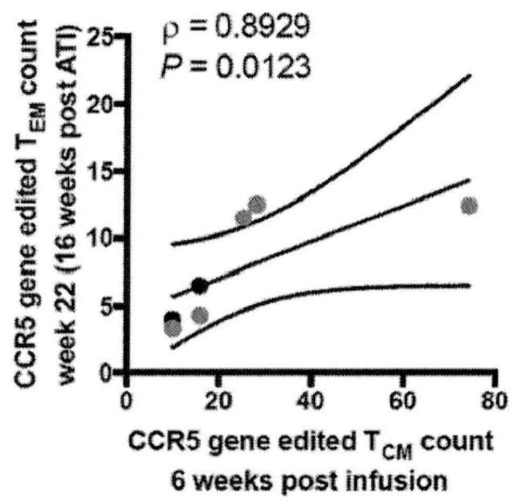
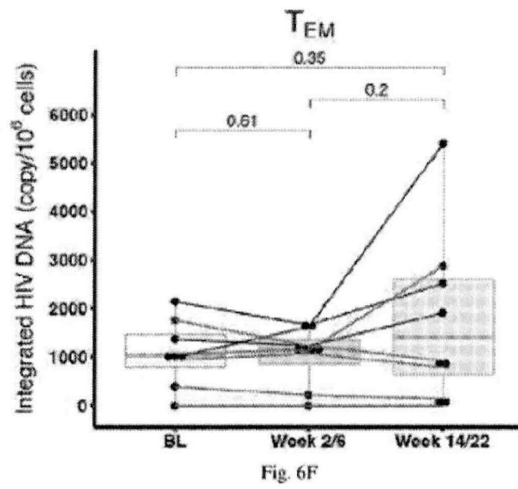
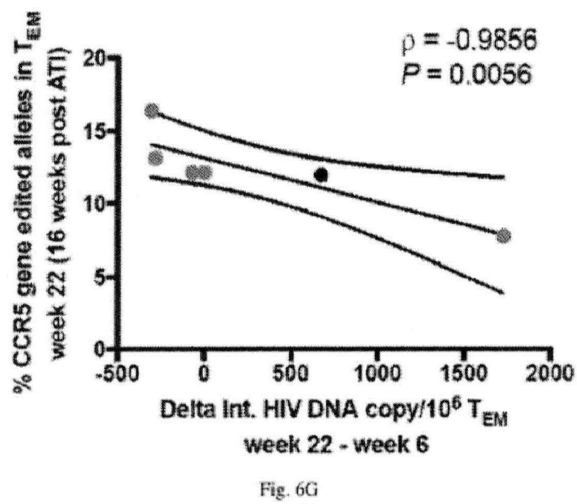


Fig. 6E

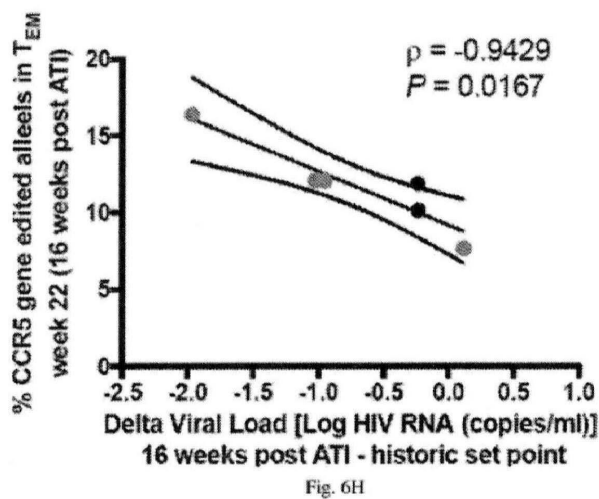
도면6f



도면6g



도면6h



도면6i

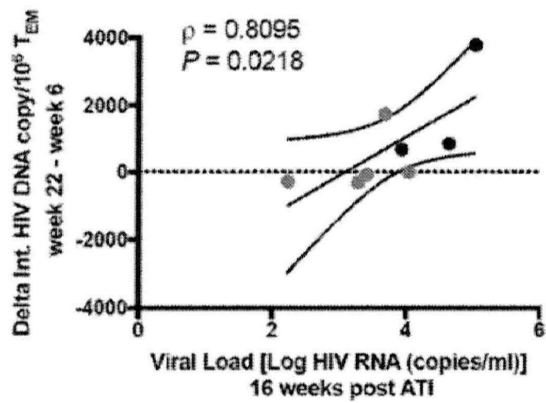


Fig. 6I

도면7

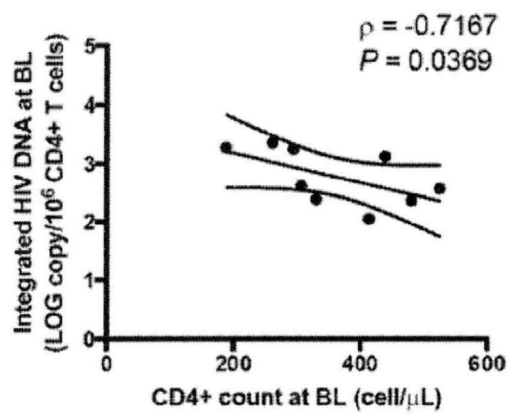


Fig. 7

도면8a

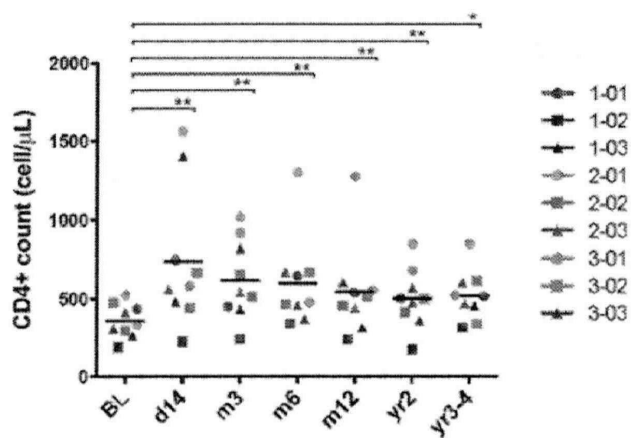


Fig. 8A

도면8b

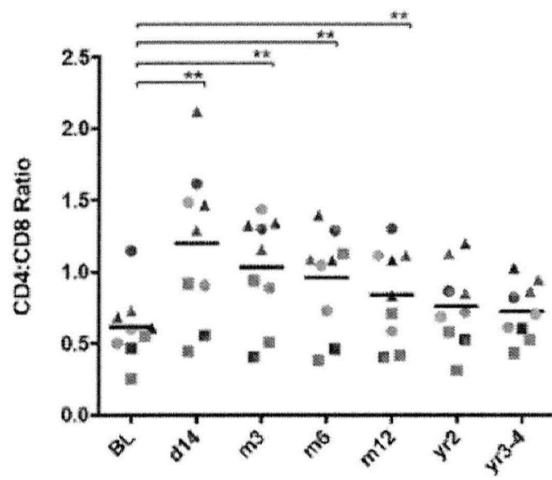


Fig. 8B

도면8c

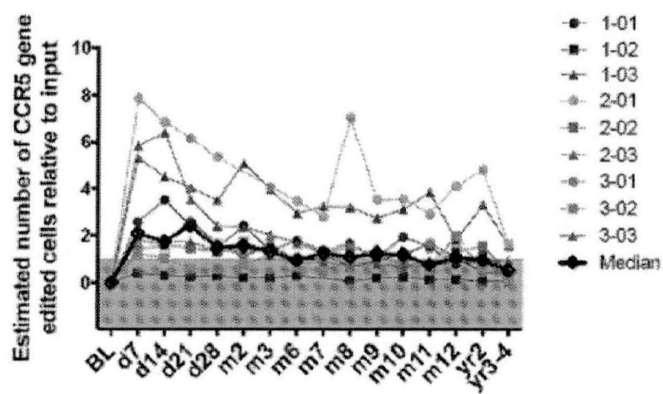


Fig. 8C

도면8d

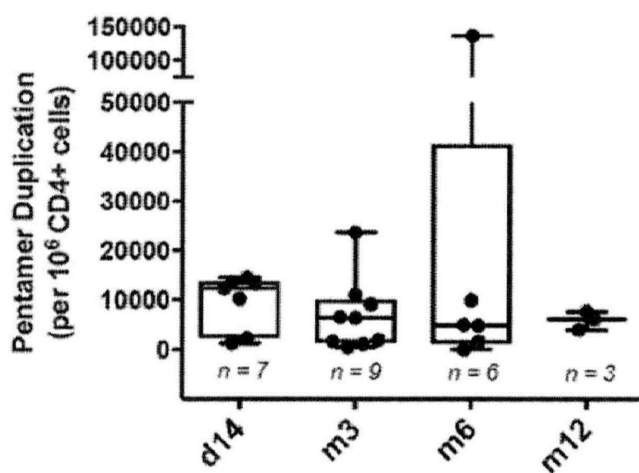


Fig. 8D

도면8e

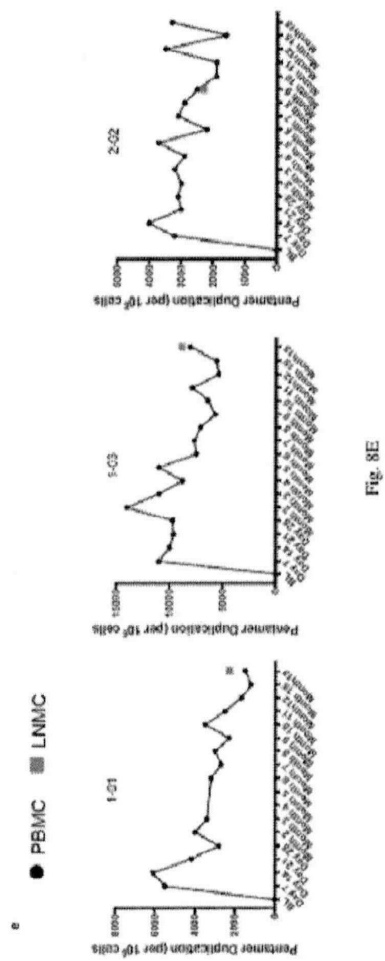


Fig. 8E

도면9a

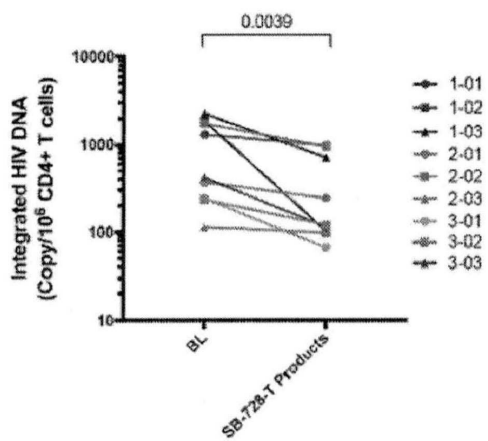


Fig. 9A

도면9b

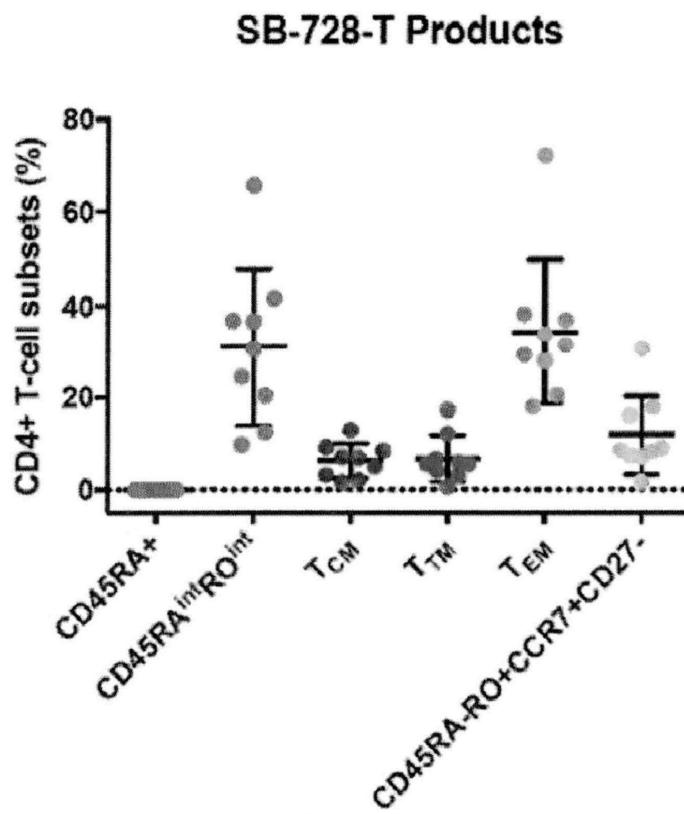
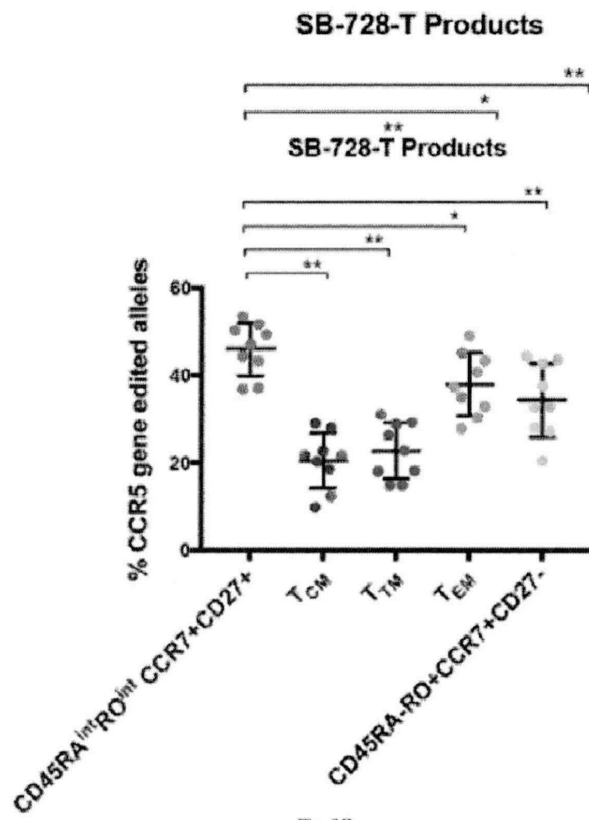
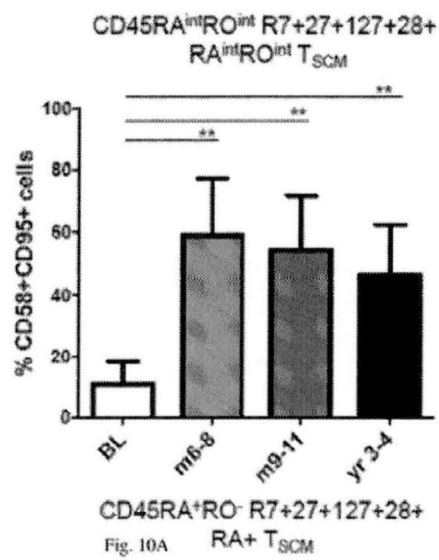


Fig. 9B

도면9c



도면10a



도면10b

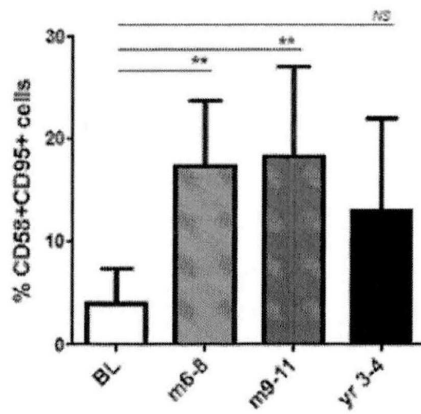


Fig. 10B

도면10c

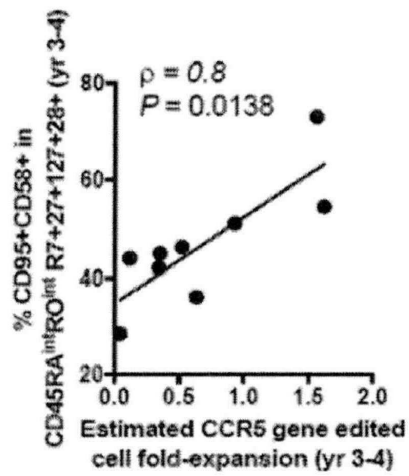


Fig. 10C

도면10d

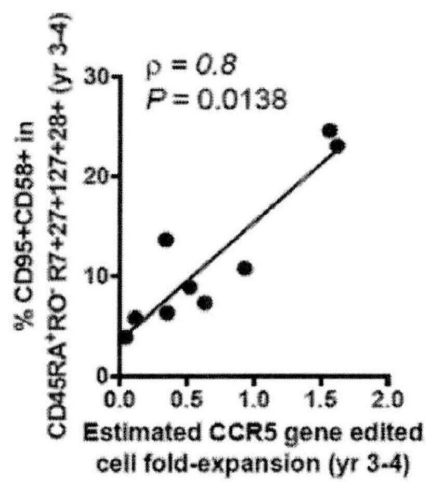


Fig. 10D

도면10e

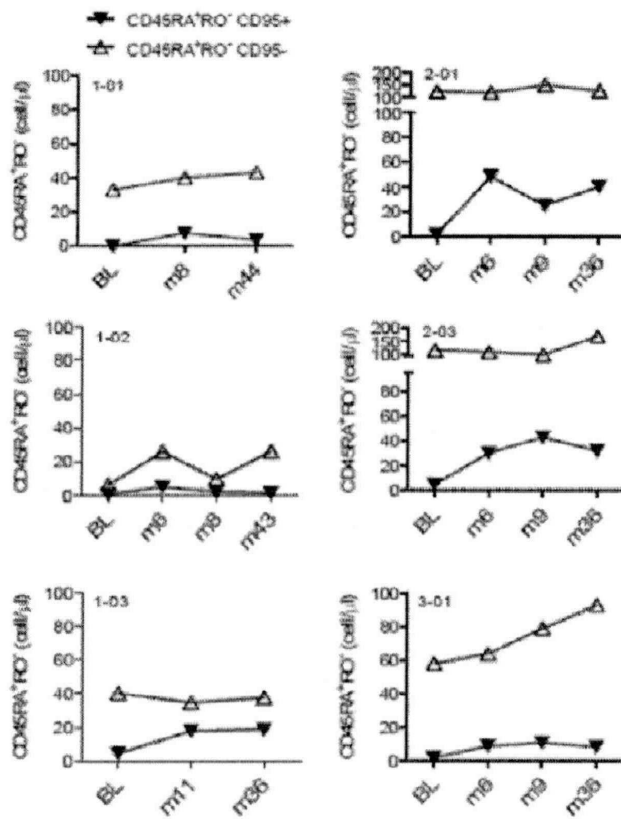


Fig. 10E

도면10f

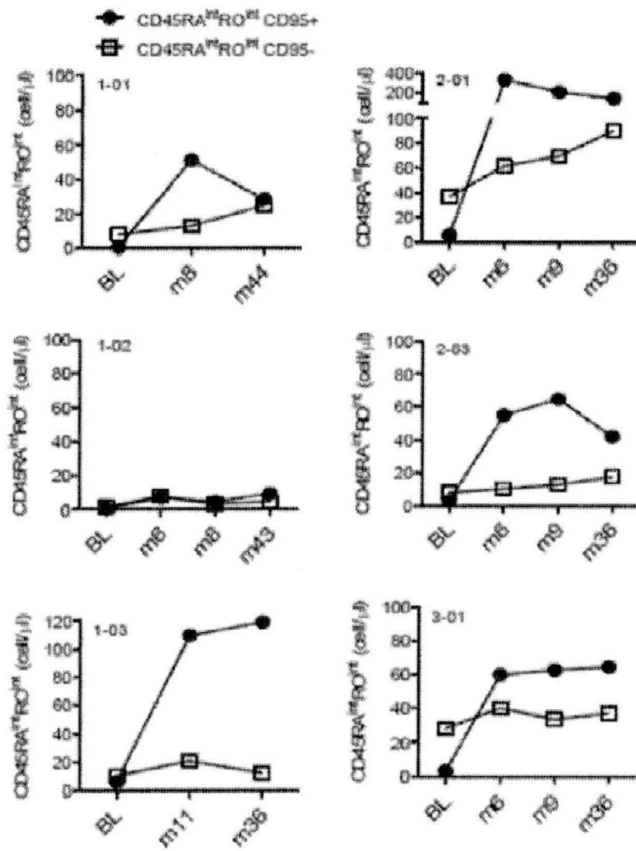


Fig. 10F

도면11

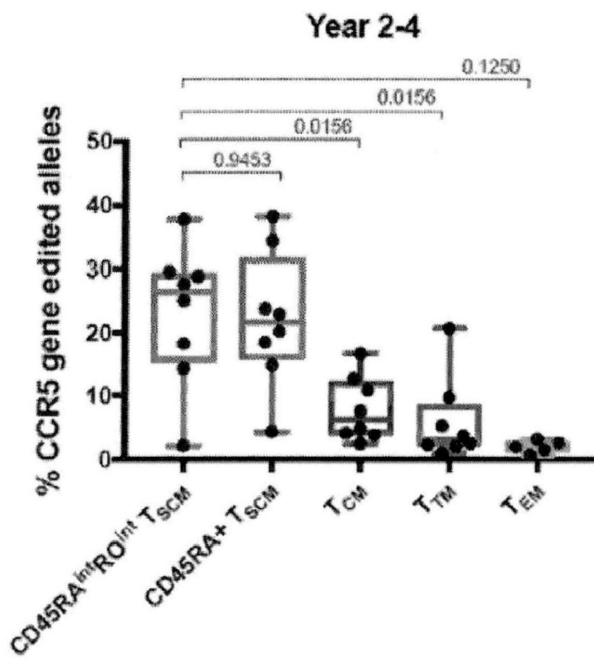


Fig. 11

도면12a

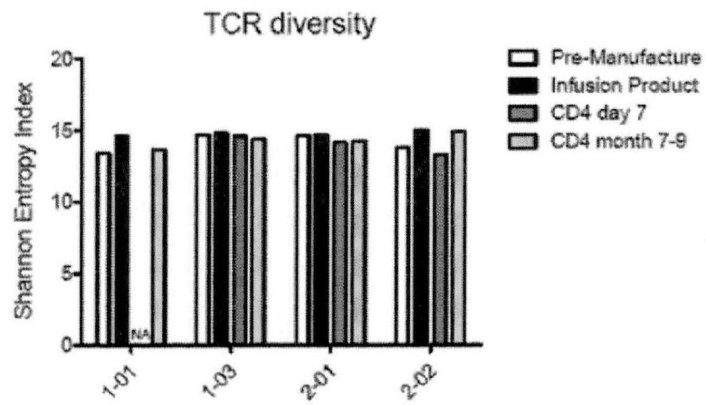


Fig. 12A

도면12b

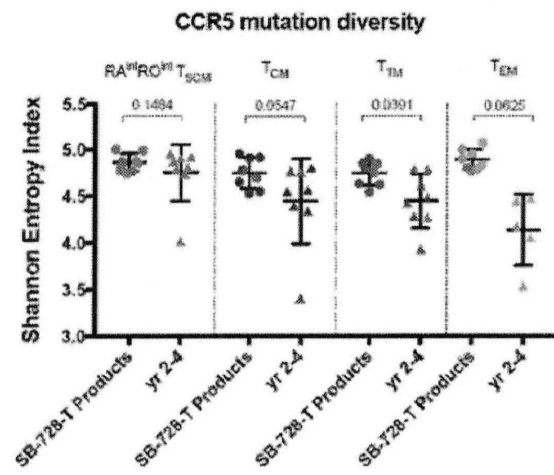


Fig. 12B

도면13a

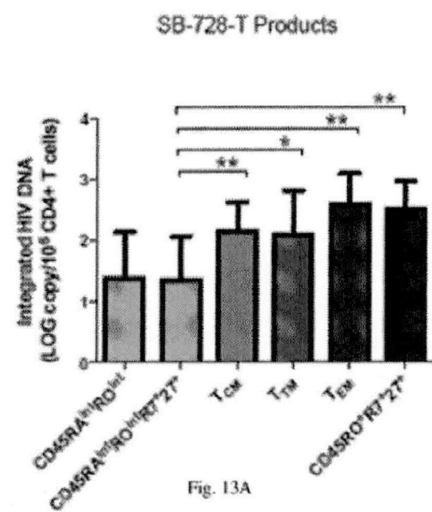
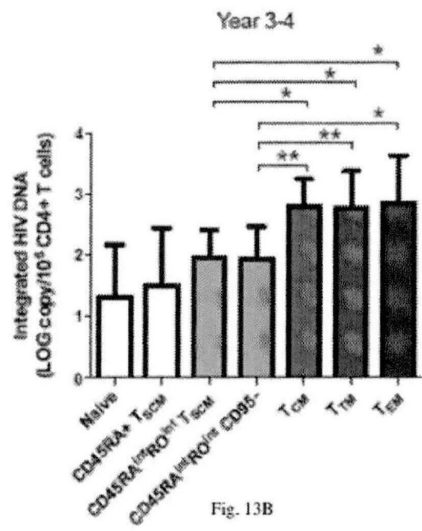
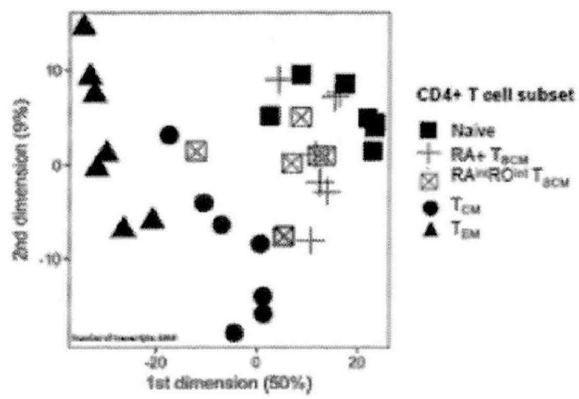


Fig. 13A

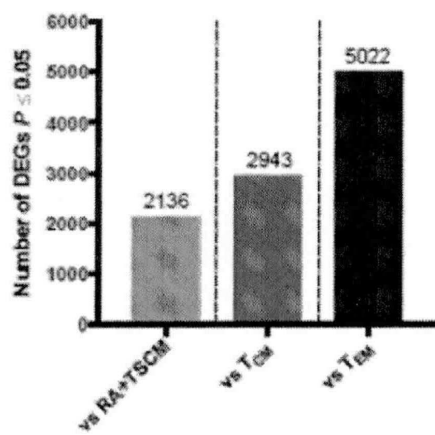
도면13b



도면14a



도면14b



도면15a

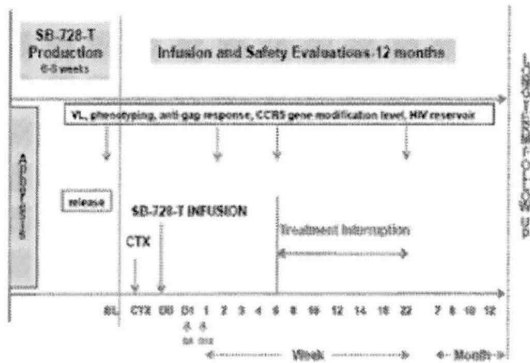


Fig. 15A

도면15b

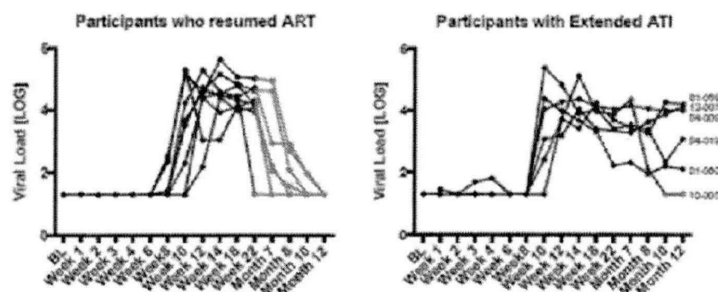


Fig. 15B

도면16a

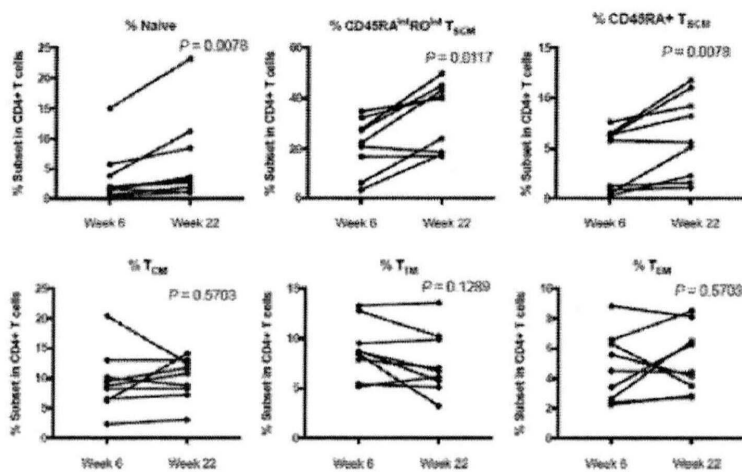


Fig. 16A

도면16b

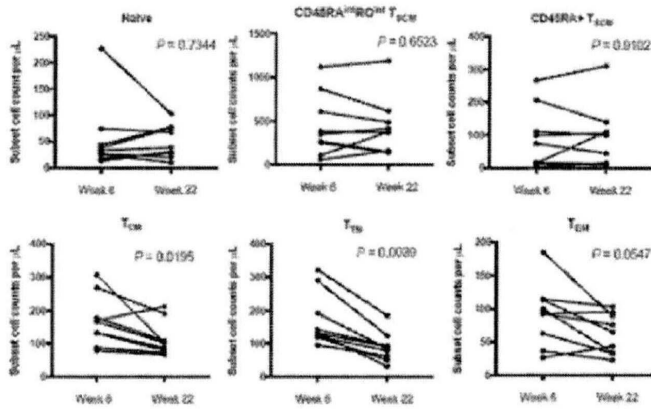


Fig. 16B

도면17

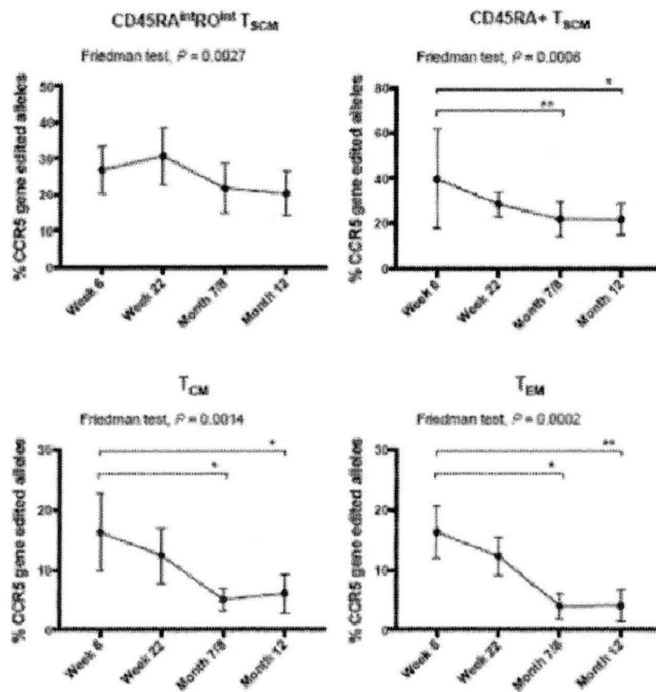


Fig. 17