(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0107610
(43) 공개일자 2023년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 39/001129 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7019126
(22) 출원일자(국제) 2021년11월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/059182
(87) 국제공개번호 WO 2022/104090
국제공개일자 2022년05월19일
(30) 우선권주장
63/113,739 2020년11월13일 미국(US)
63/229,017 2021년08월03일 미국(US)

(71) 출원인
보르 바이오파마 인크.
미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 케임브리지 파크 드라이브 100 스위트 400
(72) 발명자
카심, 새딕
미국 02140 매사추세츠 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 100 스위트 400
쉐러, 줄리안
미국 02140 매사추세츠 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 100 스위트 400
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

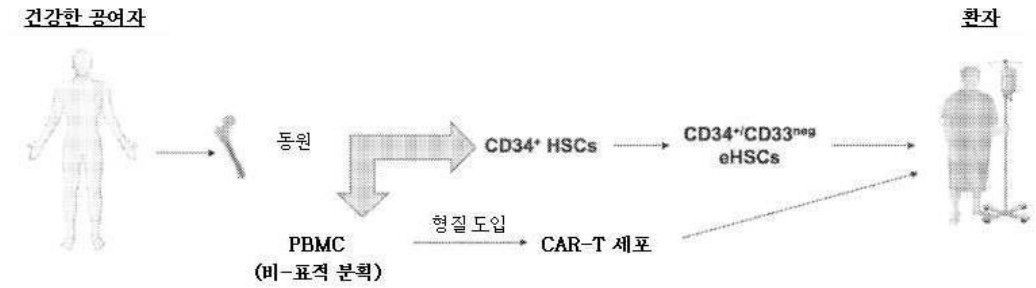
전체 청구항 수 : 총 71 항

(54) 발명의 명칭 **키메라 항원 수용체를 발현하는 유전적으로 조작된 세포와 관련된 방법 및 조성물**

(57) 요 약

본 개시내용은 키메라 항원 수용체를 발현하는 유전적으로 조작된 세포와 관련된 방법 및 조성물에 관한 것으로, 이때 세포는 동원된 림프구이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/02 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 5/0646 (2023.05)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
(72) 발명자
카네신, 기아코모
미국 02140 매사추세츠 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 100 스위트 400
차크라보티, 티르타
미국 02140 매사추세츠 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 100 스위트 400

명 세 서

청구범위

청구항 1

유전적으로 조작된 세포로서,

과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 이종 핵산을 포함하며,

상기 세포는 동원된 림프구 세포, 또는 이의 후손인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포는 T 림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 T 림프구는 CD3, CD4, 및/또는 CD8을 발현하는, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 T 림프구는 CD4 및 CD8을 발현하는, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 PD1을 발현하는, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 알파/베타 T 림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 감마/델타 T 림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 미처리 T 림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 효과기 T 림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 기억 T 림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 조절 T 림프구(Treg)인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 세포는 B-림프구인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 세포는 자연 살해(NK) 세포인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 동원은 대상체에게 에토포시드, 플레릭사포, 사이클로포스파미드, 및/또는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF)를 투여하는 단계를 포함하는, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 1세대 CAR인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 2세대 CAR인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 3세대 CAR인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계통-특이적 세포 표면 항원은 CD33, CD30, CD38, CD123, CLL-1, CD5, CD6, CD7, CD19, 또는 BCMA인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과증식성 질환은 조혈 악성종양인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 골수성 악성종양인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 골수이형성 증후군, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프구 백혈병인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 급성 골수성 백혈병인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 24

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 골수이형성 증후군인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 림프 악성종양인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로하는 대상체에 투여하기 위한, 유전적으로 조작된 세포로서, 상기 대상체는 조혈성 악성종양을 갖고 있거나 이로 진단을 받았고, 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 결여되었거나, CAR에 의해 인식되지 않거나 감소된 수준으로 인식되는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식을 받은, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 27

방법으로서,

제1 대상체로부터 수득된 동원된 림프구를 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 이종 핵산과 접촉시켜, CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 림프구를 생산하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 제2 대상체에게 유전적으로 조작된 림프구 또는 이의 후손을 투여하는 단계를 추가로 포함하며,

상기 제2 대상체는 이를 필요로 하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 제2 대상체는 과증식성 질환을 앓고 있거나 이로 진단을 받은, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 제1 대상체는 상기 제2 대상체와 상이한, 방법.

청구항 31

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 제1 대상체는 상기 제2 대상체와 동일한, 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 조작된 림프구, 또는 이의 후손의 투여를 필요로 하는 대상체는 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 결여되었거나, CAR에 의해 인식되지 않거나 감소된 수준으로 인식되는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식을 받은, 방법.

청구항 33

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유전적으로 조작된 림프구 또는 이의 후손의 투여 후 조혈 줄기 세포 이식을 이를 필요로 하는 대상체에게 이를 투여하는 단계를 추가로 포함하며;

상기 이식은 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 결여되었거나, CAR에 의해 인식되지 않거나 감소된 수준으로 인식되는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 포함하는, 방법.

청구항 34

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전적으로 조작된 림프구 또는 이의 후손은, 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 결여되었거나, CAR에 의해 인식되지 않거나 감소된 수준으로 인식되는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식과 병용하여 투여되는, 방법.

청구항 35

제27항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 대상체로부터 수득된 조혈 줄기 세포를 RNA-가이드 뉴클레아제 및 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산과 접촉시키고, 상기 가이드 RNA는 계통-특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 유전자를 표적화하고,

이에 의해 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 결여되었거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체를 발현하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 생산하는 단계를

추가로 포함하고,

여기서 상기 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CAR에 의해 표적화되지 않는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 또는 이의 후손을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 37

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동원된 림프구는 T 림프구인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 T 림프구는 CD3, CD4, 및/또는 CD8을 발현하는, 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 T 림프구는 CD4 및 CD8을 발현하는, 방법.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 PD1을 발현하는, 방법.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 알파/베타 T 림프구인, 방법.

청구항 42

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 감마/델타 T 림프구인, 방법.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 미처리 T 림프구인, 방법.

청구항 44

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 효과기 T 림프구인, 방법.

청구항 45

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 기억 T 림프구인, 방법.

청구항 46

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 림프구는 조절 T 림프구(Treg)인, 방법.

청구항 47

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동원된 림프구는 B-림프구인, 방법.

청구항 48

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동원된 림프구는 자연 살해(NK) 세포인, 방법.

청구항 49

제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 1세대 CAR인, 방법.

청구항 50

제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 2세대 CAR인, 방법.

청구항 51

제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 3세대 CAR인, 방법.

청구항 52

제27항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계통-특이적 세포 표면 항원은 CD33, CD30, CD38, CD123, CLL-1, CD5, CD6, CD7, CD19, 또는 BCMA인, 방법.

청구항 53

제27항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과증식성 질환은 조혈 악성종양인, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 골수성 악성종양인, 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종인, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 급성 림프구 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프구 백혈병인, 방법.

청구항 57

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 급성 골수성 백혈병인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 58

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 골수이형성 증후군인, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 59

제27항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 악성종양은 림프 악성종양인, 방법.

청구항 60

제35항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 CRISPR/Cas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제인, 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 CRISPR/Cas 뉴클레아제는 SpCas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 63

제60항에 있어서, 상기 CRISPR/Cas 뉴클레아제는 SaCas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 64

제60항에 있어서, 상기 CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제인, 방법.

청구항 65

제35항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA 및/또는 상기 RNA-가이드 뉴클레아제를 암호화하는 핵산은 RNA, 바람직하게는 mRNA 또는 mRNA 유사체인, 방법.

청구항 66

제35항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, 방법.

청구항 67

제35항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 2'O-메틸 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, 방법.

청구항 68

제35항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 포스포로티오에이트를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, 방법.

청구항 69

제35항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 티오PACE 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 복수의 유전적으로 조작된 세포를 포함하거나, 제27항 내지 제69항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산되거나, 수득되거나 또는 수득될 수 있는, 세포 집단.

청구항 71

제70항의 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2020년 11월 13일에 출원된 미국 가출원 제63/113,739호의 및 2021년 8월 3일에 출원된 미국 가출원 제63/229,017호의 35 U.S.C. 119(e) 하의 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)를 암호화하는 이종(heterologous) 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포에 관한 것으로서, 상기 세포는 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 수득된 림프구 세포(또는 이의 후손)이다. 일 측면에서, 유전적으로 조작된 세포는 동원된 림프구 세포 또는 동원된 림프구 세포의 후손이다. 본 개시내용은 또한, 부분적으로, 이러한 유전적으로 조작된 세포를 생산하는 방법, 및 이러한 유전적으로 조작된 세포(또는 이의 후손)를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은, 부분적으로, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 본 개시내용의 유전적으로 조작된 세포(*예를 들어*, CAR-발현 세포)가 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터의 성분채집술 샘플로부터 생성될 수 있다는 발견에 기초한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 방법은 유전적으로 조작된 림프구, 예를 들어, CAR-발현 림프구, 및 대상체에서 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 동일한 성분채집술 샘플로부터의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포(HSC: hematopoietic stem cell)의 생산을 가능하게 하여, 다수의 성분채집술 절차를 피하고, HSC, 예를 들어 대상체에 대한 조혈 줄기 세포 이식에 사용될 수 있는 유전적으로 조작된 HSC뿐만 아니라, HSC에 유전적으로 일치하는 림프구, 예를 들어 CAR을 발현하고 조혈 줄기 세포 이식을 받는 동일한 대상체에게 투여될 수 있는 유전적으로 조작된 림프구를 생성한다.

배 경 기 술

[0004] 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이, 조혈 줄기 세포는 일반적으로 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터

채취한 성분채집술 샘플로부터 수확된다. 그러나, 성분채집술 샘플(예를 들어, CD34+) 세포의 하위 집합만이 조혈 줄기 세포이다. 이러한 성분채집술 샘플은 또한, 예를 들어 림프구, 및 다른 세포를 포함하는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC: peripheral blood mononuclear cell)를 포함한다. 본 개시내용은, 부분적으로, 조혈 줄기 세포(예를 들어, PBMC)로서 수확되지 않은 성분채집술 샘플 유래의 세포가 유전적으로 조작된 세포, 예를 들어 키메라 항원 수용체 (예를 들어, CAR 세포)를 발현하는 림프구를 제조하는데 사용될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 이러한 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)는 면역치료제로서 사용될 수 있고, 다수의 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 개시내용의 세포 및 방법은 단일 공여자 대상체로부터의 단일 성분채집술 샘플로부터 본 개시내용의 조혈 줄기 세포 및 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)를 생산하기 위한 자원 효율적인 수단을 제공할 수 있다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용의 측면은 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 유전적으로 조작된 세포를 제공하며, 상기 세포는 림프구 세포이고, 상기 세포, 또는 이들의 부모 세포는 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 수득된다. 본 개시내용의 측면은, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포에 관한 것이며, 상기 세포는 동원된 림프구 세포, 또는 이의 후손이다.

[0006] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포는 림프구 세포이고, 상기 세포 또는 이들의 부모 세포는 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 수득된다. 일부 실시예에서, 세포는 동원된 림프구 세포이다.

[0007] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포 또는 동원된 림프구는 T 림프구이다. 일부 실시예에서, T 림프구는 CD3, CD4, 및/또는 CD8(예를 들어, CD4 및 CD8)을 발현한다. 일부 실시예에서, T 림프구는 PD1을 발현한다. 일부 실시예에서, T 림프구는 알파/베타 T 림프구, 감마/델타 T 림프구, 미처리 T 림프구, 효과기 T 림프구, 기억 T 림프구, 또는 조절 T 림프구(Treg)이다.

[0008] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포 또는 동원된 림프구는 B-림프구이다. 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포 또는 동원된 림프구는 자연 살해(NK: Natural killer) 세포이다.

[0009] 일부 실시예에서, 조혈 줄기 세포 동원은 대상체에게 에토포시드, 플레릭사포, 사이클로포스파미드, 및/또는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0010] 일부 실시예에서, 키메라 항원 수용체는 1세대 CAR, 2세대 CAR, 또는 3세대 CAR이다.

[0011] 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원은 CD33, CD30, CD38, CD123, CLL-1, CD5, CD6, CD7, CD19, 또는 BCMA이다.

[0012] 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 조혈 악성종양(hematopoietic malignancy) 또는 골수성 악성종양(myeloid malignancy)이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종이다. 일부 실시예에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 골수이형성 증후군, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프구 백혈병이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 급성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 또는 림프구 악성종양이다.

[0013] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포는 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위한 것이며, 상기 대상체는 조혈 악성종양을 가지고 있거나 진단받았다. 일부 실시예에서, 대상체는, 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 발현이 결여되어 있거나 CAR에 의해 인식되지 않거나 감소된 수준으로 인식되는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식을 받았다.

[0014] 일부 측면에서, 본 개시내용은 제1 대상체로부터 수득된 동원된 림프구를, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 이종 핵산과 접촉시켜, CAR를 발현하는 유전적으로 조작된 림프구를 생산하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 방법은 제2 대상체에게 유전적으로 조작된 림프구 또는 이의 후손을 투여하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 제2 대상체는 이를 필요로 한다. 일부 실시예에서, 제2 대상체는 과증식성 질환을 앓고 있거나 진단받았다. 일부 실시예에서, 제1 대상체는 제2 대상체와 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 대상체는 제2 대상체와 동일하다.

[0015] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 림프구, 또는 이의 후손의 투여를 필요로 하는 대상체는, 계통-특이적 세

포 표면 항원의 발현이 감소되었거나 발현이 결여되어 있거나 CAR에 의해 인식되지 않거나 감소된 수준으로 인식되는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식을 받았다. 일부 실시예에서, 방법은 유전적으로 조작된 림프구, 또는 이의 후손의 투여 후 조혈 줄기 세포 이식을 필요로 하는 대상체에게 이를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 림프구 또는 이의 후손은 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식과 병용하여 투여된다.

[0016] 일부 실시예에서, 방법은 제1 대상체로부터 수득된 조혈 줄기 세포를 RNA-가이드 뉴클레아제 및 가이드 RNA 또는 이를 암호화하는 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 상기 가이드 RNA는 계통-특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 유전자를 표적화하고, 이에 따라 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소되거나 발현이 결여되거나 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태를 발현하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포가 생산된다. 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CAR, 예를 들어, 유전적으로 조작된 림프구의 CAR에 의해 표적화되지 않는다. 일부 실시예에서, 방법은 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 또는 이의 후손을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포 또는 동원된 림프구는 T 림프구이다. 일부 실시예에서, T 림프구는 CD3, CD4, 및/또는 CD8(예를 들어, CD4 및 CD8)을 발현한다. 일부 실시예에서, T 림프구는 PD1을 발현한다. 일부 실시예에서, T 림프구는 알파/베타 T 림프구, 감마/델타 T 림프구, 미처리 T 림프구, 효과기 T 림프구, 기억 T 림프구, 또는 조절 T 림프구(Treg)이다.

[0018] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포 또는 동원된 림프구는 B-림프구이다. 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포 또는 동원된 림프구는 자연 살해(NK) 세포이다.

[0019] 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원은 CD33, CD30, CD38, CD123, CLL-1, CD5, CD6, CD7, CD19, 또는 BCMA이다. 일부 실시예에서, 키메라 항원 수용체는 1세대 CAR, 2세대 CAR, 또는 3세대 CAR이다.

[0020] 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 조혈 악성종양 또는 골수성 악성종양. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종이다. 일부 실시예에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 골수이형성 증후군, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프구 백혈병이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 급성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 또는 림프구 악성종양이다.

[0021] 일부 실시예에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 CRISPR/Cas 뉴클레아제이다. 일부 실시예에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제, SpCas 뉴클레아제, SaCas 뉴클레아제, 또는 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시예에서, 가이드 RNA 및/또는 RNA-가이드 뉴클레아제를 암호화하는 핵산은 RNA, 바람직하게는 mRNA 또는 mRNA 유사체이다. 일부 실시예에서, 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 실시예에서, 가이드 RNA는 2'O-메틸 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 실시예에서, 가이드 RNA는 포스포로티오에이트를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 실시예에서, 가이드 RNA는 티오PACE 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다.

[0022] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 복수의 유전적으로 조작된 세포를 포함하는 세포 집단을 제공하거나, 본원에 기술된 방법에 의해 생산되거나, 수득되거나 수득가능할 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기술된 세포 집단 중 어느 하나를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 본 명세서의 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 여러 실시예를 도시하며, 본 설명과 함께 본 발명의 원리를 설명하는 역할을 한다.

도 1은 단일 공여자로부터 편집된 조혈 줄기 세포(eHSC) 및 키메라 항원 수용체(CAR)-발현 세포 처리 시스템의 생산에 대한 예시적인 실시예를 보여주는 개략도이다.

도 2는 편집된 조혈 줄기 세포(eHSC) 및 키메라 항원 수용체(CAR)-발현 T 세포(CAR-T 세포)가 단일 공여자로부터 생산되어 환자에게 투여되는 예시적인 방법을 보여주는 개략도이다.

도 3a 내지 3h는 동원된 말초 혈액 단핵 세포의 집단(도 2에서 "비-표적 분획"으로 지칭되는 PBMC)을 특성분석

하는 플롯을 도시한다. **도 3a**는 CD3+ 세포(T 세포)의 집단을 보여주는 유세포 분석 플롯이다. **도 3b**는 CD14+ 세포(단핵구)의 집단을 보여주는 유세포 분석 플롯이다. **도 3c**는 CD56+ 세포(NK 세포)의 집단을 보여주는 유세포 분석 플롯이다. **도 3d**는 CD19+ 세포(B 세포)의 집단을 보여주는 유세포 분석 플롯이다. **도 3e**는 정상 상태(steady state) 세포 분획(좌측 패널) 또는 동원된 세포 분획(우측 패널)에서 CD3+ 세포(T 세포), 단핵구, NK 세포 및 B 세포의 상대적 풍부도를 보여주는 차트를 제시한다. **도 3f**는 CCR7(y-축) 및 CD45RA(x-축)의 발현에 기초한 도 3a의 CD3+ 세포(T 세포) 집단의 추가 특성분석을 보여주는 유세포 분석 플롯이다. **도 3g**는 도 3f의 세포 유형의 식별을 보여주는 개략도이다. TCM: 중앙 기억 T 세포, 낮은 CD45RA, 높은 CCR7; 미처리: 높은 CD45RA, 높은 CCR7; TEM: 효과기 기억 T 세포, 낮은 CD45RA, 낮은 CCR7; TEFF: 효과기 T 세포, 높은 CD45RA, 낮은 CCR7. **도 3h**는 T 세포 집단의 상대적 풍부도 정상 상태 세포 분획(좌측 패널) 또는 동원된 세포 분획(우측 패널)을 보여주는 차트를 나타낸다.

도 4a 내지 4d는 동원된 PBMC 집단 및 동원되지 않은 PBMC 집단의 면역표현형 특성분석을 보여준다. **도 4a**: CD3+ 세포, 단핵구, NK 세포, NKT 세포, 및 B 세포를 보여주는 면역 세포 표현형 분석. **도 4b**: CD8 및 CD4 집단을 보여주는 T 세포 표현형 비교. **도 4c**: 미처리 T 세포, T 효과기 세포(Teff), T 효과기 기억 세포(TEM), 및 중앙 기억 T 세포(TCM) 집단을 보여주는 T 세포 표현형 비교. **도 4d**: 정상 상태 및 동원된 CD8+ 및 CD4+ 하위 집합. **도 4a 내지 4c**의 세포 유형 각각에 대해, 데이터 포인트는 정상 상태(좌측) 및 동원(우측)에 상응한다.

도 5는 2명의 공여자(D1 및 D2)의 PBMC 집단의 CITEseq 특성분석을 보여준다. 좌측 패널 스택 그래프에서, 상단으로부터 하단까지 각각의 컬럼은 B 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, HSPC, 대식세포, 단핵구, 자연 살해 세포, 및 pDC 집단에 상응한다. 우측 패널에서, 각각의 세포 유형에 대해, 좌측 컬럼은 동원된 세포를 지칭하고, 우측 컬럼은 정상 상태 세포를 지칭한다.

도 6은 2명의 공여자(D1 및 D2)의 T 세포 하위-집단의 CITEseq 특성분석을 보여준다. 좌측 패널 스택 그래프에서, 상단으로부터 하단까지 각각의 컬럼은 CD4+ T 효과기 세포, CD4+ T 미처리, CD4+ TCM, CD4+ TEM, CD8+ T 효과기 세포, 및 CD8+ T 미처리 세포 집단에 상응한다. 우측 패널에서, 각각의 세포 유형에 대해, 좌측 컬럼은 동원된 세포를 지칭하며, 우측 컬럼은 정상 상태 세포에 상응한다.

도 7은 2명의 공여자(D1 및 D2) 유래의 동원된 PBMC 집단 및 동원되지 않은 PBMC 집단으로부터 수득된 림프구에서 T-세포 활성화의 특성분석을 보여준다. 각각의 마커에 대해, 컬럼은 좌측에서 우측으로, 정상 상태(SS) 비활성화, 동원된(Mob) 비활성화, SS 활성화, 및 Mob 활성화를 지칭한다.

도 8은 더 큰 공여자 코호트에 걸쳐 동원된 PBMC 집단 및 동원되지 않은 PBMC 집단으로부터 수득된 림프구에서 T-세포 활성화의 특성분석을 보여준다.

도 9는 항-CD33 CAR로 형질도입된 동원된(mob) 및 동원되지 않은(ss) PBMC-유도된 세포를 사용하는 세포독성 분석의 결과를 보여준다. 각 제제에 대해, 각각의 컬럼은 위에서 아래로, 사멸된 세포, 세포자멸사 세포 및 살아있는 세포에 상응한다.

도 10은 CD33-발현 표적 세포의 존재 및 부재 하에 동원된 및 비-동원된 PBMC-유도된 항-CD33 CAR 발현 세포 집단에서 TNF알파(TNFa+) 및 IFN감마(IFNg+) 발현의 세포 내 사이토카인 염색(ICS: intracellular cytokine staining) 분석을 보여준다. 각각의 조건에 대해, 컬럼은 좌측에서 우측으로, 자극 없음(No Stim), PMA/I, WT MOLM13, CD33KO MOLM13, 및 Jurkat 세포에 상응한다.

도 11은 CD33-발현 표적 세포의 존재 및 부재 시, 동원된 및 비-동원된 PBMC-유도된 항-CD33 CAR 발현 세포 집단에서 TNF알파(TNFa) 및 IFN감마(IFNg) 발현의 LUMINEX™ 분석 결과를 보여준다. 각각의 조건에 대해, 컬럼은 좌측에서 우측으로, 자극 없음(No Stim), PMA/I, WT MOLM13, CD33KO MOLM13, 및 Jurkat 세포에 상응한다.

도 12는 *생체 내* 마우스 모델에서 동원된 PBMC-유도된 항-CD33 CAR T 세포 및 비-동원된 PBMC-유도된 항-CD33 CAR T 세포의 세포독성 분석의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 임상적 사용을 위한 조혈 줄기 세포(HSC)는 성분채집술을 통한 조혈 줄기 세포 동원 후 공여자 대상체로부터 수득될 수 있다. 이러한 대상체로부터 수득된 성분채집술 샘플은 전형적으로 HSC의 분획, 예를 들어, 때때로 "표적 분획"으로도 지칭되는 CD34+ HSC, 및 줄기 세포가 아닌 세포의 분획, 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 때때로 "비-표적 분획"으로도 지칭되는 다른 세포를 포함한다. 일부 치료 접근법은, 비-악성 조혈 세포를 보

존하면서 악성 질환과 연관된 세포를 특이적으로 박멸하기 위해, 계통-특이적 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 림프구와 같은 면역치료제와 병용하여, 유전적으로 조작된 HSC, *예를 들어*, 계통-특이적 항원의 발현이 결여된 편집된 HSC를 사용한다. *예를 들어*, Borot 등의 Gene-edited stem cells enable CD33-directed immune therapy for myeloid malignancies PNAS 2019, 116(24):11978-11987; 및 국제 특허 출원 PCT/US16/057339호, 및 공개 WO 2017/066760호를 참조한다. 이러한 접근법에서, 대상체에게는 전형적으로 유전적으로 조작된 HSC를 포함하는 조혈 세포 이식(HCT)이 투여되고, 대상체에서 HSC가 성공적으로 생착된 후, 면역요법, 예를 들어, CAR-T 세포가 대상체에게 투여된다.

[0025] 본 개시내용은, 부분적으로, 동원된 림프구가 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)를 생산하는데 사용될 수 있는 발견에 관한 것이다. 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 및 유전적으로 조작된 림프구, 예를 들어, 동일한 대상체로부터 유래된, 예를 들어, 대상체로부터 유래된 동일한 혈액(예를 들어, 성분채집술) 샘플로부터 유래된 CAR 세포를 생산하는 것에 관한 조성물 및 방법이 제공되며, 따라서 공여자 대상체로부터의 단일 샘플로부터 치료를 위한 2개의 상이한 세포 집단을 효율적으로 제공한다. 본 개시내용은 부분적으로, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 CAR를 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포에 관한 것으로서, 상기 세포는 동원된 림프구(또는 동원된 림프구의 후손)이거나, 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 수득된 림프구(또는 이의 후손)이다. 또한 본원에는 상기 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 HSC, 예를 들어, 계통-특이적 항원의 발현이 결여되어 있는 것, 유전적으로 조작된 림프구, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 단일 성분채집술 샘플로부터 수득된, 계통-특이적 항원을 표적화하는 CAR를 발현하는 것)를 생산하고 이를 필요로 하는 대상체, 예를 들어 계통-특이적 항원의 발현을 특징으로 하는 암을 가진 대상체에게 투여하는 방법이 포함되며, 상기 계통-특이적 항원은 일부 비-악성 세포에서도 발현된다. 본 개시내용은 또한 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 생산 및/또는 투여하는 방법을 제공하며, 상기 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CAR에 의해 표적화되지 않는다.

[0026] *정의*

[0027] *항체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 표적 항원에 특이적 결합을 부여하기에 충분한 정규 면역글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 당 기술분야에 공지된 바와 같이, 자연에서 생산된 온전한(intact) 항체는 통상적으로 "Y-형" 구조라고 지칭되는 것으로 서로 연관되는 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드(각각 약 50 kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드(각각 약 25 kD)를 포함하는 전형적으로 대략 150 kD의 사량체 제제이다. 각각의 중쇄는 적어도 4개의 도메인(각각 약 110개 아미노산 길이) -아미노-말단 가변(VH) 도메인(Y 구조의 선단부에 위치함)을 포함하고, 이어서 3개의 불변 도메인을 포함한다: CH1, CH2, 및 카르복시-말단 CH3(Y의 줄기의 기저부에 위치함). "스위치"로 알려진 짧은 영역은 중쇄 가변 및 불변 영역을 연결한다. "힌지"는 CH2 및 CH3 도메인을 항체의 나머지 부분에 연결한다. 이러한 힌지 영역에서의 2개의 이황화 결합은 2개의 중쇄 폴리펩티드를 온전한 항체에서 서로 연결한다. 각각의 경쇄는 2개의 도메인-아미노-말단 가변(VL) 도메인에 이어서 카르복시-말단 불변(CL) 도메인을 포함하고, 서로로부터 다른 "스위치"에 의해 분리된다. 온전한 항체 사량체는 중쇄 및 경쇄가 단일 이황화 결합에 의해 서로 연결되는 2개의 중쇄-경쇄 이량체를 포함하고; 2개의 다른 이황화 결합은 중쇄 힌지 영역을 서로 연결시켜, 이량체가 서로 연결되고 사량체가 형성된다. 자연적으로 생산된 항체는 또한 전형적으로 CH2 도메인 상에서 전형적으로 글리코실화된다. 자연 항체에서의 각각의 도메인은 압축된 역평행 베타 배럴에서 서로에 대해 충진된 2개의 베타 시트(예를 들어, 3-, 4- 또는 5-가닥 시트)로 형성된 "면역글로불린 접힘"을 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각각의 가변 도메인은 "상보성 결정 영역"(CDR1, CDR2, 및 CDR3)으로 알려진 3개의 초가변 루프 및 4개의 다소 불변인 "프레임워크" 영역(FR1, FR2, FR3, 및 FR4)을 함유한다. 자연 항체가 접힐 때, FR 영역은 도메인에 대한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 시트를 형성하고, 중쇄 및 경쇄 둘 모두로부터의 CDR 루프 영역은 이들이 Y 구조의 선단부에 위치한 단일 초가변 항원 결합 부위를 생성하도록 3차원 공간에서 합쳐진다. 자연-발생 항체의 Fc 영역은 보체 시스템의 요소에 결합하고, 예를 들어, 세포독성을 매개하는 효과기 세포를 포함하는 효과기 세포 상의 수용체에도 결합한다. Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 친화도 및/또는 다른 결합 속성은 글리코실화 또는 다른 변형을 통해 조절될 수 있다. 일부 실시예에서, 본 발명에 따라 (예를 들어, CAR의 성분으로서) 생산되고/되거나 사용되는 항체는 변형되거나 조작된 글리코실화를 갖는 Fc 도메인을 포함하는, 글리코실화된 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 자연 항체에서 발견되는 바와 같은 충분한 면역글로불린 도메인 서열을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 복합체는, 이러한 폴리펩티드가 자연적으로 생산되는지(예를 들어, 항원에 반응하는 유기체에 의해 생성되는지), 또는 재조합적 조작, 화학적 합성 또는 다른 인공 시스템 또는 방법론에 의해 생성되는지의 여부에 상관없이, "항체"로서 지칭되고/지칭되거나 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 항체는 폴리클로날이다. 일부 실시예에서, 항체는 모노클로날이다. 일부 실시예에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류 또는 인간 항체의 특징적인 불변

영역 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 항체 서열 요소는 당 기술분야에 공지된 바와 같이 인간화, 영장류화, 키메라 등이다. 또한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 적절한 실시예에서 (달리 언급되거나 문맥으로부터 명백하지 않는 한) 대안적인 제시에서 항체 구조적 및 기능적 특징을 이용하기 위한 당 기술분야에 알려지거나 개발된 작제물 또는 포맷을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 본 발명에 따라 사용된 항체는 비제한적으로 온전한 IgA, IgG, IgE 또는 IgM 항체로부터 선택되는 포맷이고; 이-특이적 또는 다중-특이적 항체(예를 들어, Zybodies®, 등); 가장 넓은 의미로 본원에서 사용되는 것과 같은 항체 단편 및 비제한적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및/또는 항체 단편(바람직하게는 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 단편)을 포함하는 다양한 항체 구조를 포함한다. 본원에 기술된 항체는 면역글로불린, 중쇄 항체, 경쇄 항체, LRR-기반 항체, 또는 항체-유사 특성을 갖는 다른 단백질 스캐폴드, 및 예를 들어, Fab, Fab', Fab'2, Fab2, Fab3, F(ab')2 , Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, 단일 도메인 항체, 단일-사슬 항체, 디아바디, 트리바디, 테트라바디, 미니바디, 맥시바디, 탠다브(tandab), DVD, BiTe, TandAb, 등, 또는 이들의 임의의 조합을 비롯하여, 당 기술분야에 공지된 다른 면역학적 결합 모이어티일 수 있다. 상이한 부류의 항체의 서브유닛 구조 및 3차원 구성은 당 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시예에서, 항체는 자연적으로 생산될 경우 가질 수 있는 공유 변형(예를 들어, 글리칸의 부착)이 결여될 수 있다. 일부 실시예에서, 항체는 공유 변형(예를 들어, 글리칸의 부착, 페이로드(예를 들어, 검출가능한 모이어티, 치료 모이어티, 촉매 모이어티 등), 또는 다른 펜던트기(예를 들어, 폴리-에틸렌 글리콜 등)를 함유할 수 있다.

[0028] *항원-결합 단편*: "항원-결합 단편"은 항체가 결합하는 항원에 결합하는 항체의 일부를 지칭한다. 항체의 항원-결합 단편은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연적으로 발생하는, 효소적으로 수득가능한, 합성 또는 유전적으로 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 예시적인 항체 단편은 비제한적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디; 단일 도메인 항체; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자(예를 들어 scFv 또는 VHH 또는 VH 또는 VL 도메인 단독); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체의 항원-결합 단편은 scFv이다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 항체의 항원-결합 단편은 VHH 도메인 단독이다. 전체(full) 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일-특이적 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중특이적 항원-결합 단편은 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별도의 항원 또는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0029] *항체 중쇄*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체 중쇄"는 자연적으로 발생하는 형태에서 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 큰 것을 지칭한다.

[0030] *항체 경쇄*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체 경쇄"는 자연적으로 발생하는 형태에서 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 작은 것을 지칭한다.

[0031] *합성 항체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "합성 항체"는, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 박테리오파지에 의해 발현된 항체와 같은, 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되는 항체를 지칭한다. 이러한 용어는 또한 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 DNA 분자가 항체 단백질을 발현하는 항체 또는 항체를 지정하는 아미노산 서열을 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 상기 DNA 또는 아미노산 서열은 이용가능하고 당 기술분야에 잘 알려진 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득된 것이다.

[0032] *항원*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발할 수 있는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 항체 생산, 특이적 면역 능력이 있는 세포의 활성화, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 당 기술분야의 숙련자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 당 기술분야의 숙련자는, 면역 반응을 유도하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 본원에서 사용되는 용어인 "항원"을 암호화한다는 것을 이해할 것이다. 또한, 당 기술분야의 숙련자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 암호화될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 비제한적으로 하나 초과의 유전자에 대한 부분적인 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하며, 이들 뉴클레오티드 서열이 원하는 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것이 쉽게 명백하다. 또한, 당 기술분야의 숙련자는 항원이 "유전자"에 의해 전혀 암호화될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 합성되어 생성될 수 있거나 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다는 것은 쉽게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 비제한적으로 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있다.

[0033] *자가*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "자가(autologous)"는 나중에 동일한 개체로 재도입되기 위해 개체로

부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.

[0034] *동종*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "동종(allogeneic)"은 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질(예를 들어, 세포 집단)을 지칭한다.

[0035] *과증식성 질환(hyperproliferative disease)*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "과증식성 질환"은 비정상적인 세포의 신속하고 조절되지 않은 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 과증식성 질환은 양성 또는 악성 질환일 수 있다. 악성 질환은 전형적으로 악성 세포, 예를 들어, 암세포의 존재를 특징으로 한다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부위로 확산될 수 있다. 다양한 암의 예는 비제한적으로 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 대장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함한다. 특정 실시예에서, 과증식성 종양은 골수성 악성종양 또는 림프구 악성종양과 같은 조혈 악성종양이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 골수이형성 증후군이다.

[0036] *보존적 서열 변형*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 미치거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 변형은, 부위-지향 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발과 같은 당 기술분야에 공지된 표준 기술에 의해 다양한 실시예와 호환가능한 항체에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열이 당 기술분야에 정의되었다. 이들 계열은 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산을 포함한다. 따라서, 항체의 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 계열 유래의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 항체는 본원에 기술된 기능적 분석법을 사용하여 항원에 결합하는 능력에 대해 시험될 수 있다.

[0037] *공동-자극 리간드*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "공동-자극 리간드"는 항원 제시 세포(예를 들어, APC, 수지상 세포, B 세포 등) 상의 분자로서, 면역 세포(예를 들어, T 림프구) 상의 동족 공동-자극 분자에 특이적으로 결합하여, 증식, 활성화, 분화, 및 이와 유사한 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는 면역 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는 것을 지칭한다. 공동-자극 리간드는 비제한적으로 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD28, PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공동자극 리간드(ICOS-L), 세포간 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림포톡신 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제 또는 항체 및 B7-H3과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있다. 공동-자극 리간드는 또한, 특히, 면역 세포(예를 들어, T 림프구) 상에 존재하는 공동-자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대, 비제한적으로 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-결합된 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0038] *세포독성*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포독성인" 또는 "세포독성"은 사멸 또는 손상 세포를 지칭한다. 일 실시예에서, 대사적으로 강화된 세포의 세포독성이 개선되며, 예를 들어, 면역 세포(예를 들어, T 림프구)의 세포용해 활성이 증가된다.

[0039] *유효량*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에 기술된 바와 같은 "유효량"은 개체에서 신생물 질환, 예를 들어, 암을 예방하거나 치료하기에 적절한 용량을 지칭한다. 치료적 또는 예방적 사용에 효과적인 양은, 예를 들어, 치료 중인 질환 또는 장애의 단계 및 중증도, 환자의 연령, 체중, 및 전반적인 건강 상태, 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 용량의 크기는 또한 선택된 활성, 투여 방법, 투여 시기 및 빈도, 특정 활성의 투여를 수반할 수 있는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도, 및 원하는 생리학적 효과에 의해 결정될 것이다. 당 기술분야의 숙련자는 다양한 질병 또는 장애가 예를 들어 각각의 또는 다양한 투여 라운드에서, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이, 편집된 조혈 줄기 세포와 시간적으로 근접하여, 본 개시내용의 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)를 사용하여 다중 투여를 포함하는 연장된 치료를 필요로 할 수 있음을 이해할 것이다.

[0040] 본 발명의 목적을 위해, 투여되는 본원에 기술된 CAR 작제물을 포함하는 이종 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포의 양 또는 용량은 합리적인 시간 프레임에 걸쳐 대상체 또는 동물에서 치료 또는 예방 반응을 일으키기에 충분해야 한다. 예를 들어, 용량은 투여 시간으로부터 약 2시간 이상, 예를 들어, 약 12 내지 약 24시간 이상의 기간 내에 항원에 결합하거나 암을 검출, 치료 또는 예방하기에 충분해야 한다. 특정 실시예에서, 기간은

훨씬 더 길 수 있다. 용량은 본 개시내용의 특정한 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)의 효능 및 동물(예를 들어, 인간)의 상태뿐만 아니라 치료될 동물(예를 들어, 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.

[0041] *효과기 기능*: 본원에서 사용되는 바와 같이, "효과기 기능" 또는 "효과기 활성"은 면역 세포의 자극에 반응하여 면역 세포에 의해 수행되는 특이적 활성을 지칭한다. 예를 들어, T 림프구의 효과기 기능은 항원을 인식하고 항원을 발현하는 세포를 사멸시키는 것을 포함한다.

[0042] *내인성*: 본원에서 사용되는 바와 같이, "내인성"은 특정 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 유래되거나 그 내부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0043] *외인성*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "외인성"은 특정 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나 외부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0044] *확장*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "확장"은 세포, 예를 들어, 면역 세포, 예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포, 및/또는 조혈 세포의 수의 증가와 같이, 수의 증가를 지칭한다. 일 실시예에서, *생체 외*에서 확장된 면역 세포, 예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포, 및/또는 조혈 세포는 배양물에 원래 존재하는 수에 비해 수가 증가한다. 또 다른 실시예에서, *생체 외*에서 확장된 면역 세포, 예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포, 및/또는 조혈 세포는 배양물 중의 다른 세포 유형에 비해 수가 증가한다. 일부 실시예에서, 확장은 *생체* 내에서 발생할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "*생체 외*"는 살아있는 유기체(예를 들어, 인간)로부터 제거되고 유기체 외부(예를 들어, 배양 접시, 시험관, 또는 생물반응기)로 전파된 세포를 지칭한다.

[0045] *기능적인 부분*: 본원에서 사용되는 바와 같이, CAR과 관련하여 사용될 때, 용어 "기능적인 부분"은 본 발명의 CAR 작제물의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이러한 부분 또는 단편은 그것이 일부인 CAR 작제물(모 CAR 작제물)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적인 부분은, 예를 들어, 표적 세포를 인식하거나, 모 CAR 작제물과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로 암을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR 작제물의 부분을 포함한다. 모 CAR 작제물을 기준으로, 기능적인 부분은, 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 68%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0046] 기능적인 부분은 부분의 아미노 또는 카르복시 말단에, 또는 양 말단에 추가 아미노산을 포함할 수 있으며, 추가 아미노산은 모 CAR 작제물의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는, 추가 아미노산은 기능적인 부분의 생물학적 기능을 방해하지 않으며, 예를 들어, 표적 세포를 인식하거나, 암을 검출하거나, 암을 치료 또는 예방한다. 보다 바람직하게는, 추가 아미노산은 모 CAR 작제물의 생물학적 활성과 비교하여 생물학적 활성을 향상시킨다.

[0047] *기능적인 변이체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "기능적인 변이체"는 모 CAR 작제물에 대해 실질적인 또는 유의한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR 작제물, 폴리펩티드, 또는 단백질을 지칭하며, 이러한 기능적인 변이체는 변이체인 CAR의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적인 변이체는, 예를 들어, 모 CAR 작제물과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기술된 CAR 작제물(모 CAR 작제물)의 변이체를 포함한다. 모 CAR 작제물을 기준으로, 기능적인 변이체는, 예를 들어, 모 CAR 작제물에 대한 아미노산 서열에서 적어도 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 이상 동일할 수 있다. 기능적인 변이체는, 예를 들어, 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 기능적인 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR 작제물의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환이 기능적인 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비보존적 아미노산 치환은 기능적인 변이체의 생물학적 활성을 향상시킬 수 있어서, 기능적인 변이체의 생물학적 활성은 모 CAR 작제물과 비교하여 증가된다.

[0048] *gRNA*: 용어 "gRNA" 및 "가이드 RNA"는 전체적으로 상호교환적으로 사용되고, gRNA/Cas9 분자 복합체를 표적 핵산에 특이적으로 표적화하거나 귀소시키는 것을 촉진하는 핵산을 지칭한다. gRNA는 (단일 RNA 분자를 갖는) 단분자일 수 있고, 때때로 본원에서는 sgRNA로서 지칭되거나, 모듈화될 수 있다(하나를 초과하는, 전형적으로는 2개의 분리된 RNA 분자를 포함함). gRNA는 숙주 세포의 게놈에서 표적 도메인에 결합할 수 있다. gRNA(예를 들어, 이의 표적화 도메인)는 표적 도메인에 대해 부분적으로 또는 완전히 상보적일 수 있다. gRNA는 또한, (예를 들어, gRNA 서열의 표적화 도메인에 의해) gRNA 서열에 결합된 표적 도메인에 Cas9 분자를 동원하는 "스캐폴드 서열"(예를 들어, tracrRNA 서열)을 포함할 수 있다. 스캐폴드 서열은 적어도 하나의 줄기 루프 구조를 포함할 수 있고 엔도뉴클레아제를 동원한다. 예시적인 스캐폴드 서열은, 예를 들어 Jinek 등의 I (2012)

337(6096):816-821, Ran, 등의 *Nature Protocols* (2013) 8:2281-2308, PCT 공개 WO2014/093694호, 및 PCT 공개 WO2013/176772호에 언급된 것들을 포함한다.

[0049] *이종*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이종(heterologous)"은 살아있는 시스템, 예를 들어, 세포에서 발생하는 현상을 지칭하며, 이러한 현상은 그 시스템에서 자연적으로 발생하지 않는다. 예를 들어, 단백질이 그 세포에서 자연적으로 발생하지 않는(예를 들어, 세포가 그 단백질을 자연적으로 암호화하지 않는) 세포에서의 단백질의 발현은 단백질의 이종 발현일 것이다. 일부 실시예에서, 이종 핵산은 키메라 항원 수용체 작제물을 암호화한다.

[0050] *면역 세포*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 효과기 세포"와 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "면역 세포"는 면역 반응, 예를 들어 면역 반응의 촉진과 관련된 세포를 지칭한다. 면역 세포의 예는 비제한적으로 T-림프구, 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 호중구, 호산구, 비만 세포, 혈소판, 거대 과립 림프구, 랑게르한스 세포, 또는 B-림프구를 포함한다. 면역 세포(예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포)의 공급원은 대상체로부터 수득될 수 있다.

[0051] *면역 반응*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 림프구가 항원 분자를 외래로 식별하고 항체의 형성을 유도하고/하거나 림프구를 활성화하여 항원을 제거할 때 발생하는 항원에 대한 세포 및/또는 전신 반응을 지칭한다.

[0052] *동원된 세포/림프구*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "동원된 세포"는 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터의 혈액 샘플(예를 들어, 성분채집술 샘플)로부터 수득된 세포를 지칭한다. 대조적으로, "정상 상태 세포"는 조혈 줄기 세포 동원을 거치지 않은 대상체로부터의 혈액 샘플(예를 들어, 성분채집술 샘플)로부터 수득된 세포를 지칭한다. 예를 들어, 도 3e 및 3h에 도시된 바와 같이, 세포 유형 및 세포의 발달 상태의 상대적인 집단은 정상 상태와 동원된 샘플 사이에서 상이하다. 일부 실시예에서, 동원된 세포 집단은 정상 상태 세포 집단에 비해 더 높은 비율의 B 세포(B-림프구)를 포함한다. 일부 실시예에서, 동원된 세포 집단은 정상 상태 세포보다 낮은 비율의 T 세포(T-림프구)를 포함한다. 일부 실시예에서, 동원된 세포는 정상 상태 세포보다 더 높은 비율의 미처리 T 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 동원된 세포는 정상 상태 세포보다 중앙 기억 T 세포(TCM), 효과기 기억 T 세포(TEM), 또는 T-세포 효과기 중 1개, 2개, 또는 전부의 더 낮은 비율을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "동원된 림프구"는 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터 수득된 림프구(또는 이의 후손)를 지칭한다. 조혈 줄기 세포 동원 기술 및 프로토콜이 임상에서 일상적으로 사용되고, 본 개시내용의 측면에 따라 적합한 예시적인 기술 및 프로토콜은 에토포시드, 플레릭사포, 사이클로포스파미드, 및/또는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF)를 사용하는 프로토콜을 포함한다. 일부 예시적인 프로토콜이 본원에 제공되며, 추가의 적합한 프로토콜이 당 기술분야의 숙련자에게 명백해질 것이다. 일부 예시적인 적합한 프로토콜은 Albakri 등의, A Review of Advances in Hematopoietic Stem Cell Mobilization and the Potential Role of Notch2 Blockade, *Cell Transplant* 2020, 29:0963689720947146에 언급된 것들을 포함한다.

[0053] *핵산*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산"은 적어도 3개의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 일부 실시예에서, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 RNA를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 단일 가닥이다. 일부 실시예에서, 핵산은 이중 가닥이다. 일부 실시예에서, 핵산은 단일 및 이중 가닥 부분 둘 다를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 포스포디에스테르 연결을 포함하는 골격을 포함한다. 일부 실시예에서, 포스포디에스테르 및 비-포스포디에스테르 연결 모두를 포함하는 골격을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 핵산은, 예를 들어 "펩티드 핵산"에서와 같이, 하나 이상의 포스포로티오에이트 또는 5'-N-포스포라미디트 결합 및/또는 하나 이상의 펩티드 결합을 포함하는 골격을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 핵산은 천연 잔기(예를 들어, 아데닌, 시토신, 데옥시아데노신, 데옥시시티딘, 데옥시구아노신, 데옥시티미딘, 구아닌, 티민, 우라실) 중 하나 이상 또는 전부를 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의, 또는 모든 비-천연 잔기를 포함한다. 일부 실시예에서, 비-천연 잔기는 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3 -메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-요오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5 -프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-디아자아데노신, 7-디아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화된 염기, 인터칼레이팅된 염기, 및 이들의 조합)을 포함한다. 일부 실시예에서, 비-천연 잔기는 천연 잔기의 당과 비교하여 하나 이상의 변형된 당(예를 들어, 2'-플루오로리보스, 리보스, 2'-데옥시리보스, 아라비노스, 및 헥소스)을 포함한다. 일부 실시예에서, 핵산은 RNA 또는 폴리펩티드와 같은 기능적인 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 핵산은 하나 이상의 인트론을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 실시예에서, 핵산은 천연 공급원으로부터의 단리,

효소 합성(예를 들어, 상보적 주형을 기초, 예를 들어, 생체 내 또는 시험관 내, 재조합 세포 또는 시스템 내 복제, 또는 화학적 합성에 기초한 중합화에 의해)에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시예에서, 핵산은 적어도 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 또는 그 이상의 잔기 길이이다.

[0054] *단일 사슬 항체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단일 사슬 항체"는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 단편이 아미노산의 조작된 스팬을 통해 Fv 영역에 연결되는 재조합 DNA 기술에 의해 형성된 항체를 지칭한다. 미국특허 제4,694,778호; Bird (1988) Science 242:423-442; Huston 등의 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Ward 등의 (1989) Nature 334:54454; Skerra 등의 (1988) Science 242:1038-1041을 포함하여, 단일 사슬 항체를 생산하는 다양한 방법이 공지되어 있다.

[0055] *특이적으로 결합한다*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다"는 항체 제제 또는 키메라 항원 수용체의 일부와 같은 항원 결합 도메인에 대하여, 특이적 항원을 인식하지만, 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제를 지칭한다. 예를 들어, 하나의 종 유래의 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제는 또한 하나 이상의 종 유래의 해당 항원에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 종간 교차 반응성 자체는 특이적인 항원 결합 도메인 또는 항체 제제의 분류를 변경시키지 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제는 또한 항원의 상이한 대립유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성 자체는 항원-결합 도메인 또는 항체 제제의 분류를 특이적으로 변경시키지 않는다. 일부 경우에, 용어 "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합"은 항원 결합 도메인 또는 항체 제제, 단백질 또는 펩티드와 제2의 화학종의 상호작용을 참조하여 사용될 수 있으며, 이는 상호작용이 화학 종에 대한 특정 구조(예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미한다; 예를 들어, 항원 결합 도메인 또는 항체 제제는 일반적으로 단백질보다는 특정 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항원 결합 도메인 또는 항체 제제가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항원 결합 도메인 또는 항체 제제를 함유하는 반응에서 에피토프 A(또는 유리된, 표지되지 않은 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0056] *대상체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 유기체, 예를 들어, 포유동물(예를 들어, 인간, 비인간 포유동물, 비인간 영장류, 영장류, 실험 동물, 마우스, 랫트, 햄스터, 게르빌, 고양이, 또는 개)을 지칭한다. 일부 실시예에서, 인간 대상체는 성인, 청소년 또는 소아 대상체이다. 일부 실시예에서, 대상체는 질환, 장애 또는 병태, 예를 들어, 본원에서 제공된 바와 같이 치료될 수 있는 질환, 장애 또는 병태, 예를 들어, 본원에 열거된 암 또는 종양을 앓고 있다. 일부 실시예에서, 대상체는 질환, 장애 또는 병태에 감수성(susceptible)이고; 일부 실시예에서, 감수성 대상체는 질환, 장애 또는 병태의 발생에 대한 (기준 대상체 또는 집단에서 관찰된 평균 위험에 비해) 증가된 위험이 걸리기 쉽고/쉽거나 이를 나타낸다. 일부 실시예에서, 대상체는 질환, 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 일부 실시예에서, 대상체는 특정 증상(예를 들어, 질환의 임상적 발현) 또는 질환, 장애 또는 병태의 특성을 나타내지 않는다. 일부 실시예에서, 대상체는 질환, 장애 또는 병태의 임의의 증상 또는 특징을 나타내지 않는다. 일부 실시예에서, 대상체는 환자이다. 일부 실시예에서, 대상체는 진단 및/또는 요법이 투여되고/되거나 투여된 개체이다.

[0057] *표적*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표적"은 제공된 방법, 시스템, 및/또는 조성물의 대상인 신체 내의 세포, 조직, 장기, 또는 부위, 예를 들어 치료를 필요로 하거나, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 CAR에 의해 우선적으로 결합된 신체 내의 세포, 조직, 장기 또는 부위를 지칭한다.

[0058] *T 세포 수용체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 항원의 제시에 반응하여 T 세포의 활성화에 참여하는 막 단백질의 복합체(T-림프구로도 상호교환적으로 지칭됨)를 지칭한다. TCR은 주요 조직적합성 복합체 분자에 결합된 항원을 인식하는 역할을 한다. TCR은 알파(a) 및 베타(β) 사슬의 이종이량체를 포함하지만, 일부 세포에서는 TCR이 감마 및 델타 (γ/δ) 사슬을 포함한다. TCR은 구조적으로 유사하지만 구별되는 해부학적 위치 및 기능을 갖는 알파/베타 및 감마/델타 형태로 존재할 수 있다. 각각의 사슬은 2개의 세포외 도메인, 즉 가변 및 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TCR은, 예를 들어, 보조 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 자연 살해 T 세포, 및 감마 델타 T 세포를 포함하는 TCR을 포함하는 임의의 세포에서 변형될 수 있다. 일부 실시예에서, T-림프구는 알파/베타 T 림프구이다. 일부 실시예에서, T-림프구는 감마/델타 T 림프구이다.

[0059] *치료적*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적(therapeutic)"은 치료 및/또는 예방을 지칭한다. 치료 효과는 질환 상태의 억제, 관해, 또는 근절에 의해 수득된다.

[0060] *형질감염된*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 공정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 일차 대상 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0061] *트랜스진*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "트랜스진"은 핵산 서열이 자연적으로 발생하지 않는 세포, 예를 들어, 세포의 게놈에 포함된 외인성 핵산 서열을 지칭한다. 일부 실시예에서, 트랜스진은 유전자 산물, 예를 들어, CAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시예에서, 트랜스진은 발현 작제물, 예를 들어, 조절 요소, 예를 들어, 프로모터의 조절 하에 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다.

[0062] *치료하다*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징의 부분적 또는 완전한 완화, 개선, 발병 지연, 억제, 예방, 경감, 및/또는 발생률 및/또는 중증도의 감소를 지칭한다. 일부 실시예에서, 치료는 질환, 장애 및/또는 병태의 징후 또는 특징을 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다(예를 들어, 예방적일 수 있음). 일부 실시예에서, 치료는 질환, 장애 및/또는 병태의 초기 또는 경미한 징후 또는 특징만을 나타내는 대상체에게, 예를 들어 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 병리 발생 위험을 감소시키기 위한 목적으로 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 치료는 질환, 장애 또는 병태의 확립된 중증 및/또는 말기 징후를 나타내는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 치료는 CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포)를 포함하는 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계, 또는 유전적으로 조작된 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0063] *종양*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "종양"은 세포 또는 조직의 비정상적인 성장을 지칭한다. 일부 실시예에서, 종양은 전암성(예를 들어, 양성), 악성, 전-전이성, 전이성 및/또는 비전이성인 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 종양은 암과 관련되거나 암의 발현이다. 일부 실시예에서, 종양은 분산 종양 또는 액체 종양일 수 있다. 일부 실시예에서, 종양은 고형 종양일 수 있다.

[0064] *유전적으로 조작된 세포*

[0065] 본 개시내용의 일부 측면은 CAR을 암호화하는 트랜스진을 포함하는 이종 핵산을 포함하는 세포, 예를 들어, 동원된 림프구 또는 이의 후손, *예를 들어*, T-림프구, B-림프구, NK 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 세포 또는 이의 후손은 조혈 줄기 세포 동원 후 대상체로부터 수득된 림프구이다.

[0066] 일부 실시예에서, 트랜스진은 질환 또는 장애와 관련된 인간 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체, 예를 들어, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체를 암호화한다. 일부 실시예에서, CAR은 세포 유형 특이적 프로모터 또는 구성적 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 세포 유형 특이적 프로모터는 CD8 프로모터이다. 일부 실시예에서, 세포 유형-특이적 프로모터는 CD3델타 프로모터이다. 일부 실시예에서, 세포 유형-특이적 프로모터는 CD56 프로모터이다. 일부 실시예에서, 세포 유형-특이적 프로모터는 CD244 프로모터이다. 일부 실시예에서, 세포 유형-특이적 프로모터는 CD94 프로모터이다. 일부 실시예에서, 세포 유형-특이적 프로모터는 NKG2D 프로모터이다.

[0067] 일부 실시예에서, 트랜스진은 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 적어도 하나의 공동 자극 도메인, 세포질 신호전달 도메인, 또는 이들의 조합을 포함하는 키메라 항원 수용체를 암호화한다. 일부 실시예에서, 결합 도메인은 항원에 결합하는 항체 또는 항원-결합 항체 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 결합 도메인은 scFv 또는 항원에 결합하는 단일 도메인 항체를 포함한다. 일부 실시예에서, 항원은 계통-특이적 세포 표면 항원이다. 일부 실시예에서, 항원의 발현은 과증식성 질환과 연관된이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 골수성 악성종양 또는 림프구 악성종양과 같은 조혈 악성종양이다. 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원 CD33, CD123, CD19, CLL-1, CD30, CD38, BCMA, CD5, CD6, CD7, 또는 임의의 다른 계통-특이적 세포 표면 항원, 예를 들어 본원에 기술된 것들. 일부 실시예에서, CAR의 힌지 도메인은 CD8α(CD8알파) 힌지 도메인이다. 일부 실시예에서, CAR의 막관통 도메인은 CD8 또는 CD28 막관통 도메인이다. 일부 실시예에서, CAR의 공동자극 도메인은 4-1BB 또는 CD28 공동자극 도메인, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시예에서, CAR의 세포질 신호전달 도메인은 CD3ζ(CD3제타) 세포질 신호전달 도메인이다.

[0068] 일부 실시예에서, 세포는 림프구 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 T 림프구로도 지칭되는 T-세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 알파/베타 T-세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 감마/델타 T-세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 실시예에서, 세포는 자연 살해 T 세포(NKT 세포)이다. 일부 실시예에서, T 림프구는 미처리 T 림프구, 효과기 T 림프구, 기억 T 림프구, 또는 조절 T 림프구이다. 일부 실시예에서, 세포는 B 림프구로도 지칭되는 B 세포이다.

[0069] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 면역 효과기 세포는 CD3의 발현을 특징으로 할 수 있는(즉, CD3+) T 림프구이다. 일부 실시예에서, T 세포는 T 세포 수용체(TCR) α 및 β 사슬을 발현한다. 일부 실시예에서, T 세포는 TCR γ 및 δ 사슬을 발현한다. T-림프구는 기타 세포 표면 마커, 예를 들어 CD4 또는 CD8의 발현에 기초하여 추가로 분류될 수 있다. CD4 또는 CD8의 발현은 T 세포를 CD4의 발현을 특징으로 하는(CD4+) "T 헬퍼 세포"로서 또는 CD8의 발현을 특징으로 하는(CD8+) "세포독성 T 세포"로서 광범위하게 분류한다. 당 기술분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 구별되는 세포 기능을 갖는다. 일부 실시예에서, T 세포는 CD4+ T 세포이며, Th1 또는 Th2 CD4+ 세포로서 추가로 구별될 수 있다. 일부 실시예에서, T 세포는 CD8+ T 세포(세포 독성 T 림프구, CTL; CD8 T 세포로도 지칭됨)이다.

[0070] 일부 실시예에서, T-세포는 세포독성 T 세포이다. 일부 실시예에서, T-세포는 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 줄기-세포-유사 기억 T 세포(또는 줄기-유사 기억 T 세포), 및 효과기 기억 T 세포, 예를 들어, TEM 세포 및 TEMRA(CD45RA+) 세포, 효과기 T 세포, 또는 T 헬퍼 세포, 예를 들어, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포 헬퍼) 세포, T 조절 세포(Tregs, FoxP3+ T 세포), 자연 살해 T 세포(NKT 세포), 점막 관련 불변 T 세포(MAIT), 및 γδ T 세포이다. 일부 실시예에서, T 세포는 PD1과 같은 세포 사멸 리간드를 발현한다. 일부 실시예에서, PD1을 발현하는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포는 "탈진된(exhausted)" T 세포로 간주되며 면역 억제를 촉진한다.

[0071] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 면역 효과기 세포는 CD19(즉, CD19+)의 발현을 특징으로 할 수 있는 T 림프구이다. 일부 실시예에서, 본원에 제공된 면역 효과기 세포는 NK 세포이며, 이는 CD56의 발현(즉, CD56+)을 특징으로 할 수 있다.

[0072] 일부 실시예에서, 본 개시내용의 세포는 동원된 림프구이다. 일부 실시예에서, 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 세포, 예를 들어, 동원된 림프구는 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터 수집된다. 일부 실시예에서, 본 개시내용의 세포는 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 예를 들어, 림프구이다. 조혈 줄기 세포 동원은 대상체가 일반적으로 골수 내에 국소화된 세포(*예를 들어*, 조혈 줄기 세포)의 동원을 촉진하는 동원제에 노출되어 말초 순환계 내로 이동함으로써, 혈액 샘플, 예를 들어 성분채집술 샘플을 채취하여 줄기 세포를 수확할 수 있게 하는 과정이다. 예를 들어, Karpova D, Rettig MP, DiPersio JF. Mobilized peripheral blood: an updated perspective. F1000Res. 2019;8:F1000 Faculty Rev-2125. Published 2019 Dec 20. doi:10.12688/f1000research.21129.1을 참조한다. 일부 실시예에서, 조혈 줄기 세포 동원은 에토포시드, 플레릭사포, 사이클로포스파미드, 및/또는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF) 중 하나 이상을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 조혈 줄기 세포 동원은 대상체에서 조혈 줄기 세포 집단의 확장을 포함한다. 일부 실시예에서, 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터 수집된 혈액 샘플(예를 들어, 성분채집술 샘플)은 조혈 줄기 세포 동원을 거치지 않은 정상 상태 대상체로부터 수집된 혈액 샘플(예를 들어, 성분채집술 샘플)과 비교하여 상이한 상대적 세포 유형 비율(예를 들어, 총 세포 수에 상대적)을 포함한다.

[0073] 일부 실시예에서, 조혈 줄기 세포 동원을 거친 대상체로부터의 혈액 샘플은 동원된 림프구(예를 들어, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 CAR을 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포를 생성하기 위함) 및 HSC(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 유전적으로 조작된 HSC를 생성하기 위함)를 공급할 수 있다. 조혈 줄기 세포 동원 및 HSC를 수득하는 방법은, 예를 들어, 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 PCT 출원 번호 US2016/057339호에 기술되어 있다.

[0074] 일부 실시예에서, 포유류 대상체는 비인간 영장류, 설치류(예를 들어, 마우스 또는 랫트), 소, 돼지, 말 또는 가축이다. 일부 실시예에서, 동원된 림프구 및/또는 HSC는 조혈 악성종양을 가진 인간 대상체와 같은 인간 대상체로부터 수득된다. 일부 실시예에서, 동원된 림프구 및/또는 HSC는 건강한 공여자로부터 수득된다. 일부 실시예에서, 동원된 림프구 및/또는 HSC는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 후속하여 투여될 대상체로부터 수득된다. 세포가 수득된 동일한 대상체에게 투여되는 동원된 림프구는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 수득되는 동원된 림프구는 동종 세포로서 지칭된다.

[0075] 세포 또는 세포 유형의 특정 집단은 동원된 림프구 세포의 집단으로부터 단리될 수 있다. 일부 실시예에서, T

세포는 상업적으로 이용가능한 단리 방법을 포함하여 당 기술분야에 잘 알려진 방법에 의해 단리된다(예를 들어, Rowland-Jones 등의 Lymphocytes: A Practical Approach, Oxford University Press, New York (1999)를 참조한다). T 세포 분리 및 단리 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, T 세포는 원하는 T-세포 하위 유형에 따라 다양한 세포 표면 마커 또는 마커 조합(양성 및 음성 선택 포함)을 사용하여 단리될 수 있으며, 당 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 비제한적으로 CD3, CD4, CD8, CD34(조혈 줄기 및 전구 세포의 경우) 등을 포함하는 것 등은 세포를 분리하는 데 사용될 수 있다(Kearse, T Cell Protocols: Development and Activation, Humana Press, Totowa N.J. (2000); De Libero, T Cell Protocols, Vol. 514 of Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa N.J. (2009); Su 등, Methods Mol. Biol. 806:287-299 (2012); Bluestone 등, Sci. Transl. Med. 7(315) (doi: 10.1126/scitranslmed.aad4134)(2015); Miyara 등, Nat. Rev. Rheumatol. 10:543-551 (2014); Liu 등, J. Exp. Med. 203:1701-1711 (2006); Seddiki 등, J. Exp. Med. 203:1693-1700 (2006); Ukena 등, Exp. Hematol. 39:1152-1160 (2011); Chen 등, J. Immunol. 183:4094-4102 (2009); Putnam 등, Diabetes 58:652-662 (2009); Putnam 등, Am. Tranplant. 13:3010-3020 (2013); Lee 등, Cancer Res. 71:2871-2881 (2011); MacDonald 등, J Clin. Invest. 126:1413-1424 (2016) 참조). 조절 T 세포를 단리하고 확장하는 방법도 또한 상업적으로 이용가능하다(예를 들어, BD Biosciences, 캘리포니아주 산 요새 소재; STEMCELL Technologies Inc., 캐나다 밴쿠버 소재; eBioscience, 캘리포니아주 샌디에고 소재; Invitrogen, 캘리포니아주 칼즈배드 소재 참고).

[0076] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 세포(또는 이의 후손)는, 예를 들어, CAR을 암호화하는 이종 핵산과 접촉된 후, 다시 이들이 투여되는 대상체에게 자가이다. 일부 실시예에서, 세포는, 예를 들어, CAR을 암호화하는 이종 핵산과 접촉된 후, 이들이 투여되는 대상체에 대해 동종인, 비-자가이다.

[0077] 일부 실시예에서, 동원된 세포(*예를 들어*, 동원된 림프구)는 CAR을 발현하도록 유전적으로 조작된 대상체로부터 수득된 다음 동일한 대상체에게 다시 투여된다. 일부 실시예에서, 동원된 세포(*예를 들어*, 동원된 림프구)는 CAR을 발현하도록 유전적으로 조작된 대상체로부터 수득된 다음, 상이한 대상체, 예를 들어, HLA-일치된 대상체에게 투여된다.

[0078] CAR의 재조합 발현에 사용될 수 있는 세포 집단(*예를 들어*, 동원된 PBMC)으로부터 특정 세포 유형(*예를 들어*, T-림프구, B-림프구, NK 세포)을 단리하기 위한 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있으며, 이는 비제한적으로 당 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어, Sadelain 등의 Nat. Rev. Cancer 3:35-45 (2003); Morgan 등의 Science 314:126-129 (2006), Panelli 등의 J Immunol. 164:495-504 (2000); Panelli 등의 J Immunol. 164:4382-4392 (2000)), Dupont 등의 Cancer Res. 65:5417-5427 (2005); Papanicolaou 등의 Blood 102:2498-2505 (2003))을 포함한다.

[0079] 본원에 제공된 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 CAR을 암호화하는 이종 핵산을 세포에 전달하는 것은 임의의 적절한 방법 또는 기술을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터 시스템은 성숙한 세포에 핵산을 도입하는데 특히 적합하지만, 다른 전달 방식도 사용될 수 있다. 표적화된 통합을 생성하는 다른 방법은 당 기술분야에 공지되어 있으며, 비제한적으로 숙주 세포의 게놈 내로의 통합을 위한 부위 특이성 또는 부위 선호도를 나타내는 트랜스포존 또는 바이러스 벡터(예를 들어, AAV 벡터)의 사용을 포함한다. 세포-유형 특이적 유도성 발현 시스템을 전달하는 일부 예시적인 방법이 본원에 제공되지만, 본 개시내용 및 당 기술분야에 대한 지식에 기초하여 추가의 적절한 시스템이 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 본 개시내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다.

[0080] *발현 작제물*

[0081] 효과기 림프구에서, 예를 들어, T-림프구, B-림프구, 또는 NK 세포에서 키메라 항원 수용체를 발현하기에 적합한 발현 작제물은 당 기술분야에 잘 알려져 있다. 일부 예시적인 발현 작제물이 본원에 제공되며, 당 기술분야의 숙련자는 추가의 적합한 작제물을 알게 될 것이다. 일반적으로, 적합한 발현 작제물은 이종 프로모터의 조절하에 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 것이다. 일부 실시예에서, 프로모터는 구성적으로 활성인 프로모터이다. 일부 실시예에서, 프로모터는 세포-유형-특이적 프로모터이다. 일부 실시예에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일부 실시예에서, 발현 작제물은, 예를 들어, 폴리아데닐화 신호, 5' UTR 및/또는 3' UTR 서열, 인트론 서열과 같은 추가 요소를 포함한다. 림프구와 같은 표적 세포에 대한 발현 작제물의 전달 경로에 따라, 발현 작제물은 추가 요소, 예를 들어, 바이러스 전달의 경우에 바이러스 포장 및 통합 요소를 포함할 수 있다.

[0082] 본 개시내용의 일부 측면은 특정 세포 유형에서 트랜스진, 예를 들어 CAR을 발현하는데 유용한 이종 핵산 및 이의 발현 작제물을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용의 일부 측면은 특정 세포 유형 또는 하위 유형(예를 들어,

T 림프구, 프리(pre)-T 세포, 성숙 T 림프구, NK 세포, B 림프구 등)에서만 활성인 발현 작제물을 제공한다. 일부 실시예에서, 세포 유형 특이적 및 유도성 발현은, 예를 들어, 조절 요소, 예를 들어, 각각의 세포 유형에서만 활성인 프로모터의 제어 하에 예를 들어, 유도성 시스템의 성분 중 하나를 배치함으로써, 세포 유형-특이적 방식으로 유도성 발현 시스템을 발현함으로써 달성된다.

[0083] 일부 실시예에서, CAR을 발현시키기 위한 프로모터는 세포-유형 특이적 프로모터의 제어 하에 있으며, 이러한 프로모터는 하나의 특이적 세포 유형에서, 예를 들어, T-림프구, B-림프구, NK 세포에서, 또는 세포의 특이적 하위 군, 예를 들어, 림프구에서 발현되지만, 특이적 세포 유형 이외의 세포에서 발현되지 않는다.

[0084] 일부 실시예에서, CAR은 질환 또는 장애, 예를 들어, 과증식성 질환 또는 장애와 관련된 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0085] 일부 실시예에서, CAR은 1세대 CAR이다. 일부 실시예에서, CAR은 2세대 CAR이다. 일부 실시예에서, CAR은 3세대 CAR이다. 일부 실시예에서, CAR은 4세대 또는 5세대 CAR, 또는 장갑(armored) CAR이다. 예시적인 CAR 작제물이 본원에 제공되며, 본 개시내용 및 당 기술분야에 대한 지식에 기초하여 추가의 적합한 CAR 작제물이 당 기술분야의 숙련자에게 명백해질 것이다. 현재 제공된 발현 시스템과 관련하여 사용하기에 적합한 다양한 CAR 골격 또는 프레임워크의 예시를 위해, 다음의 예시 및 비제한적인 간행물을 참조한다: Sadelain 등의 *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013); Jensen 등의 *Immunol. Rev.* 257:127-133 (2014); Sharpe 등의 *Dis. Model Mech.* 8(4):337-350 (2015); Brentjens 등의 Clin. Cancer Res. 13:5426-5435 (2007); Gade 등의 Cancer Res. 65:9080-9088 (2005); Maher 등의 Nat. Biotechnol. 20:70-75 (2002); Kershaw 등의 J. Immunol. 173:2143-2150 (2004); Sadelain 등의 Curr. Opin. Immunol. (2009); Hollyman 등의 J. Immunother. 32:169-180 (2009)).

[0086] 1세대 CAR은 일반적으로 막관통 도메인에 융합되는 세포외 항원 결합 도메인, 예를 들어 단일-사슬 가변 단편(scFv)으로 구성되어 있으며, 이는 세포질/세포 내 T 세포 수용체 사슬의 도메인에 융합된다. 전형적으로, 1세대 CAR은 내인성 T 세포 수용체(TCR)로부터 신호를 전달하는 CD3ζ의 세포 내 도메인을 포함한다. "1세대" CAR은 새로운 항원 인식을 제공할 수 있으며 HLA-매개 항원 제시와 독립적으로 단일 융합 분자에서 CD3ζ 사슬 신호전달 도메인을 통해 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두의 활성화를 유발할 수 있다.

[0087] 2세대 CAR은 T 세포를 활성화할 수 있는 세포 내 신호전달 도메인에 융합된 항원-결합 도메인과 T 세포 효능 및 지속성을 증가시키도록 설계된 공동-자극 도메인을 포함한다. 예를 들어, Sadelain 등의 Cancer Discov. 3:388-398, 2013을 참조한다. 제2세대 CAR은 CD3ζ 도메인, 예를 들어, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, 또는 유사한 공동-자극 도메인 외에 세포 내 공동-자극 도메인을 포함한다. 따라서, 2세대 CAR은, 예를 들어, CD28 또는 4-1BB 도메인에 의한 공동-자극, 및 예를 들어, CD3ζ 신호전달 도메인에 의한 활성화 둘 모두를 제공한다. 2세대 CAR은 1세대 CAR에 비해 T 세포의 항-종양 활성을 개선할 수 있다.

[0088] 제3세대 CAR은, 하나 초과의 공동-자극 도메인, 예를 들어, 2개의 공동자극 도메인, 예를 들어 CD28 및 4-1BB 도메인 둘 모두를 포함하고, 예를 들어, CD3ζ 활성화 도메인을 포함함으로써, 활성화 도메인을 포함한다.

[0089] 일반적으로, CAR은 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포 내 도메인을 포함한다. 일반적으로, 항원 결합 도메인은 관심 항원, 예컨대, 질환 또는 장애, 예를 들어, 신생물 또는 악성 질환 또는 장애와 관련된 항원에 결합한다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인은 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 단일 사슬 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인은 scFv를 포함한다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인은 단일 도메인 항체, 예를 들어, 낙타과 항체, 또는 이의 인간화된 유도체를 포함한다. 일부 실시예에서, 항원-결합 도메인은 수용체 또는 수용체 리간드를 포함한다.

[0090] 본원에 개시된 발현 시스템에 사용하기 위한 일부 예시적인 CAR이 본원에 제공된다. 추가적인 CAR은 CAR의 설계에 관한 당 기술분야의 지식을 고려하여 본 개시내용에 기초한 숙련된 기술자에게 명백할 것이며, 예를 들어 Sadelain 등의 *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013); Jensen 등의 *Immunol. Rev.* 257:127-133 (2014); Sharpe 등의 *Dis. Model Mech.* 8(4):337-350 (2015), 및 그에 인용된 참고문헌에 예시된 바와 같다.

[0091] 일부 실시예에서, 본 발명에 사용하기 위한 CAR은, 예를 들어, 과증식성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 신생물 세포 또는 악성 세포의 표면에 발현된 계통-특이적 세포 표면 항원에 결합한다. 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 병원성 또는 병리학적 세포, 예를 들어, 감염원에 의해 감염된 세포, 또는 병원성 또는 병리학적 상태를 특징으로 하는 세포의 표면에 발현되거나 존재하는 계통-특이적 세포 표면 항원에 결합한다. 일부

실시예에서, 항원 결합 도메인은 scFv 또는 Fab, 단일 도메인 항체, 또는 항체의 임의의 적합한 항원 결합 단편일 수 있다(Sadelain 등의 Cancer Discov. 3:38-398 (2013)을 참조한다).

[0092] 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 인간, 인간화, 키메라, 또는 CDR-이식 항체, 또는 항원-결합 항체 단편의 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항원 결합 도메인은 scFv를 포함한다. 예시적인 scFv가 본원에 제공되며, 추가적인 적합한 scFv는 scFv와 관련된 기술 분야의 지식 및 본 개시내용에 기초하여 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다(예를 들어, Huston, 등의 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Ahmad 등의 Clin. Dev. Immunol. 2012: ID980250 (2012); 미국 특허 제5,091,513호, 제5,132,405호 및 제4,956,778호; 및 미국 특허 공개 제20050196754호 및 제20050196754호를 참조한다)). 본 개시내용은 본 측면에서 제한되지 않는다.

[0093] 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인을 사용하는 것에 대안적으로, CAR 세포외 도메인은 수용체의 리간드 또는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함할 수 있다(Sadelain 등의 Cancer Discov. 3:388-398 (2013); Sharpe 등의 Dis. Model Mech. 8:337-350 (2015)를 참조한다).

[0094] 일부 실시예에서, CAR은 악성 세포에서 발현된 항원에 결합하는데, 이는 때때로 암 항원으로도 지칭된다. 적합한 암 항원을 표적화하는 임의의 CAR은 현재 개시된 발현 시스템의 맥락에서 사용될 수 있다. 예시적인 암 항원 및 예시적인 암이 아래에 제공된다:

[0095] 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원은 다음으로부터 선택된다: CD5, CD6, CD7, CD13, CD19, CD22, CD20,CD25, CD30, CD32, CD38, CD44, CD45, CD47, CD56, 96, CD117, CD123, CD135,CD174, CLL-1, BCMA, 엽산 수용체 β, IL1RAP, MUC1, NKG2D/NKG2DL, TIM-3, 또는 WT1.

[0096] 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원은 CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32a, CD32b, CD32c, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66F, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75S, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85C, CD85D, CD85E, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD14, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD152, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b1, CD158b2, CD158d, CD158e1/e2, CD158f, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210a, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD272, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362 또는 CD363으로부터 선택된다.

[0097] 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원은 아래에 열거된 것들로부터 선택된다: CD5, CD6, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, 메조텔린

(MSLN), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선 줄기 세포 항원(PCSA), 탄산무수화효소 IX(CAIX), 암태아성 항원(CEA), 상피 당단백질2(EGP 2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 엽산-결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 엽산 수용체-α 및 β(FRα 및 β), 강글리오시드 G2(GD2), 강글리오시드 G3(GD3), 인간 상피 성장 인자 수용체 2(HER-2/ERB2), 상피 성장 인자 수용체 vIII(EGFRvIII), ERB3, ERB4, 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2(IL-13Rα2), κ-경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체(KDR), 루이스 A(CA19.9), 루이스 Y(LeY), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 흑색종-관련 항원 1(흑색종 항원 계열 A1, MAGE-A1), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NKG2D 리간드, 암-고환 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원(h5T4), 종양-관련 당단백질 72(TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF-R2), 빌름스 종양 단백질(WT-1), 1형 티로신-단백질 키나제 막관통 수용체(ROR1), B7-H3(CD276), B7-H6(Nkp30), 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸-4 (CSPG4), DNAX 부속 분자(DNAM-1), 에프린 A형 수용체 2(EpHA2), 섬유아세포 관련 단백질(FAP), Gp100/HLA-A2, 글리피칸 3(GPC3), HA-1H, HERK-V, IL-11Rα, 잠재 막 단백질 1(LMP1), 신경 세포-부착 분자(N-CAM/CD56), 및 트레일 수용체(TRAIL R). 이들 또는 다른 암 항원이 암 항원 CAR에 의한 표적화를 위해 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 일부 예시적인 적합한 CAR 및 일부 예시적인 적합한 CAR 표적 항원이 본원에 개시되지만, CAR 및 CAR 항원에 관한 당 기술분야에서의 지식의 관점에서 본 개시내용에 기초하여 추가의 적합한 CARS 및 CAR 표적 항원이 당 기술분야의 숙련자에게 명백해질 것이다. 예를 들어, 국제 PCT 출원 PCT/US2017/027601호를 참조하고, 그 내용 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 일부 실시예에서, CAR은 본원에 개시된 계통-특이적 세포 표면 항원에 결합한다.

[0098] *유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포*

[0099] 본 개시내용의 일부 측면은 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현 또는 발현 상실, 또는 계통-특이적 세포 표면을 표적화하는 CAR에 의해 인식되지 않는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태의 발현을 감소시키도록 유전적으로 편집된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 이식의 형태로 대상체에게 투여된다.

[0100] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 줄기 세포는 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현 상실, 또는 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 CAR에 의해 인식되지 않는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태의 발현을 초래하는 게놈 변형을 포함하고, 외인성 단백질을 암호화하는 발현 작제물을 포함하지 않으며, 예를 들어, CAR을 암호화하는 발현 작제물을 포함하지 않는다.

[0101] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 계통-특이적 세포 표면 항원 단백질을 실질적으로 발현하지 않으며, 예를 들어, 면역염색 방법과 같은 적합한 방법에 의해 측정될 수 있는 계통-특이적 세포 표면 항원 단백질을 발현하지 않는다. 일부 실시예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 야생형의 계통-특이적 세포 표면 항원 단백질을 실질적으로 발현하지 않으나, 돌연변이 계통-특이적 세포 표면 항원 변이체, 예를 들어 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체, 예를 들어 CAR-발현 세포, 또는 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 항체, 항체 단편 또는 항체-약물 접합체(ADC)를 발현한다. 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원은 본원에 기술된 계통-특이적 세포 표면 항원 중 어느 하나이다.

[0102] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포이다. 조혈 줄기 세포(HSC)는 일반적으로 골수성 세포(예를 들어, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호염기구, 수지상 세포, 적혈구, 혈소판 등) 및 림프구 세포(예를 들어, T 세포, B 세포, NK 세포) 각각을 추가로 생성하는 골수성 및 림프구 전구 세포 모두를 생성할 수 있다. HSC는 HSC의 식별 및/또는 단리에 사용될 수 있는 세포 표면 마커 CD34(예를 들어, CD34+)의 발현, 및 세포 계통에 대한 약속과 관련된 세포 표면 마커의 부재를 특징으로 한다.

[0103] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포의 집단은 복수의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포의 집단은 복수의 유전적으로 조작된 조혈 전구 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 줄기 세포의 집단은 복수의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 및 복수의 유전적으로 조작된 조혈 전구 세포를 포함한다.

[0104] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 HSC는 인간 대상체와 같은 대상체로부터 수득된다. HSC를 수득하는 방법은, 예를 들어, 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 PCT 출원 번호 US2016/057339호에 기술되어 있다. 일부 실시예에서, HSC는 동원제, *예를 들어*, 에토포시드, 플레릭사포, 사이클로포스파미드, 및/또는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF)의 투여에 의해 대상체의 골수로부터 동원된다. 일부 실시예에서, HSC는 조혈 악성종양을

가진 인간 대상체와 같은 인간 대상체로부터 수득된다. 일부 실시예에서, HSC는 건강한 공여자로부터 수득된다. 일부 실시예에서, HSC는 동원된 림프구가 수득된 것과 동일한 대상체로부터 수득된다. 일부 실시예에서, HSC는 CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 세포가 후속하여 투여될 대상체로부터 수득된다. 일부 실시예에서, HSC는 CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 세포가 후속하여 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 수득된다. 세포가 수득된 동일한 대상체에게 투여되는 HSC는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 수득되는 HSC는 동종 세포로서 지칭된다.

[0105] 일부 실시예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포의 집단은 세포의 이종 집단, 예를 들어, 계통-특이적 세포 표면 항원에 상이한 돌연변이를 함유하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포의 이종 집단이다. 일부 실시예에서, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 집단에서 계통-특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 유전자의 사본은 예를 들어, 본원에 제공된 gRNA를 사용하는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 본원에 설명된 게놈 편집 접근법에 의해 영향을 받는 돌연변이를 포함한다.

[0106] 일부 실시예에서, 예를 들어 본원에 기술된 유전적으로 조작된 조혈 세포, 예를 들어, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 유전적으로 조작된 면역 효과기 세포)는 게놈 편집 기술을 통해 생성되었으며, 이는 "편집"이라고도 지칭되는 표적화된 변화를 세포의 게놈에 도입할 수 있는 모든 기술을 포함한다.

[0107] 조혈 줄기 및/또는 전구 세포 및 면역 효과기 세포를 유전적으로 조작하는 방법은 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 조혈 줄기 및/또는 전구 세포를 유전적으로 조작하는 예시적인 방법은 PCT 공개 번호 WO 2017/066760호 및 WO 2020/047164호에 제공되어 있다. 하나의 예시적인 적합한 게놈 편집 기술은 "유전자 편집"이며, 이는 세포의 게놈에 표적화된 단일- 또는 이중-가닥 DNA 절단을 도입하기 위해 RNA-가이드 뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 사용하는 것을 포함하며, 이는 예를 들어 비상동 말단 접합(NHEJ: nonhomologous end joining), 미세상동성-매개 말단 접합(MMEJ: microhomology-mediated end joining, 또한 종종 "대안적인 NHEJ" 또는 "alt-NHEJ"로도 지칭됨), 또는 전형적으로 뉴클레아제 절단 부위 또는 뉴클레아제 절단 부위에 바로 근접하여 변경된 핵산 서열을 생성하는(예를 들어, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 서열 삽입, 결실, 전도, 또는 치환을 통해) 상동성-지시된 수선(HDR: homology-directed repair)와 같은 세포 수선 기작을 유발한다. Yeh 등의 Nat. Cell. Biol. (2019) 21: 1468-1478; 예를 들어, Hsu 등의 Cell (2014) 157: 1262-1278; Jasin 등의 DNA Repair (2016) 44: 6-16; Sfeir 등의 Trends Biochem. Sci. (2015) 40: 701-714를 참조한다.

[0108] 또 다른 예시적인 적합한 게놈 편집 기술은 "염기 편집"이며, 이는 염기 편집기, 예를 들어, 특정 핵염기, 예를 들어 C 또는 A 뉴클레오티드의 시토신 또는 아데노신 핵염기를 표적으로 하고 탈아미노화하는 디아미나제에 융합된 뉴클레아제-손상 또는 부분적 뉴클레아제-손상 RNA-유도된 CRISPR/Cas 단백질의 사용을 포함하며, 이는 세포 불일치 복구 메커니즘을 통해, C 뉴클레오티드에서 T 뉴클레오티드로의 변화 또는 A 뉴클레오티드에서 G 뉴클레오티드로의 변화를 초래한다. 예를 들어, Komor 등의 Nature (2016) 533: 420-424; Rees 등의 Nat. Rev. Genet. (2018) 19(12): 770-788; Anzalone 등의 Nat. Biotechnol. (2020) 38: 824-844를 참조한다;

[0109] 또 다른 예시적인 적합한 게놈 편집 기술은 "프라임 편집"을 포함하며, 이는 조작된 역전사효소(RT) 도메인에 융합된 CRISPR/Cas 뉴클레아제와 같은 촉매적으로 손상되거나 부분적으로 촉매적으로 손상된 RNA-가이드 뉴클레아제를 사용하여 특이적으로 표적화된 게놈 부위에 새로운 유전 정보, 예를 들어 변경된 뉴클레오티드 서열을 도입하는 것을 포함한다. Cas/RT 융합은 원하는 편집을 암호화하는 핵산 서열을 또한 포함하고, RT를 위한 프라이머로서 작용할 수 있는 가이드 RNA에 의해 게놈 내의 표적 부위에 표적화된다. 예를 들어, Anzalone 등의 Nature (2019) 576 (7785): 149-157을 참조한다.

[0110] 게놈 편집 기술의 사용은 일반적으로 적합한 RNA-가이드 뉴클레아제를 사용하는 것을 특징으로 하며, 이는, 일부 실시예에서, 예를 들어, 염기 편집 또는 프라임 편집을 위해, 촉매적으로 손상되거나, 부분적으로 촉매적으로 손상될 수 있다. 적합한 RNA-가이드 뉴클레아제의 예는 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포의 방법에 사용하기 위한 적합한 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제, 예를 들어, SpCas9 또는 SaCas9 뉴클레아제이다. 다른 예를 들어, 일부 실시예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포의 방법에 사용하기 위한 적합한 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas12 뉴클레아제, 예를 들어, Cas12a 뉴클레아제이다. 예시적인 적합한 Cas12 뉴클레아제는, 비제한적으로 AsCas12a, FnCas12a, 기타 Cas12a 오르토로그, 및 Cas12a 유도체, 예를 들어 MAD7 시스템(MAD7TM, Inscripta, Inc.), 또는 Alt-R Cas12a(Cpf1) Ultra 뉴클레아제(Alt-R® Cas12a Ultra; Integrated DNA Technologies, Inc.)를 포함한다. 예를

들어, Gill 등의 LIPSCOMB 2017. In United States: Inscripta Inc.; Price 등의 Biotechnol. Bioeng. (2020) 117(60): 1805-1816을 참조한다;

[0111] 일부 실시예에서, 예를 들어, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 유전적으로 조작된 면역 효과기 세포)와 같은 유전적으로 조작된 조혈 세포는, RNA-가이드 뉴클레아제가 표적 부위에 결합하고 세포의 게놈 DNA를 절단하기에 적합한 조건 하에 RNA-가이드 뉴클레아제, 예를 들어, CRISPR/Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제 또는 Cas12a 뉴클레아제와 같은 것들이 RNA-가이드 뉴클레아제를 세포의 게놈 내의 적합한 표적 부위로 표적화함으로써 생성된다. 적합한 RNA-가이드 뉴클레아제는 적합한 가이드 RNA(gRNA)에 의해 게놈 내의 특이적인 표적 부위에 표적화될 수 있다. 본 개시내용의 측면에 따라 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 표적화하기 위한 적합한 gRNA가 본원에 제공되며, 예시적인 적합한 gRNA는 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된다.

[0112] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 계통-특이적 세포 표면 항원 gRNA는 CRISPR/Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제와 복합체화된다. 다양한 Cas9 뉴클레아제는 본 개시내용의 측면에 따라 게놈 편집을 실시하기 위해 본원에 제공된 gRNA와 함께 사용하기에 적합하다. 일반적으로, Cas 뉴클레아제 및 gRNA는 세포의 게놈 상의 표적 부위, 예를 들어, 계통-특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 서열 내의 표적 부위를 표적화하는, Cas/gRNA 복합체의 형성에 적합한 형태로 그리고 그 조건 하에서 제공된다. 일부 실시예에서, 계통-특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 서열에서 원하는 표적 도메인에 Cas/gRNA 복합체를 표적화하기 위한 원하는 PAM 특이성을 나타내는 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 적합한 표적 도메인 및 상응하는 gRNA 표적화 도메인 서열이 본원에 제공된다.

[0113] 일부 실시예에서, Cas/gRNA 복합체가, 예를 들어, 시험관 내에서 형성되고, 표적 세포는, 예를 들어, Cas/gRNA 복합체를 세포 내로 전기천공을 통해 Cas/gRNA 복합체와 접촉된다. 일부 실시예에서, 세포는 Cas 단백질 및 gRNA와 별도로 접촉되고, Cas/gRNA 복합체는 세포 내에 형성된다. 일부 실시예에서, 세포는 핵산, 예를 들어, Cas 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA, 및/또는 gRNA를 암호화하는 핵산, 또는 둘 모두와 접촉된다.

[0114] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 바와 같은 유전적으로 조작된 세포는 적합한 게놈 편집 기술을 사용하여 생성되며, 여기서 게놈 편집 기술은 Cas9 뉴클레아제의 사용을 특징으로 한다. 일부 실시예에서, Cas9 분자는 스트렙토코커스 피오게네스(SpCas9), 스타필로코커스 아우레우스(SaCas9), 또는 스트렙토코커스 써모필러스(stCas9)이거나 이로부터 유래된다. 추가의 적합한 Cas9 분자는 나이세리아 메닝기티디스(NmCas9), 아시도보락스 아비네, 악티노바실러스 플루르뉴모니애, 악티노바실러스 숙시노게네스, 악티노바실러스 수이스, 악티노마이세스 속, 사이클리필러스 데니트리피칸스, 아미노모나스 포시보란스, 바실러스 세레우스, 바실러스 스미티, 바실러스 투린기엔시스, 박테로이데스 속, 플라스토피레룰라 마리나, 브래디리조븀 속, 브레비바실러스 라테로스포러스, 캄필로박터 콜리, 캄필로박터 제주니(CjCas9), 캄필로박터 라리, 칸디다투스 푸니세이스피릴럼, 클로스트리듐 셀룰로리티쿰, 클로스트리듐 퍼프린젠스, 코리네박테리움 아콜렌스, 코리네박테리움 디프테리아, 코리네박테리움 마트루코티, 디노로세오박터 시바에, 유박테리움 돌리쿰, 감마 프로테오박테리움, 글루코나세토박터 디아조트로피쿠스, 헤모필러스 파라인플루엔자에, 헤모필러스 스푸토럼, 헬리코박터 카나덴시스, 헬리코박터 시나에디, 헬리코박터 무스텔라에, 일요박터 폴리트로푸스, 킹겔라 킹가에, 락토바실러스 크리스파투스, 리스테리아 이바노비, 리스테리아 모노사이토게네스, 리스테리아세애 박테리움, 메틸로시스티스 속, 메틸로시누스 트리코스포리움, 모빌룬쿠스 물리에리스, 나이세리아 바실리포르미스, 나이세리아 시네레아, 나이세리아 플라베센스, 나이세리아 락타미카, 나이세리아 메닝기티디스, 나이세리아 속, 나이세리아 와즈워르씨, 니트로소모나스 속, 피바르비배큘럼 라바멘티보란스, 파스퇴렐라 멀토시다, 파스코라크토박테리움 숙시나투텐스, 랄스토니아 시지기, 로돕세우도모나스 팔루스트리스, 로도벌럼 속, 시몬시엘라 무엘레리, 스핑고모나스 속, 스포로락토바실러스 비네애, 스타필로코커스 루그두넨시스, 스트렙토코커스 속, 서브돌리그래뉼럼 속, 티스트렐라 모빌리스, 트레포네마 속, 또는 베르미네프로박터 에이세니아에이거나 이로부터 유도된다. 일부 실시예에서, 이러한 Cas9 뉴클레아제의 촉매적으로 손상되었거나 부분적으로 손상된 변이체가 사용될 수 있다. 추가의 적합한 Cas9 뉴클레아제 및 뉴클레아제 변이체는 본 개시내용에 기초하여 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 본 개시내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다.

[0115] 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 자연적으로 발생하는 Cas 분자이다. 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 참조 서열, 예를 들어 가장 유사한 자연적으로 발생하는 Cas9 분자 또는 PCT 공개 WO2015/157070호의 표 50의 서열과 예를 들어 적어도 하나의 아미노산 잔기가 상이한 조작된, 변경된 또는 변형된 Cas 분자이며, 상기 문헌은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0116] 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제의 부류 2 유형 V에 속하는 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 부류 2 V형 Cas 뉴클레아제는 V-A형, V-B형, V-C형, 및 V-U형으로 추가로 분류될 수 있다. 예를 들어, Stella 등의 Nature Structural & Molecular Biology (2017)를 참조한다. 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 C2c1과 같은 V-B형 Cas 엔도뉴클레아제이다. 예를 들어, Shmakov 등의 Mol Cell (2015) 60: 385-397을 참조한다. 일부 실시예에서, 본원에 제공된 게놈 편집 방법에 사용된 Cas 뉴클레아제는 Cpf1(Cas12a) 뉴클레아제와 같은 V-A형 Cas 엔도뉴클레아제이다. 예를 들어, Strohkendl 등의 Mol. Cell (2018) 71: 1-9를 참조한다. 일부 실시예에서, 본원에 제공된 게놈 편집 방법에 사용된 Cas 뉴클레아제는 프로베텔라 속 또는 프란시셀라 속, 아시다미노코커스 속 (AsCpf1), 라흐노스피라세애 박테리움(LpCpf1), 또는 유박테리움 렉탈레로부터 유도된 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 MAD7이다.

[0117] CRISPR/Cas 뉴클레아제의 자연적으로 발생하는 변이체 및 변형된 변이체 둘 다는 본 개시내용의 측면에 따른 사용에 적합하다. 예를 들어, dCas 또는 니카제 변이체, 변경된 PAM 특이성을 갖는 Cas 변이체, 및 개선된 뉴클레아제 활성을 갖는 Cas 변이체가 본 개시내용의 일부 실시예에 포함된다.

[0118] 일부 예시적인, 비-제한적인 적합한 Cas 뉴클레아제의 일부 특징은 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이 본원에서 더 상세히 설명된다.

[0119] 자연적으로 발생하는 Cas9 뉴클레아제는 일반적으로 2개의 로브: 인식(REC) 로브 및 뉴클레아제(NUC) 로브를 포함하고; 이들 각각은 예를 들어, PCT 공개 WO2015/157070호에, 예를 들어 이의 도 9a 내지 9b에 기술되어 있다 (상기 출원은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다).

[0120] REC 로브는 아르기닌-풍부 브릿지 나선(BH), REC1 도메인, 및 REC2 도메인을 포함한다. REC 로브는 Cas9-특이적 기능성 도메인인 것으로 보인다. BH 도메인은 긴 알파 나선 및 아르기닌 풍부 영역이며, S. 피오게네스 Cas9의 서열의 아미노산 60 내지 93을 포함한다. REC1 도메인은, 예를 들어, gRNA 또는 tracrRNA의 반복:항-복제 이중 가닥의 인식에 관여한다. REC1 도메인은 S. 피오게네스 Cas9의 서열의 아미노산 94 내지 179 및 308 내지 717에서 2개의 REC1 모티프를 포함한다. 이들 2개의 REC1 도메인은 선형 일차 구조에서 REC2 도메인에 의해 분리되었지만, 3차 구조에서 조립되어 REC1 도메인을 형성한다. REC2 도메인 또는 이의 일부는 반복:항-복제 이중가닥을 인식하는 데에도 역할을 할 수 있다. REC2 도메인은 *S. 피오게네스* Cas9의 서열의 아미노산 180 내지 307을 포함한다.

[0121] NUC 로브는 RuvC 도메인(본원에서 RuvC-유사 도메인으로도 지칭됨), HNH 도메인(본원에서 HNH-유사 도메인으로도 지칭됨), 및 PAM-상호작용(PI) 도메인을 포함한다. RuvC 도메인은 레트로바이러스 통합효소 슈퍼패밀리 구성원과 구조적 유사성을 공유하고 단일 가닥, 예를 들어 표적 핵산 분자의 비-상보성 가닥을 절단한다. RuvC 도메인은, S. 피오게네스 Cas9의 서열의 아미노산 1 내지 59, 718 내지 769, 및 909 내지 1098 각각에서 3개의 분할된 RuvC 모티프(RuvC I, RuvCII, 및 RuvCIII, 이들은 종종 당 기술분야에서 RuvCI 도메인, 또는 N-말단 RuvC 도메인, RuvCII 도메인, 및 RuvCIII 도메인으로 통상적으로 지칭됨)로부터 조립된다. REC1 도메인과 유사하게, 3개의 RuvC 모티프는 일차 구조에서 다른 도메인에 의해 선형으로 분리되지만, 삼차 구조에서는 3개의 RuvC 모티프가 조립되어 RuvC 도메인을 형성한다. HNH 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 구조적 유사성을 공유하고, 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 상보적 가닥을 절단한다. HNH 도메인은 RuvC II 내지 III 모티프 사이에 놓이고, S. 피오게네스 Cas9의 서열의 아미노산 775 내지 908을 포함한다. PI 도메인은 표적 핵산 분자의 PAM과 상호작용하고 S. 피오게네스 Cas9의 서열의 아미노산 1099 내지 1368을 포함한다.

[0122] 자연적으로 발생하는 박테리아 Cas9 뉴클레아제에 대해 결정 구조를 결정하였고(예를 들어, Jinek 등의 Science, 343(6176): 1247997, 2014 참조), 가이드 RNA(예를 들어, crRNA 및 tracrRNA의 합성 융합)를 갖는 *S. 피오게네스* Cas9에 대해 결정 구조를 결정하였다(Nishimasu 등의 Cell, 156:935-949, 2014; 및 Anders 등의 Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579).

[0123] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 Cas9 분자는 표적 부위에서 또는 표적 부위에 직접 근위에 이중 가닥 DNA 절단의 도입을 초래하는 뉴클레아제 활성을 나타낸다. 일부 실시예에서, Cas9 분자는 엔도뉴클레아제의 촉매 잔기 중 하나를 불활성화하도록 변형되었다. 일부 실시예에서, Cas9 분자는 니카제이고 단일 가닥 절단을 생성한다. 예를 들어, Dabrowska 등의 Frontiers in Neuroscience (2018) 12(75)를 참조한다. 효소의 RuvC 및 HNH 촉매 도메인에서 하나 이상의 돌연변이가 Cas9 효율을 개선할 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들어, Sarai 등의 Currently Pharma. Biotechnol. (2017) 18(13)를 참조한다. 일부 실시예에서, Cas9 분자는 제2 도메인, 예를 들어, DNA 또는 염색질을 변형시키는 도메인, 예를 들어, 디아미나제 또는 디메틸라제 도메인에 융합된다. 일부

이러한 실시예에서, Cas9 분자는 그의 엔도뉴클레아제 활성을 제거하도록 변형된다.

[0124] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 Cas 뉴클레아제 또는 Cas/gRNA 복합체는 상동성 유도 복구(HDR)를 위한 주형과 함께 투여된다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 Cas 뉴클레아제 또는 Cas/gRNA 복합체는 HDR 주형 없이 투여된다.

[0125] 일부 실시예에서, 효소의 특이성을 향상시키기 위해 변형되는 (예를 들어, 표적-외 효과를 감소시키고, 강력한 표적-중 절단을 유지하기 위해) Cas9 뉴클레아제가 사용된다. 일부 실시예에서, Cas9 분자는 강화된 특이성 Cas9 변이체(예를 들어 eSPCas9)이다. 예를 들어, Slaymaker 등의 Science (2016) 351 (6268): 84-88을 참조한다. 일부 실시예에서, Cas9 분자는 고충실도 Cas9 변이체(예를 들어 SpCas9-HF1)이다. 예를 들어, Kleinstiver 등의 Nature (2016) 529: 490-495를 참조한다.

[0126] 다양한 Cas 뉴클레아제는 당 기술분야에 공지되어 있고, 효소의 하나 이상의 활성 또는 특이성을 조절하도록 다양한 공급원으로부터 수득될 수 있고/될 수 있거나 조작될 수 있거나/변형될 수 있다. 적합한 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, 적합한 Cas9 뉴클레아제, 예를 들어, SpCas9 및 SaCas9와 같은 것의 PAM 서열 선호도 및 특이성이 당 기술분야에 알려져 있다. 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 Cas 뉴클레아제가 조작/변형 없이 인식하는 PAM 서열과 상이한 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 실시예에서, Cas 뉴클레아제는 효소의 표적-외 활성을 감소시키도록 조작/변형되었다.

[0127] 일부 실시예에서, 엔도뉴클레아제 활성의 특이성을 변경(예를 들어, 표적-외 절단을 감소시키고, 세포에서 엔도뉴클레아제 활성 또는 수명을 감소시키며, 상동성-지시 재조합을 증가시키고, 비-상동성 말단 접합을 감소시킴)시키기 위해 추가로 변형된 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 예를 들어, Komor 등의 Cell (2017) 168: 20-36을 참조한다. 일부 실시예에서, 엔도뉴클레아제의 PAM 인식 또는 선호도를 변경하도록 변형된 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 예를 들어, SpCas9는 PAM 서열 NGG를 인식하는 반면, 하나 이상의 변형(예를 들어, VQR SpCas9, EQR SpCas9, VRER SpCas9)을 포함하는 SpCas9의 일부 변이체는 변이체 PAM 서열, 예를 들어, NGA, NGAG, 및/또는 NGCG를 인식할 수 있다. 또 다른 예를 들어, SaCas9는 PAM 서열 NNGRRT를 인식하는 반면, 하나 이상의 변형(예를 들어, KKH SaCas9)을 포함하는 SaCas9의 일부 변이체는 PAM 서열 NNNRRT를 인식할 수 있다. 또 다른 실시예에서, FnCas9는 PAM 서열 NNG를 인식하는 반면, FnCas9의 변이체는 하나 이상의 변형(예를 들어, RHA FnCas9)을 포함하며, PAM 서열 YG를 인식할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 치환 돌연변이 S542R 및 K607R을 포함하는 Cas12a 뉴클레아제는 PAM 서열 TYCV를 인식한다. 또 다른 실시예에서, 치환 돌연변이 S542R, K607R, 및 N552R을 포함하는 Cpf1 엔도뉴클레아제는 PAM 서열 TATV를 인식한다. 예를 들어, Gao 등의 Nat. Biotechnol. (2017) 35(8): 789-792를 참조한다.

[0128] 일부 실시예에서, 염기 편집기는 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현 상실, 또는 면역요법에 의해 표적화되지 않은 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체의 발현을 초래하는 게놈 변형을 생성하는데 사용된다. 염기 편집기는 전형적으로, 기능성 도메인, 예를 들어, 디아미나제 도메인에 융합된 촉매적으로 비활성인 또는 부분적으로 비활성인 Cas 뉴클레아제를 포함한다. 예를 들어, Eid 등의 Biochem. J. (2018) 475(11): 1955-1964; Rees 등의 Nature Reviews Genetics (2018) 19:770-788을 참조한다. 일부 실시예에서, 촉매적으로 비활성인 Cas 뉴클레아제는 "죽은 Cas" 또는 "dCas"로 지칭된다. 일부 실시예에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기(ABE)에 융합된 dCas, 예를 들어 RNA 아데닌 디아미나아제 TadA로부터 진화된 ABE를 포함한다. 일부 실시예에서, 엔도뉴클레아제는 시티딘 디아미나아제 효소에 융합된 dCas(예를 들어, APOBEC 디아미나아제, pmCDA1, 활성화-유도된 시티딘 디아미나아제(AID))를 포함한다. 일부 실시예에서, 촉매적으로 비활성인 Cas 분자는 감소된 활성을 가지며, 예를 들어, 니카제다.

[0129] 적합한 염기 편집기의 예는 제한 없이 BE1, BE2, BE3, HF-BE3, BE4, BE4max, BE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-CE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaBE4, SaBE4-Gam, Sa(KKH)-BE3, 표적-AID, 표적-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRISPR-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10*, xABE, ABESa, VQR-ABE, VRER-ABE, Sa(KKH)-ABE, 및 CRISPR-SKIP를 포함한다. 염기 편집기의 추가 예는, 예를 들어, 미국 공개 제2018/0312825A1호, 미국 공개 제2018/0312828A1호, 및 PCT 공개 WO 2018/165629A1호에서 찾을 수 있으며, 이들은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0130] 본 개시내용의 일부 측면은 예를 들어 본원에 제공된 바와 같은 RNA-가이드 뉴클레아제를 세포의 게놈에서 적합한 표적 부위로 표적화하기에 적합한 가이드 RNA를 제공하여 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현 감소, 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현 손실, 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적으로하는 면역치료제에 의해 인식되지 않

는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태의 발현을 초래하는 세포의 게놈에서의 변형을 일으킨다.

[0131] 일부 예시적인 적합한 Cas9 gRNA 스캐폴드 서열이 본원에 제공되며, 본 개시내용에 기초하여 추가적인 적합한 gRNA 스캐폴드 서열이 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 이러한 추가의 적합한 스캐폴드 서열은 제한 없이, Jinek 등의 Science (2012) 337(6096):816-821, Ran, 등의 Nature Protocols (2013) 8:2281-2308, PCT 공개 WO2014/093694호, 및 PCT 공개 WO2013/176772호에 언급된 것들을 포함한다.

[0132] 예를 들어, 자연적으로 발생하는 SpCas9 gRNA의 결합 도메인은 일반적으로 2개의 RNA 분자, crRNA(부분적) 및 tracrRNA를 포함한다. 예를 들어, 테트라루프 또는 클릭-화학 유형 공유 결합을 통해 서로 공유적으로 결합된 crRNA 및 tracrRNA 서열을 모두 포함하는 단일 RNA 분자만을 포함하는 SpCas9 gRNA의 변이체는 조작되었으며 일반적으로 "단일 가이드" 또는 "sgRNA"로 지칭된다. 자연적으로 발생하는 Cas12a 가이드 RNA가 단일 RNA 분자를 포함하므로, 다른 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cas12a 뉴클레아제와 함께 사용하기에 적합한 gRNA는 전형적으로 단일 RNA 분자만을 포함한다. 따라서, 적합한 gRNA는 때때로 본원에서 sgRNA로 지칭되는 단분자(단일 RNA 분자를 가짐)이거나, 또는 모듈화(하나를 초과하는, 전형적으로는 2개의 분리된 RNA 분자를 포함함)될 수 있다.

[0133] 계통-특이적 세포 표면 항원에서 표적 부위를 표적화하기에 적합한 gRNA는 다수의 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제가 사용되는 일부 실시예에서, 단분자 sgRNA는 5'에서 3'로 다음을 포함할 수 있다:

[0134] 유전자를 암호화하는 계통-특이적 세포 표면 항원의 표적 부위 서열에 상응하는 표적화 도메인;

[0135] 제1 상보성 도메인;

[0136] 연결 도메인;

[0137] (제1 상보성 도메인에 상보적인) 제2 상보성 도메인;

[0138] 근위 도메인; 및

[0139] 선택적으로, 꼬리 도메인.

[0140] 이들 도메인 각각은 이제 보다 상세히 설명된다.

[0141] 본원에 제공된 gRNA는 일반적으로 세포의 게놈에서 표적 부위에 결합하는 표적화 도메인을 포함한다. 표적 부위는 일반적으로 PAM 서열 및 PAM 서열과 동일한 가닥 상에, 그리고 PAM 서열에 직접 인접한 표적 도메인을 포함하는 이중-가닥 DNA 서열이다. gRNA의 표적화 도메인은, 때로는 하나 이상의 불일치와 함께 표적 도메인의 서열과 유사하다는 점에서 표적 도메인 서열에 상응하는 RNA 서열을 일반적으로 포함하지만, 일반적으로 DNA 서열 대신에 RNA를 포함한다. 따라서, gRNA의 표적화 도메인은 표적 도메인의 서열에 상보적인 이중-가닥 표적 부위의 서열과 (전체 또는 부분 상보성으로) 염기쌍을 이루며, 따라서 PAM 서열을 포함하는 가닥에 상보적인 가닥과 쌍을 이룬다. gRNA의 표적화 도메인은 일반적으로 PAM 서열을 포함하지 않는 것으로 이해될 것이다. PAM의 위치는 사용된 뉴클레아제에 따라 표적 도메인 서열의 5' 또는 3'일 수 있음을 추가로 이해할 것이다. 예를 들어, PAM은 일반적으로 Cas9 뉴클레아제에 대한 표적 도메인 서열의 3', 및 Cas12a 뉴클레아제에 대한 표적 도메인 서열의 5'이다. PAM의 위치 및 표적 부위에 결합하는 gRNA의 기작의 예시는, 예를 들어, Vanegas 등의 Fungal Biol Biotechnol. 2019; 6: 6의 도 1을 참조하며, 이는 본원에 참조로서 통합된다. RNA-가이드 뉴클레아제를 표적 부위로서 표적화하는 gRNA의 기작에 대한 추가의 예시 및 설명은, Fu Y 등의 Nat Biotechnol 2014 (doi: 10.1038/nbt.2808) 및 Sternberg SH 등의 Nature 2014 (doi: 10.1038/nature13011)를 참조하고, 이들 모두는 참조로서 본원에 통합된다.

[0142] 표적화 도메인은 표적 도메인의 서열에 상응하는 뉴클레오티드 서열, 즉 PAM 서열에 바로 인접한 DNA 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, Cas9 뉴클레아제의 경우 PAM 서열의 5', 또는 Cas12a 뉴클레아제의 경우 PAM 서열의 3'). 표적화 도메인 서열은 일반적으로 17 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함하고 표적 도메인 서열과 완전히 상응하거나(즉, 임의의 불일치 뉴클레오티드 없이), 하나 이상, 그러나 전형적으로 4개 이하의 불일치를 포함할 수 있다. 표적화 도메인이 RNA 분자인 gRNA의 일부이므로, 이는 일반적으로 리보뉴클레오티드를 포함하는 반면, DNA 표적화 도메인은 데옥시리보뉴클레오티드를 포함할 것이다.

[0143] 22 뉴클레오티드 표적 도메인, 및 NGG PAM 서열을 포함하는 Cas9 표적 부위의 예시적인 도면뿐만 아니라, 표적 도메인에 완전히 상응하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA의 예시적인 도면(따라서, 표적 도메인 및 PAM을 포함하는 가닥에 상보적인 DNA 가닥과 완전한 상보성을 갖는 염기쌍)이 아래에 제공된다:

[0144] [표적 도메인 (DNA)][PAM]

[0145] 5'-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-G-G-3' (DNA)

[0146] 3'-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-C-C-5' (DNA)

[0147] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

[0148] 5'-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-[gRNA 스캐폴드]-3' (RNA)

[0149] [표적화 도메인 (RNA)][결합 도메인]

[0150] 22 뉴클레오티드 표적 도메인, 및 TTN PAM 서열을 포함하는 Cas12a 표적 부위의 예시적인 도면뿐만 아니라, 표적 도메인에 완전히 상응하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA의 예시적인 도면(따라서, 표적 도메인 및 PAM을 포함하는 가닥에 상보적인 DNA 가닥과 완전한 상보성을 갖는 염기쌍)이 아래에 제공된다:

[0151] [PAM][표적 도메인 (DNA)]

[0152] 5'-T-T-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-3' (DNA)

[0153] 3'-A-A-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-5' (DNA)

[0154] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

[0155] 5'-[gRNA scaffold]-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-3' (RNA)

[0156] [결합 도메인][표적화 도메인 (RNA)]

[0157] 일부 실시예에서, Cas12a PAM 서열은 5'-T-T-T-V-3'이다.

[0158] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 적어도 일부 실시예에서, 표적 서열을 갖는 표적화 도메인의 길이 및 상보성은 표적 핵산과 gRNA/Cas9 분자 복합체의 상호작용의 특이성에 기여하는 것으로 여겨진다. 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA의 표적화 도메인은 5 내지 50 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 15 내지 25 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 18 내지 22 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 19 내지 21 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 15 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 16 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 17 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 18 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 19 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 20 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 21 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 22 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 23 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 24 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 25 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 본원에 제공된 표적 도메인 서열 또는 이의 일부에 불일치 없이 완전히 상응한다. 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA의 표적화 도메인은 본원에 제공된 표적 도메인 서열에 대해 1개의 불일치를 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 표적 도메인 서열에 대해 2개의 불일치를 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 표적 도메인 서열에 대해 3개의 불일치를 포함한다.

[0159] 일부 실시예에서, 표적화 도메인은, 예를 들어, PCT 공개 WO2015/157070호에 기술된 바와 같은 코어 도메인 및 2차 표적화 도메인을 포함하며, 상기 PCT 공개 WO2015/157070호는 그 전체가 참조로 통합된다. 일부 실시예에서, 코어 도메인은 표적화 도메인의 3' 말단으로부터 약 8 내지 약 13개의 뉴클레오티드(예를 들어, 표적화 도메인의 최대 3' 8 내지 13개의 뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 실시예에서, 이차 도메인은 코어 도메인에 대해 5'에 위치한다. 일부 실시예에서, 코어 도메인은 표적 도메인 서열 또는 이의 일부와 완전히 상응한다. 다른 실시예에서, 코어 도메인은 표적 도메인 서열의 상응하는 뉴클레오티드와 일치하지 않는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0160] 일부 실시예에서, 예를 들어, Cas9 gRNA가 제공되는 일부 실시예에서, gRNA는 제1 상보성 도메인 및 제2 상보성 도메인을 포함하며, 상기 제1 상보성 도메인은 제2 상보성 도메인과 상보성이고, 적어도 일부 실시예에서는 적어도 일부 생리학적 조건 하에서 이중화된 영역을 형성하기 위해 제2 상보성 도메인에 충분한 상보성을 갖는다. 일부 실시예에서, 제1 상보성 도메인은 5 내지 30 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 제1 상보성 도메인은 3개의 서브도메인을 포함하며, 5'에서 3' 방향으로 5' 서브도메인, 중앙 서브도메인, 및 3' 서브도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 5' 서브도메인은 4 내지 9, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 뉴클레오티드

길이이다. 일부 실시예에서, 중앙 서브도메인은 1, 2 또는 3, 예를 들어, 1, 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 3' 서브도메인은 3 내지 25, 예를 들어, 4 내지 22, 4 내지 18, 또는 4 내지 10, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 뉴클레오티드 길이이다. 제1 상보성 도메인은 자연적으로 발생하는 제1 상보성 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일 실시예에서, 이는 제1 상보성 도메인인 *S. 피오게네스*, *S. 아우레우스*, 또는 *S. 써모필러스*와 적어도 50% 상동성을 갖는다.

[0161] 전술한 도메인의 서열 및 배치는 PCT 공개 WO2015/157070에 보다 상세하게 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되며, 그 안에는 88-112페이지가 포함된다.

[0162] 연결 도메인은 제1 상보성 도메인을 단분자 gRNA의 제2 상보성 도메인과 연결하는 역할을 할 수 있다. 연결 도메인은 제1 및 제2 상보성 도메인을 공유적으로 또는 비공유적으로 연결할 수 있다. 일부 실시예에서, 연결은 공유이다. 일부 실시예에서, 연결 도메인은 제1 상보성 도메인과 제2 상보성 도메인 사이에 개재된 공유 결합이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, 연결 도메인은 하나 이상의, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 연결 도메인은, 예를 들어, PCT 공개 WO2018/126176호에 개시된 바와 같이, 적어도 하나의 비-뉴클레오티드 결합을 포함하며, 이의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0163] 일부 실시예에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과 적어도 부분적으로 상보성이고, 일 실시예에서는, 적어도 일부 생리학적 조건 하에서 이중 영역을 형성하기 위해 제2 상보성 도메인과 충분한 상보성 도메인을 갖는다. 일부 실시예에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과의 상보성이 결여된 서열, 예를 들어 이중 영역으로부터 루프 아웃되는 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 제2 상보성 도메인은 5 내지 27 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 영역보다 더 길다. 일 실시예에서, 상보성 도메인은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 제2 상보성 도메인은 3개의 서브도메인을 포함하며, 5'에서 3' 방향으로 5' 서브도메인, 중앙 서브도메인, 및 3' 서브도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 5' 서브도메인은 3 내지 25, 예를 들어, 4 내지 22, 4 내지 18, 또는 4 내지 10, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 중앙 서브도메인은 1, 2, 3, 4 또는 5, 예를 들어, 3, 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 3' 서브도메인은 4 내지 9, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 제1 상보성 도메인의 5' 서브도메인 및 3' 서브도메인은 각각, 예를 들어, 제2 상보성 도메인의 3' 서브도메인 및 5' 서브도메인과 완전히 상보적이다.

[0164] 일부 실시예에서, 근위 도메인은 5 내지 20 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 근위 도메인은 자연적으로 발생하는 근위 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일 실시예에서, 이는 *S. 피오게네스*, *S. 아우레우스*, 또는 *S. 써모필러스* 유래의 근위 도메인과 적어도 50% 상동성을 갖는다.

[0165] 광범위한 꼬리 도메인 스펙트럼이 gRNA에 사용하기에 적합하다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인은 길이가 0(없음), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 뉴클레오티드이다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인 뉴클레오티드는 자연적으로 발생하는 꼬리 도메인의 5' 말단으로부터의 서열로부터 유래하거나 이의 서열과 상동성을 공유한다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인은 서로 상보적이고, 적어도 일부 생리학적 조건 하에서, 이중 영역을 형성하는 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인은 없거나 1 내지 50 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인은 자연적으로 발생하는 근위 꼬리 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인은 S. 피오게네스, S. 아우레우스 또는 S. 써모필러스 유래의 꼬리 도메인과 적어도 50% 상동성/동일성을 갖는다. 일부 실시예에서, 꼬리 도메인은 시험관 내 또는 생체 내 전사 방법과 관련된 뉴클레오티드를 3' 말단에 포함한다.

[0166] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA는 다음을 포함한다:

[0167] 예를 들어, 5'에서 3'로:

[0168] (CD30 유전자의 표적 도메인에 상응하는) 표적화 도메인; 및

[0169] 제1 상보성 도메인; 및

[0170] 예를 들어, 5'에서 3'로 하기를 포함하는, 제2 가닥:

[0171] 선택적으로, 5' 연장 도메인;

[0172] 제2 상보성 도메인;

[0173] 근위 도메인; 및

[0174] 선택적으로, 꼬리 도메인.

[0175] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA 중 어느 하나는 화학적으로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. gRNA의 화학적 변형이 이전에 기술되었고, 적합한 화학적 변형은 gRNA 기능에 유익한 임의의 변형을 포함하며, 주어진 gRNA의 임의의 원하지 않는 특성, 예를 들어, 표적-외 효과를 측정가능하게 증가시키지 않는다. 적절한 화학적 변형은, 예를 들어, gRNA가 엔도- 또는 엑소뉴클레아제 촉매 활성에 덜 감수성이 되게 하는 것들을 포함하며, 제한 없이, 포스포로티오에이트 골격 변형, 2'-O-Me-변형(예를 들어, 3' 및 5' 말단 중 하나 또는 둘 모두에), 2'F-변형, 리보스 당의 바이사이클릭 뉴클레오티드-cEt로의 치환, 3'티오PACE(MSP) 변형, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 추가적인 적합한 gRNA 변형은 본 개시내용에 기초하여 당 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이며, 이러한 적합한 gRNA 변형은, 예를 들어, Rahdar 등의 PNAS (2015) 112 (51) E7110-E7117 및 Hendel 등의 Nat Biotechnol. (2015); 33(9): 985-989에 기술된 것들을 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0176] 예를 들어, 본원에 제공된 gRNA는 하나 이상의 2'-O 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 gRNA의 3' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 및 3' 말단 모두에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터 네 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드에 대한 포스페이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드에 대한 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드에 대한 티오PACE 연결을 포함한다.

[0177] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA는 하나 이상의 2'-O-변형 및 3' 인산-변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 gRNA의 3' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 및 3' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 하나 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 대체된 골격을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티

드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3' 포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다.

[0178] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA는 하나 이상의 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 gRNA의 3' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 및 3' 말단에 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 하나 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 치환되고 하나 이상의 비-가교 산소 원자가 아세테이트기로 치환되는 골격을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3' 티오PACE-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시예에서, gRNA는 gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다.

[0179] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA는 화학적으로 변형된 골격을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 비-가교 산소 원자는 황 원자로 치환되었다. 일부 실시예에서, gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드 각각은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드 각각은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드 각각은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드 각각은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 5' 말단으로부터의 세 번재 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드 각각은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0180] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 gRNA는 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는 하나 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 치환되고 하나 이상의 비-가교 산소 원자가 아세테이트기로 치환되는 골격을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드 각각은 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번

째 뉴클레오티드 각각은 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 5' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드 각각은 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드 각각은 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시예에서, 뉴클레오티드 gRNA의 5' 말단에, gRNA의 5' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, 5' 말단으로부터의 세 번재 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 두 번째 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 세 번째 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 네 번째 뉴클레오티드 각각은 티오PACE 연결을 포함한다.

[0181] 일부 실시예에서, 본원에 기술된 gRNA는 하나 이상의 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오티드, 예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 본원에 기술된 gRNA는 3개의 말단 위치 및 5' 말단 중 하나 이상 및/또는 3개의 말단 위치 및 3' 말단 중 하나 이상에서 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 실시예에서, gRNA는, 예를 들어, PCT 공개 WO2017/214460호, WO2016/089433호, 및 WO2016/164356호에 기술된 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 이들 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0182]

[0183] *사용 방법*

[0184] 본 개시내용의 일부 측면은 본원에 제공된 복수의 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용의 일부 측면은, 복수의, 바람직하게는 유효 수의 본원에 제공된 세포, 예를 들어 과증식성/신생물/악성 질환과 연관된 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 트랜스진(예를 들어, CAR)을 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포(상기 세포는 동원된 림프구 세포임)를 이를 필요로하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 림프구는 T 림프구이다. 일부 실시예에서, CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 림프구는 B 림프구이다. 일부 실시예에서, CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 림프구는 NK 세포이다.

[0185] 일부 실시예에서, 대상체에게는 복수의, 바람직하게는 유효 수의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포가 또한 투여되며, 상기 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현 감소 또는 발현 결여, 또는 CAR에 의해 감소된 수준에서 인식되거나 인식되지 않는 계통-특이적 세포 표면 항원의 변이체 형태의 발현을 특징으로 한다. 일부 실시예에서, 세포는 HSC 또는 HPC이다.

[0186] 일부 실시예에서, 이러한 방법은 과증식성 질환의 적어도 하나의 증상을 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다.

[0187] 본 개시내용의 일부 측면은 본원에 제공된 세포, 예를 들어, 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 림프구를 과증식성 질환, *예를 들어*, 조혈 악성종양 예를 들어 골수성 악성종양 또는 림프구 악성종양을 가진 대상체에게 투여하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 대상체는 과증식성 질환을 앓고 있거나 과증식성 질환으로 진단되었다. 일부 실시예에서, 대상체는 과증식성 질환을 앓고 있거나 과증식성 질환으로 진단되었지만, 질환은 질환의 전악성 단계와 같이 악성 상태로 진입하지 않는다.

[0188] 일부 실시예에서, 대상체에게 세포를 투여하는 단계는, 예를 들어, 신생물 또는 악성 세포의 수를 감소시키는 것, 종양 성장을 억제하는 것을 비롯하여 종양 부담을 감소시키는 것, 종양 성장 속도를 늦추는 것, 종양 크기를 감소시키는 것, 종양 수를 감소시키는 것, 종양을 제거하는 것, 또는 신생물 질환 또는 장애와 관련된 증상, 예를 들어 피로, 통증, 체중 감소, 및 기타 임상적인 측정을 감소시키거나 개선하는 것을 포함할 수 있는, 과증식성 질환과 연관된 징후 또는 증상을 개선한다.

[0189] 일부 실시예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 실시예에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0190] 일부 실시예에서, 대상체는 과증식성 질환을 갖고 있거나 이로 진단받았다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 조혈 악성종양이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 골수성 악성종양이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 림프구 악성종양이다. 일부 실시예에서, 조혈 악성종양은 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종이다. 일부 실시예에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 급성 림프구 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프구 백혈병이다. 일

부 실시예에서, 암은 급성 골수성 백혈병(AML)이다. 일부 실시예에서, 신생물 질환은 골수이형성 증후군이다.

[0191] 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 육종이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 흑색종이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 뇌 또는 척수 종양이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 생식 세포 종양이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 신경내분비 종양이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 카르시노이드 종양이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 조혈 계통의 암이다. 일부 실시예에서, 과증식성 질환은 전이성 암이다.

[0192] 사용된 CAR 및 본원에서 제공된 세포에 따라, 비제한적으로 골암, 장암, 간암, 피부암, 두경부암, 흑색종(피부 또는 안구 내 악성 흑색종), 신장암(예를 들어, 투명 세포 암종), 인후암, 전립선암(예를 들어, 호르몬 불응성 전립선 선암종), 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 및 골수종), 자궁암, 직장암, 항문 영역의 암, 방광암, 뇌암, 위암, 고환암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 백혈병(예를 들어, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 급성 적 백혈병, 만성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성다혈구증, 림프종(호지킨병, 비-호지킨병, 발덴스트롬마크로글로불린혈증), 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 성기암, 아동기의 고형 종양, 림프구성 림프종, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 중추신경계(CNS) 신생물, 1차 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피암, 편평 세포 암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유도된 것들을 포함하는 환경적으로 유도된 암, 중쇄 질환, 및 고형 종양 예를 들어 육종 및 암종, 예를 들어 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골형성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 윤활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두 암종, 유두 선암종, 낭샘암종, 수질 암종, 기관지성 암종, 간암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 빌름 종양, 자궁경부암, 자궁감, 고환암, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 신경초종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종, 망막아종, 악성 흉막 질환, 중피종, 폐암(예를 들어, 비-소 세포 폐암), 췌장암, 난소암, 유방암(예를 들어, 전이성 유방암, 전이성 삼중-음성 유방암), 대장암, 흉막 종양, 교아세포종, 식도암, 위암, 및 활막 육종을 비롯하여 다양한 질환 또는 악성종양이 치료될 수 있다. 고형 종양은 원발성 종양 또는 전이성 상태의 종양일 수 있다.

[0193] 일부 실시예에서, 본원에 제공된 바와 같은 유전적으로 조작된 세포, 예를 들어, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포인, CAR를 발현하는 유전적으로 조작된 림프구는 대상체의 체중 kg당 약 10^4 내지 약 10^{10} 세포, 예를 들어, 약 10^5 내지 약 10^9, 약 10^5 내지 약 10^8, 약 10^5 내지 약 10^7, 또는 약 10^5 내지 10^6의 용량으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일반적으로, 전신 투여의 경우, 국소 투여보다 더 높은 용량이 사용된다. 또한, 본원에 기술된 세포 중 어느 하나의 용량은 단일 용량이 투여되고 있는지 또는 다중 용량이 투여되고 있는지를 고려하도록 조정될 수 있다. 유효 용량으로 간주되는 것에 대한 정확한 결정은 전술한 바와 같이, 특정 대상체의 크기, 연령, 성별, 체중, 및 병태를 포함하여, 각 대상체에 대한 인자 개별요소에 기초할 수 있다. 투여량은 본원의 개시내용 및 당 기술분야의 숙련자의 지식에 기초하여 당 기술분야의 숙련자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0194] 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는, 비제한적으로 흉막 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 결절내 투여, 종양내 투여, 경막내 투여, 흉막내 투여, 복강내 투여, 두개내 투여, 및 흉선에 대한 직접 투여를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 당 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0195] 예

[0196] 예 1:

[0197] 도 1 및 도 2에 도시된 예시적인 개략도에 도시된 바와 같이, 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 조작된 편집된 조혈 줄기 세포 및 세포는 단일 출발 물질로부터 생산될 수 있다.

[0198] 요약하자면, 공여자(*예를 들어*, 건강한 HLA 일치 공여자)에게는, 통상적으로 대상체의 골수에 위치하는 세포의 동원을 촉진하는, 본원에 기술된 것들 중 어느 하나와 같은, 동원제가 투여된다. 성분채집술 생성물은 조혈 줄기 세포 및 PMBC를 포함하는 동원된 세포의 이종 집단을 함유하는 공여자 대상체로부터 수득된다. CD34+ 세포("표적 세포"로 지칭될 수 있는 HSC)는 출발 물질로부터 단리되어 편집된 조혈 줄기 세포(eHSC) 약물 생성물을 생산하는데 사용된다. 예를 들어, 조혈 줄기 세포는 CD33(CD34+/$CD33^{neg}$ eHSC)과 같은 계통-특이적 세포 표면 항원의 발현이 감소하거나 발현이 결여되도록 유전적으로 조작될 수 있다.

[0199] 전형적으로 폐기될 수 있는 세포의 나머지 집단("비-표적 분획"으로 지칭됨)은 CAR 약물 생성물, *예를 들어* CAR-T 세포를 생산하기 위해 CAR을 암호화하는 이종 핵산을 형질도입함으로써 유전적으로 조작된다. CAR 약물 생성물 세포는 eHSC의 생착 후 환자에게 나중에 투여하기 위해 저장될 수 있다.

[0200] 예 2: 전임상 모델에서 효능 있고 효과적인 AML 요법으로서 G-CSF/플레릭사포 이중-동원된 공여자 유래 CD33 CAR-T 세포

[0201] 현재 급성 골수성 백혈병(AML) 특이적 항원은 없다. 이식을 위한 조혈 줄기 세포(HSC)의 CRISPR/Cas9 조작을 사용한 CD33의 유전적 용발은 이식 수용자에서 백혈병-특이적 항원을 생성하기 위한 합성 생물학 접근법을 나타낸다. CD33KO HSC의 이식은 편집된 CD33KO HSC를 아끼면서 AML 세포의 CD33-표적화된 면역치료(예를 들어, 항-CD33 CAR-T 세포 매개) 사멸을 가능하게 하며, 따라서, 예를 들어, 이러한 CD33Ko HSC에 의해 지속되는 골수 발달 및 기능을 지속함으로써, CD33-표적화된 면역치료제의 표적-상, 암-외 독성을 완화한다.

[0202] 동원된 백혈구성분채집술은 이식을 위한 편집된 CD33 널($CD33^-$ 또는 CD33KO) HSC 및 상보적 면역치료제, 예를 들어, CD33 CAR-T 세포 생성물 모두의 생성을 위한 매력적인 출발 물질을 나타낸다. 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 플레릭사포(Mozobil)를 사용한 이중 동원의 면역 세포 조성물, T 세포 표현형, 및 키메라 항원 수용체(CAR) 형질도입 시 AML 종양 성장을 제어하기 위한 이러한 T 세포의 기능성에 미치는 영향이 하기 기술되어 있다.

[0203] G-CSF(10 μg/kg/일, 연속 5일) 및 플레릭사포(240 μg/kg, 4일차 및 5일차)를 주입한 건강한 공여자로부터 동원된("mob") PBMC를 수집하였다. 동일한 공여자로부터 수집된, 비-동원된("비-mob", 또한 본원에서 때때로 및 도면에서 "정상 상태" 또는 "ss"로 지칭됨) PBMC를 대조군으로서 사용하였다. 세포를 면역표현형 및 분화 및 골수 귀소 마커를 포함하는 T 세포 특성화뿐만 아니라 항-CD3(OKT3) 및 IL-2를 이용한 T 세포 활성화에 대한 반응에 대해 유세포 계측법에 의해 분석하였다.

[0204] 동원된 세포 집단을 구성하는 세포 유형을 평가하기 위해, 유세포 분석을 사용하여 전체 면역 표현형 분석을 수행하였다. 동원된 세포 집단은 T 세포, 단핵구, NK 세포 및 B 세포의 집단을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 도 3a 내지 3d를 참조한다. 도 3e에 있어서, 동원된 세포 집단에 존재하는 특정 세포 유형의 상대적 풍부도는 정상 상태 세포 집단에서 세포 유형의 풍부도와 상이하였다. 예를 들어, CD3+ 세포(T 세포)의 상대적 풍부도는, 정상 단계와 비교하여 동원된 세포 집단에서 감소한 반면, B 세포의 상대적 풍부도는 정상 상태와 비교하여 동원된 세포 집단에서 증가하였다.

[0205] 동원된 세포 집단에서 T 세포의 표현형을 추가로 평가하였다. 도 3f 내지 3h에 도시된 바와 같이, 미처리, 효과기, 및 기억 T 세포가 동원된 세포 집단에 존재하였지만, 미처리 T 세포의 상대적 풍부도는 동원된 세포 집단에서 정상 상태와 비교하여 증가하였다. 또한, 효과기 및 기억 T 세포의 상대적 풍부도는 정상 상태와 비교하여 동원된 세포 집단에서 감소하였다.

[0206] 전술한 바와 같은 면역 세포 및 T-세포 표현형 분석을 복수의 공여자로부터의 비-동원된 PBMC 및 동원된 PBMC 집단에 대해 수행하였다. 도 4a 내지 4c를 참조한다. 도 4d에 도시된 바와 같이, 비-동원된 PBMC 및 동원된 PBMC 집단으로부터 수득한 상이한 T-세포 하위 집합($CD8^+$ 또는 $CD4^+$)을 또한 분석하였다. 총 30명의 건강한 공여자로부터의 PBMC의 *생체 외* 면역표현형은 동원이 $CD3^+$ T 세포의 전체 수를 감소시키지만, T 효과기-기억($CD45RA^-/CCR7^-$) 및 중앙-기억($CD45RA^-/CCR7^+$) 집단을 희생하여, 미처리 T 세포($CD45RA^+/CCR7^+$)를 증가시키는 것으로 나타났다.

[0207] 또한, 광범위한 전사체 및 T 세포 수용체 레퍼토리 분석과 조합하여 127개의 면역 세포 표현형 마커를 사용하여 단일-세포 차세대 서열분석(CITEseq)에 의해 비-동원된 PBMC 및 동원된 PBMC 집단을 분석하였다. 2명의 공여자(D1 및 D2)에 대한 CITEseq 결과는 도 5(PBMC 집단 분석) 및 도 6(T-세포 하위 집합 분석)에 도시되어 있다. 단일 세포 서열 분석을 통해 동원에 의해 유도된 T 미처리 세포의 증가뿐만 아니라 단핵구/대식세포, $CD4^+$ T 세포 및 NK 세포 백분율의 이동을 확인하였다.

[0208] 또한, 골수 귀소 인자(예를 들어, 시알릴-루이스^X, CXCR4)는 비-동원된 T 세포 샘플과 비교하여 동원된 것에서 다소 감소한 것으로 관찰되었다.

[0209] (표준 항-CD3 및 IL-2 프로토콜을 사용한) T 세포 활성화는 비-동원된 PBMC 및 동원된 PBMC 집단에 걸쳐 CD25,

CD69 및 CD137 발현의 유사한 증가, 및 CD62L 발현의 감소를 초래하였다. 도 7은 2명의 공여자(D1 및 D2)로부터 수득된 비-동원된 PBMC 및 동원된 PBMC 집단에 대한 단백질 발현의 변화를 도시하고, 도 8은 더 큰 공여자 코호트에 대한 마커 발현의 활성화-유도 변화를 도시한다. 비-동원된 공여자 샘플에 비해 동원된 것에서 더보다 많은 수의 단핵구($CD14^+$)가 검출되었지만, T 세포 활성화 조건 하에서 배양 후 사라졌다.

[0210] 항-CD33 CAR 작제물의 렌티바이러스 형질도입은 AML 세포 공동-배양물 및 AML 마우스 모델에서 mob- 및 비-mob-CAR T 세포의 기능적 비교를 가능하게 하였다.

[0211] M195(항 -CD33) 결합제, CD28 힌지 및 막관통 도메인, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 항-CD33 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 작제물, 및 CAR-T 세포를 표준 렌티바이러스 형질도입 프로토콜에 의해 동원된 PBMC 분획 및 비-동원된 PBMC 분획으로부터 수득하였다(예를 들어, 국제 특허 공개 PCT/US2020/022309호를 참조한다). CAR의 서열이 하기 제공된다:

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPY
NGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKSGAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPL
FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGS(서열번호 1)

[0212] 기능적 *시험관 내* 세포독성 분석을 통해, 비-형질도입된 T 세포의 감소된 '방관자' 활성화와 함께, mob-CD33-CAR T-세포는 $CD33^+$ AML 세포를 사멸시키는데 있어서 비-mob-CD33-CAR T-세포만큼 효과적임을 입증하였다(도 9 내지 11). 비-동원된 PBMC 집단은 약 28%의 CAR-발현 빈도를 수득한 반면, 동원된 PBMC 집단은 약 27%의 CAR-발현 세포를 수득하였다. 표적 세포는 CD33-발현 MOLM13 세포(wt MOLM), CD33 널 MOLM13 세포(CD33KO MOLM), 및 Jurkat 세포(CD33 발현 없음)를 포함하였다. CAR-T 세포 및 표적 세포를 24시간 동안 공동 배양하였다. 대조군 조건은 자극 없는 세포(음성 대조군) 및 표준 PMA/이오노마이신 자극(PMA/I, 양성 대조군)을 갖는 세포를 포함하였다. 일부 경우에, MYLOTARG™를 추가 양성 대조군으로서 사용하였다. 분석을 적어도 2회 수행하였다.

[0213] 도 9는 동원된-PBMC-유래 CAR-T 세포의 세포독성 가능성이 비-동원된-PBMC-유래 CAR-T 세포와 동일하다는 것을 입증한다.

[0214] 도 10은 세포 내 활성화 마커가 최소의 "방관자" 활성화와 함께, 동원된 PBMC-유래 CAR-T 세포 및 비-동원된 PBMC-유래 CAR-T 세포에서 유사한 방식으로 상향 조절되고, CD8+ 및 CD8-T 세포 둘 모두가 활성화되어 CAR 및 항원-의존적인 방식으로 IFNɣ 및 TNFα를 생산함을 보여준다.

[0215] 도 11은 상등액 사이토카인의 LUMINEX™ 분석을 도시하며, 이를 통해 비-동원된 PBMC-유래 CAR-T 세포 및 동원된 PBMC-유래 CAR-T 세포의 등가 세포독성 전위의 결과를 확인하였다.

[0216] *생체 내* AML 마우스 모델에서의 비-동원된 PBMC-유래 CAR-T 세포 및 동원된 PBMC-유래 CAR-T 세포의 세포독성 가능성에 대한 평가는 동원된-CD33-CAR T-세포가 비-동원된-CD33-CAR T 세포로서 $CD33^+$ 종양을 제거하는데 동등하게 효과적임을 입증하는 도 12에 도시되어 있다.

[0217] 본원에 나타낸 데이터는, T 세포-특이적 자극에 대한 유사한 반응을 나타내는, 주로 활성화 시 사라진, mob 및 비-mob PBMC 사이의 표현형 *생체 외* 차이를 나타낸다. 이러한 소견은 비-/mob-CAR T-세포의 유사한 *시험관 내* 세포독성 프로파일에 의해 입증된다. mob-CAR T-세포 집단에서 비-형질도입된 T 세포는 제한된 '방관자' 활성화를 나타냈는데, 이는 잠재적으로 유리한 임상 독성 프로파일을 나타낸다. mob-CAR T-세포 기능에 대한 추가적인 *생체 내* 평가는 효과적인 종양 제거를 보여주며, 이는 AML 환자의 치료를 위해 조작된 HSC와 병용하는 임상적 사용을 위한 추가적인 노력을 뒷받침한다.

[0218] 참고 문헌

[0219] 예를 들어, 배경, 요약, 상세한 설명, 예 및/또는 참고문헌 섹션에서 본원에 언급된 모든 간행물, 특허, 특허 출원, 공보, 및 데이터베이스 입력물(예를 들어, 서열 데이터베이스 입력물)은 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원, 공보 및 데이터베이스 입력물이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 본원에 통합되는 것처럼 그 전체

가 참조로서 본원에 통합된다. 충돌의 경우, 본원의 임의의 정의를 포함하는 본 출원이 통제할 것이다.

[0220] 균등 및 범위

[0221] 당 기술분야의 숙련자는 본원에 기술된 실시예의 많은 등가물을 일상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 개시내용의 범주는 상기 설명에 한정되는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같다.

[0222] "하나의(a, an)" 및 "그(the)"와 같은 관사는 문맥으로부터 반대로 또는 달리 명백하게 표시되지 않는 한 하나 이상의 것을 의미할 수 있다. 군의 2개 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은, 문맥으로부터 반대로 또는 달리 명백하게 표시되지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 존재하는 경우, 만족한 것으로 간주된다. 2개 이상의 군 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 군의 개시는, 정확히 군의 하나의 구성원이 존재하는 실시예, 군의 하나 이상의 구성원이 존재하는 실시예, 및 모든 군 구성원이 존재하는 실시예를 제공한다. 간결성을 위해, 이들 실시예는 본원에서 개별적으로 설명되지 않았지만, 이들 실시예 각각은 본원에 제공되며 구체적으로 청구되거나 부인될 수 있음을 이해할 것이다.

[0223] 본 발명은 청구범위 중 하나 이상 또는 본 명세서의 하나 이상의 관련 부분으로부터 하나 이상의 제한, 요소, 조항 또는 기술 용어가 다른 청구범위에 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 다른 청구범위에 의존하는 청구범위는 동일한 기본 청구범위에 의존하는 임의의 다른 청구범위에서 발견되는 제한 중 하나 이상을 포함하도록 수정될 수 있다. 또한, 청구범위가 조성물을 인용하는 경우, 본 명세서에 개시된 방법 중 어느 하나에 따른 또는 본 기술분야에 공지된 방법에 따른 조성물의 제조 또는 사용 방법, 또는 달리 명시되지 않는 한, 또는 모순 또는 불일치가 발생할 것이라는 것이 당 기술분야의 숙련자에게 명백하지 않는 한, 포함되는 것이 이해되어야 한다.

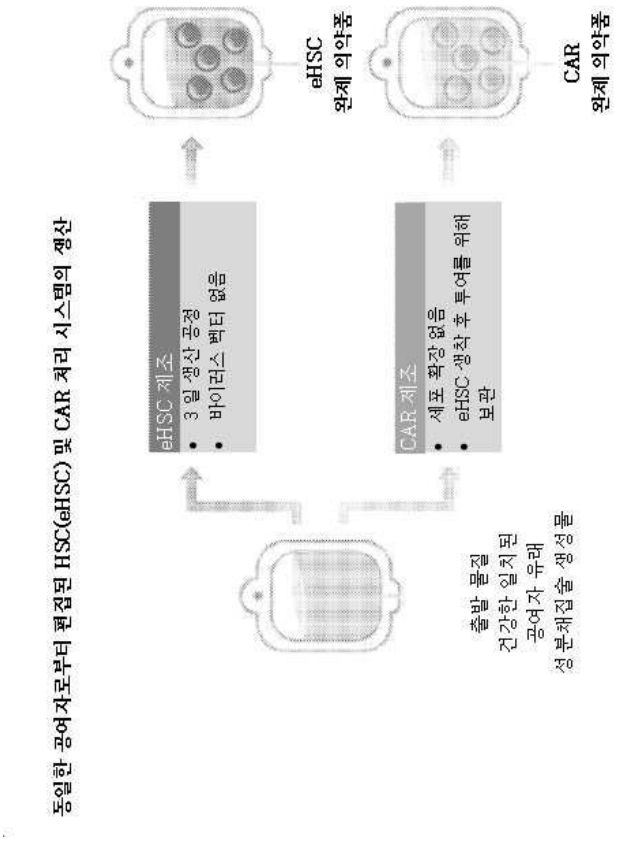
[0224] 요소가 열거로서, 예를 들어, 마쿠쉬 군 형식으로 제시되는 경우, 요소의 가능한 모든 하위군이 또한 개시되고, 임의의 요소 또는 요소의 하위군이 군으로부터 제거될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 또한, 용어 "포함하는(comprising)"은 개방적인 것으로 의도되고 추가 요소 또는 단계의 포함을 허용한다는 점에 주목한다. 일반적으로, 실시예, 생성물, 또는 방법이 특정 요소, 특징, 또는 단계, 실시예, 생성물, 또는 이러한 요소, 특징, 또는 단계로 구성되거나 필수적으로 구성되는 방법을 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 이러한 요소, 특징, 또는 단계가 또한 제공된다는 것을 이해해야 한다. 간결성을 위해, 이들 실시예는 본원에서 개별적으로 설명되지 않았지만, 이들 실시예 각각은 본원에 제공되며 구체적으로 청구되거나 부인될 수 있음을 이해할 것이다.

[0225] 범위가 주어진 경우, 종점은 포함된다. 또한, 문맥 및/또는 당 기술분야의 숙련자의 이해로부터 달리 지시되거나 달리 명백하지 않는 한, 범위로서 표현되는 값은, 일부 실시예에서는 언급된 범위 내의 임의의 특정 값을, 범위 하한의 단위 10번째까지 가정할 수 있고, 문맥이 달리 명시하지 않는 한, 그 값이 이해되어야 한다. 간결성을 위해, 각 범위의 값은 본원에서 개별적으로 설명되지 않았지만, 이들 값 각각은 본원에서 제공되며 구체적으로 청구되거나 부인될 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 문맥 및/또는 당 기술분야의 숙련자의 이해로부터 달리 지시되거나 달리 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 주어진 범위 내의 임의의 하위 범위를 가정할 수 있고, 하위 범위의 종점은 범위의 하한의 단위 10번째와 동일한 정확도로 표현된다.

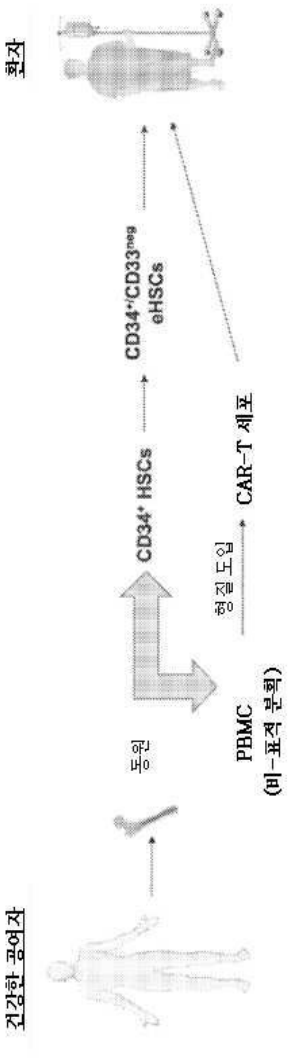
[0226] 또한, 본 발명의 임의의 특정 실시예는 청구범위 중 임의의 하나 이상으로부터 명시적으로 배제될 수 있음을 이해해야 한다. 범위가 주어지는 경우, 범위 내의 임의의 값은 청구범위 중 임의의 하나 이상으로부터 명시적으로 배제될 수 있다. 본원에 기술된 조성물 및/또는 방법의 임의의 실시예, 요소, 특징, 적용 또는 측면은 임의의 하나 이상의 청구범위로부터 배제될 수 있다. 간결성을 위해, 하나 이상의 요소, 특징, 목적, 또는 양태가 배제되는 모든 실시예는 본원에서 명시적으로 제시되지 않는다.

도면

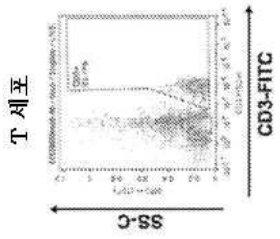
도면1


동일한 공여자로부터 편집된 HSC(eHSC) 및 CAR 처리 시스템의 생산
eHSC 제조
• 3 일 생산 공정
• 바이러스 벡터 없음
CAR 제조
• 세포 확장 없음
• eHSC 생착 후 투여를 위해 보관
eHSC 완제 의약품
CAR 완제 의약품
출발 물질
건강한 일치된 공여자 유래
성분채집술 생성물

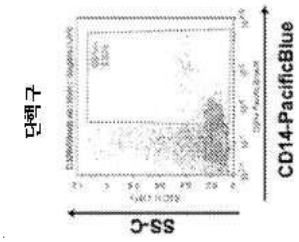
도면2


환자
CD34+CD33neg eHSCs
CD34+ HSCs
형질도입
CAR-T 세포
PBMC
(비-표적 분획)
동원
건강한 공여자

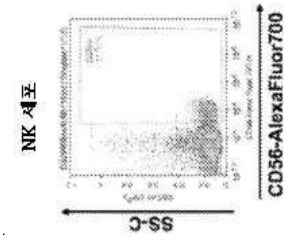
도면3a


T 세포
SS-C
CD3-FITC

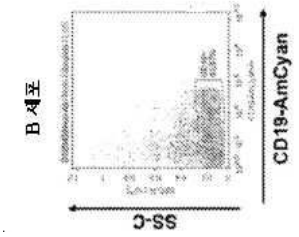
도면3b



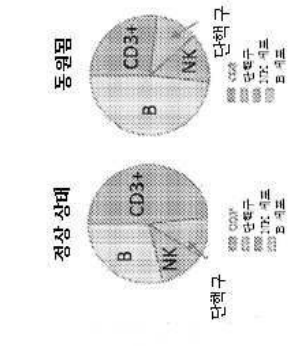
도면3c



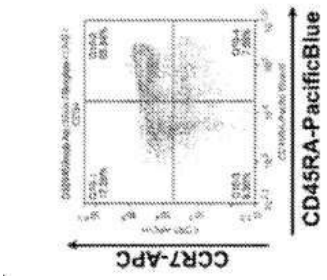
도면3d



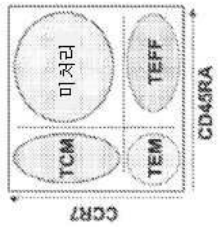
도면3e



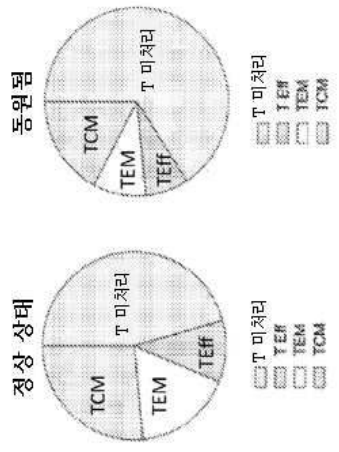
도면3f



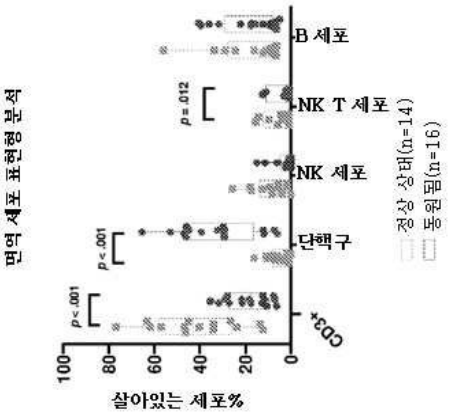
도면3g



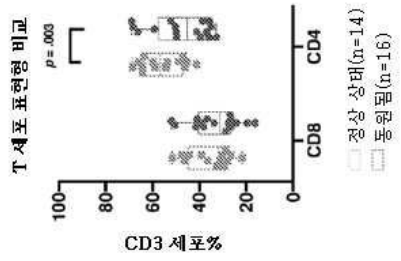
도면3h



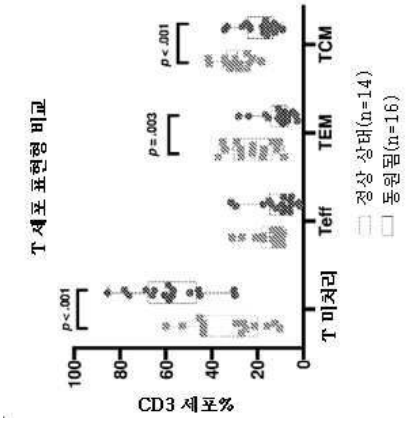
도면4a



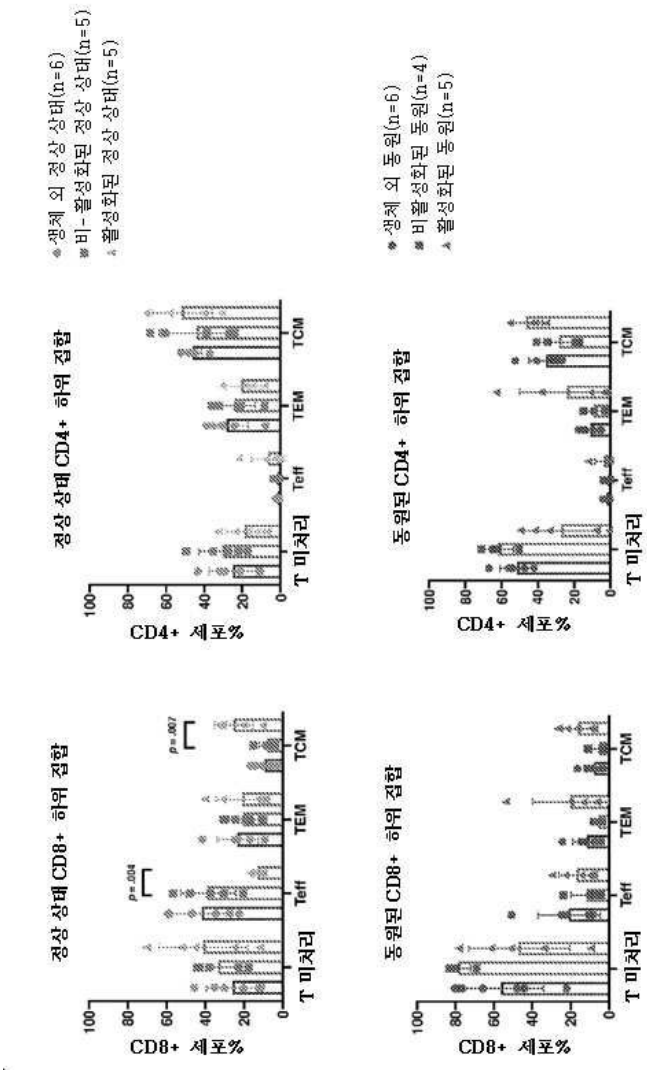
도면4b



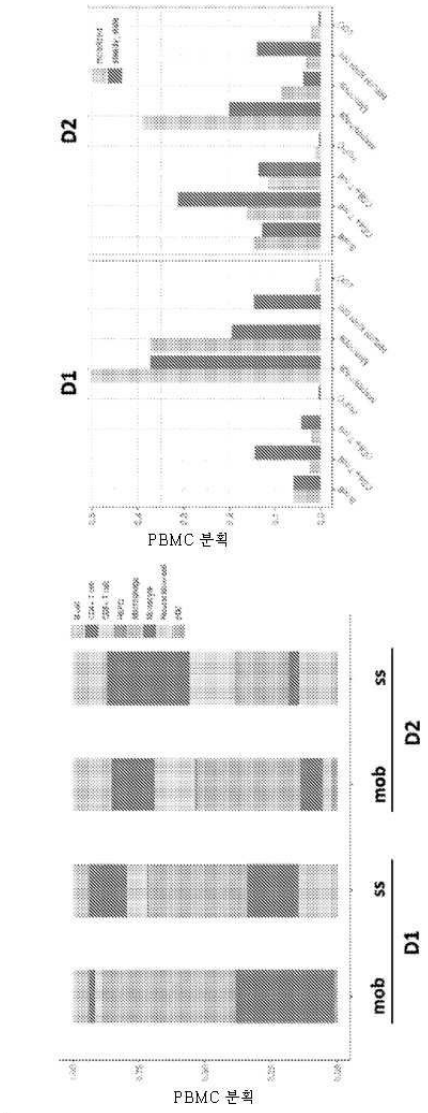
도면4c


T 세포 표현형 비교
p < .001
p = .003
p < .001
100
80
60
40
20
0
CD3 세포%
T 미처리
Teff
TEM
TCM
정상 상태(n=14)
동원됨(n=16)

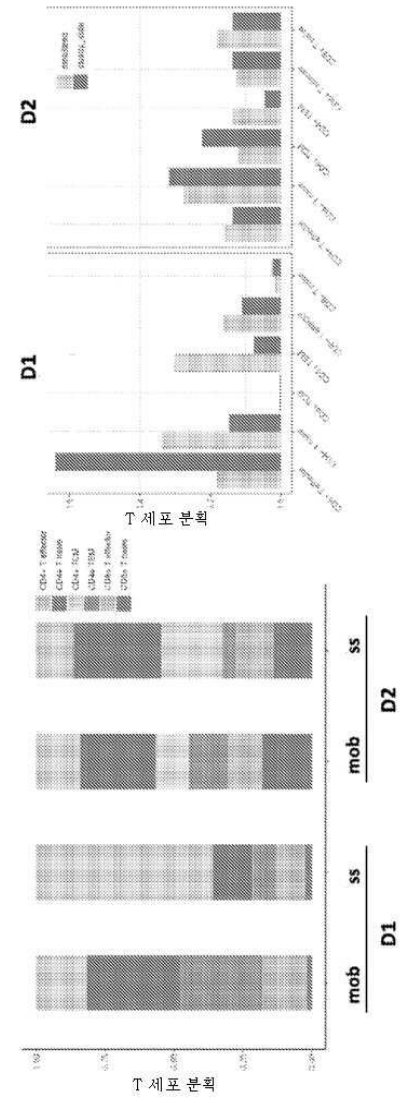
도면4d


생체 외 정상 상태(n=6)
비-활성화된 정상 상태(n=5)
활성화된 정상 상태(n=5)
생체 외 동원(n=6)
비활성화된 동원(n=4)
활성화된 동원(n=5)
정상 상태 CD4+ 하위 집합
동원된 CD4+ 하위 집합
정상 상태 CD8+ 하위 집합
동원된 CD8+ 하위 집합
p = .004
p = .007
CD4+ 세포%
CD8+ 세포%
100
80
60
40
20
0
T 미처리
Teff
TEM
TCM

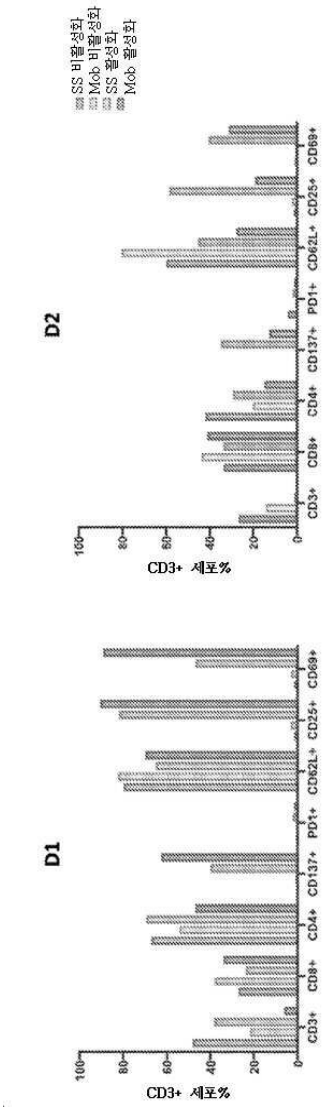
도면5



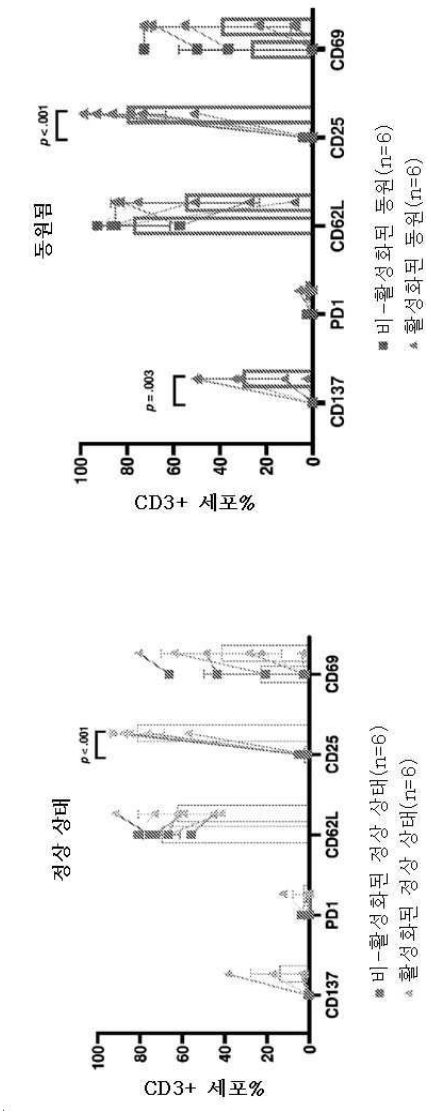
도면6



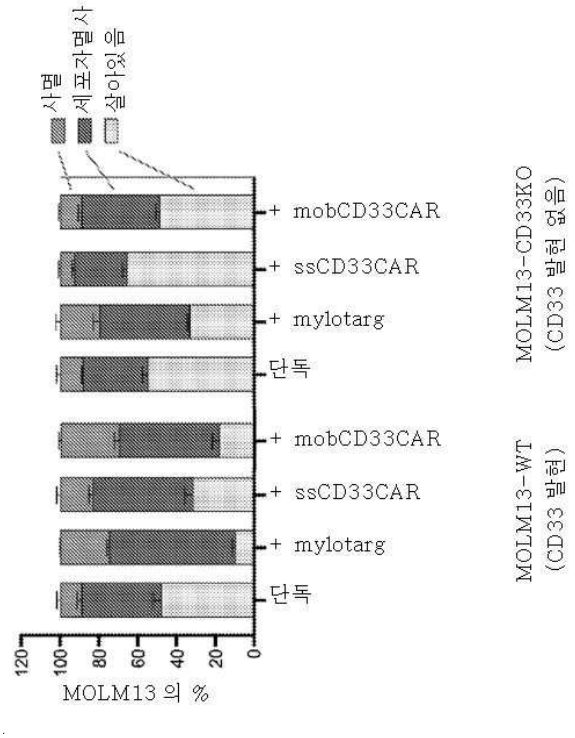
도면7


SS 비활성화
Mob 비활성화
SS 활성화
Mob 활성화
D2
D1
CD3+
CD8+
CD4+
CD137+
PD1+
CD62L+
CD25+
CD69+
0
20
40
60
80
100
CD3+ 세포%

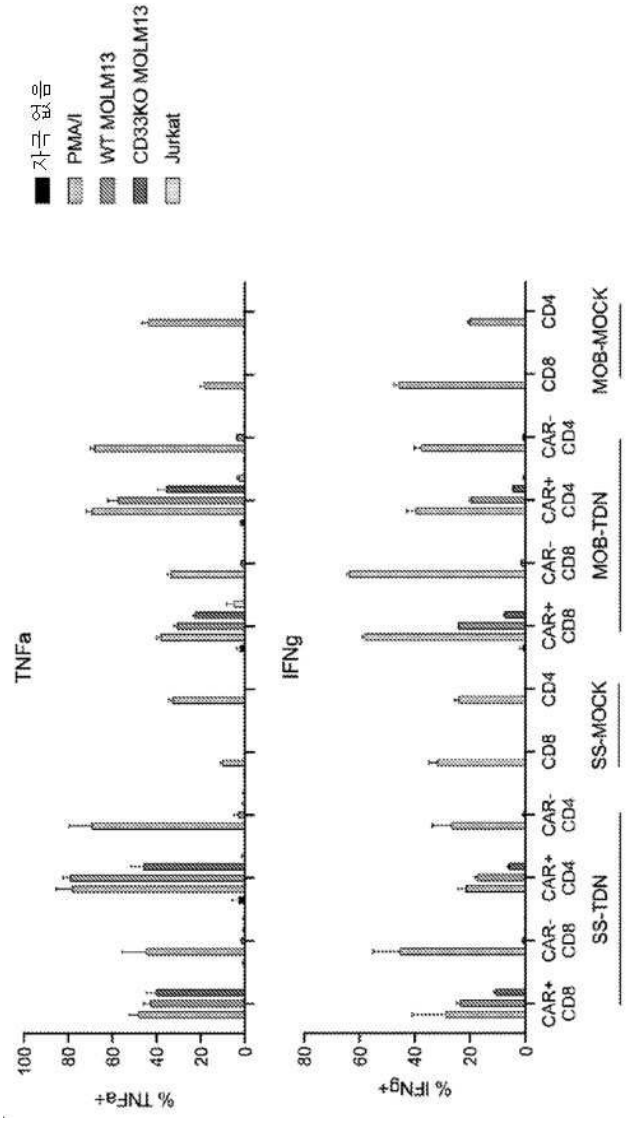
도면8


동원됨
정상 상태
CD3+ 세포%
CD137
PD1
CD62L
CD25
CD69
p = .003
p < .001
비-활성화된 동원(n=6)
활성화된 동원(n=6)
비-활성화된 정상 상태(n=6)
활성화된 정상 상태(n=6)

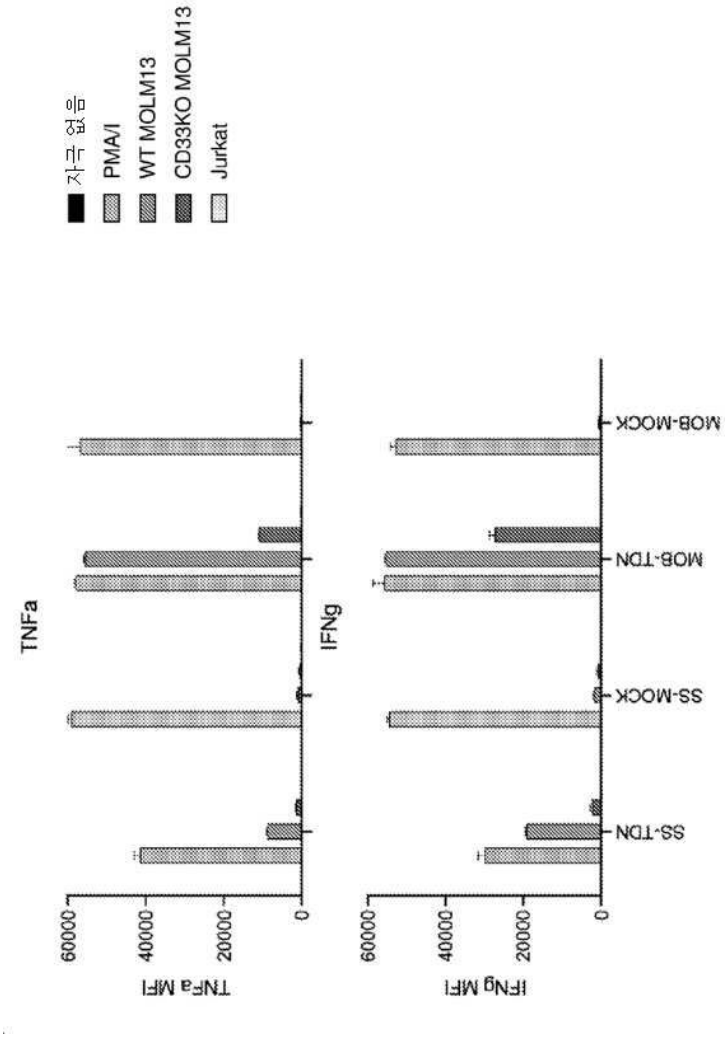
도면9


사멸
세포자멸사
살아있음
+ mobCD33CAR
+ ssCD33CAR
+ mylotarg
단독
+ mobCD33CAR
+ ssCD33CAR
+ mylotarg
단독
MOLM13-CD33KO
(CD33 발현 없음)
MOLM13-WT
(CD33 발현)
120
100
80
60
40
20
0
MOLM13 의 %

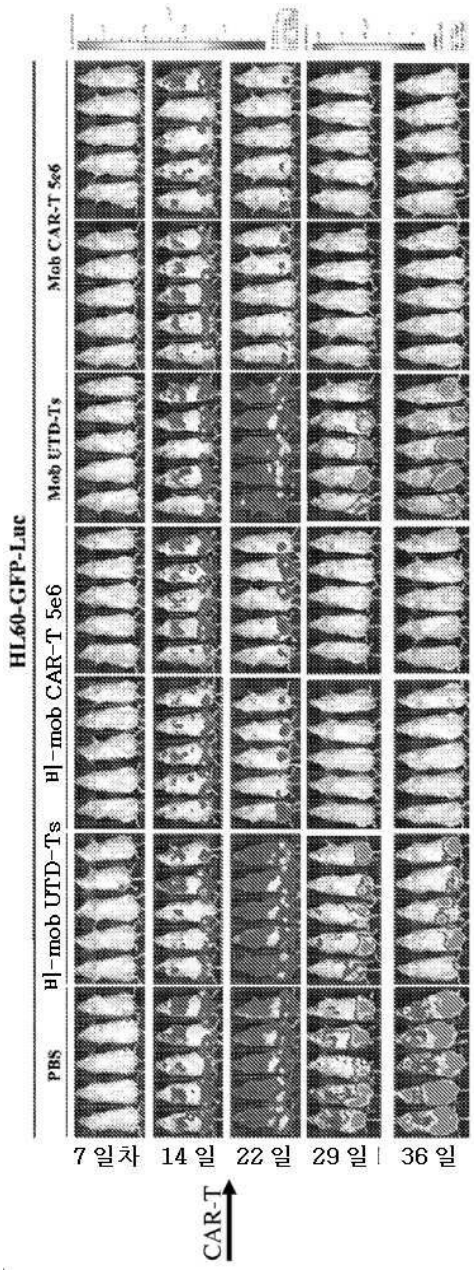
도면10


자극 없음
PMA/I
WT MOLM13
CD33KO MOLM13
Jurkat
TNFa
% TNFa+
IFNg
% IFNg+
CAR+ CD8
CAR- CD8
CAR+ CD4
CAR- CD4
CD8
CD4
SS-TDN
SS-MOCK
MOB-TDN
MOB-MOCK

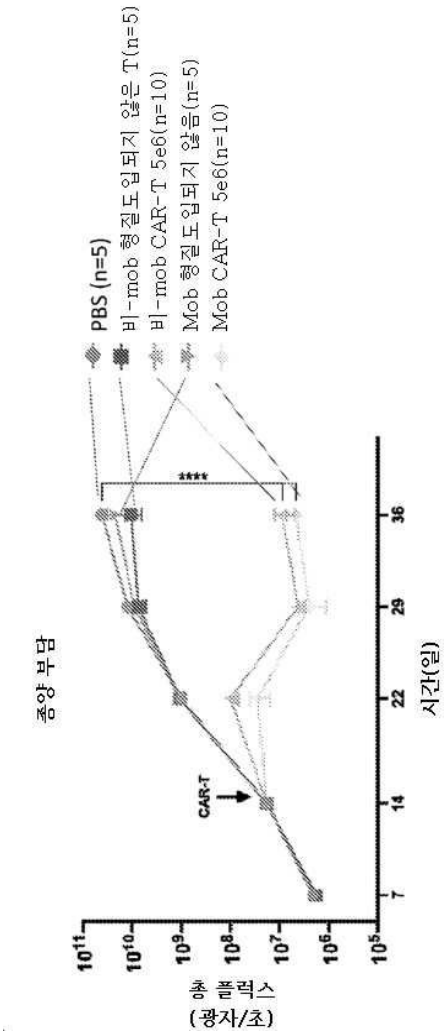
도면11


자극 없음
PMA/I
WT MOLM13
CD33KO MOLM13
Jurkat
TNFa
IFNg
TNFa MFI
IFNg MFI
60000
40000
20000
0
SS-TDN
SS-MOCK
MOB-TDN
MOB-MOCK

도면12


HL60-GFP-Luc
PBS
비-mob UTD-Ts
비-mob CAR-T 5e6
Mob UTD-Ts
Mob CAR-T 5e6
7 일차
14 일
22 일
29 일
36 일
CAR-T

도면12a



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Vor Biopharma Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO GENETICALLY ENGINEERED CELLS EXPRESSING CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS

<130> V0291.70019W000

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 63/229,017

<151> 2021-08-03

<150> US 63/113,739

<151> 2020-11-13

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val

20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly

65 70 75 80

Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser

85 90 95

Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly

115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro

145 150 155 160

Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg

165 170 175

Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe

180 185 190

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser

195 200 205

Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

210 215 220

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala

225 230 235 240

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln

245 250 255

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Gly Ala Ala Ala Ile Glu Val Met

260 265 270

Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile

275 280 285

His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro

290 295 300

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

305 310 315 320

Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp

370 375 380

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn

385 390 395 400

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg

405 410 415

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly

420 425 430

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu

435 440 445

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu

450 455 460

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His

465 470 475 480

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser

485