



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0029632
(43) 공개일자 2023년03월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61P 35/02 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7043770
- (22) 출원일자(국제) 2021년06월03일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년12월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/035691
- (87) 국제공개번호 WO 2021/247856
국제공개일자 2021년12월09일
- (30) 우선권주장
63/033,966 2020년06월03일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
더 트러스티스 오브 컬럼비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
미국 10027 뉴욕주 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로우 메모리얼 라이브러리 412
- (72) 발명자
무케르지 시드하르타
미국 뉴욕주 10011 뉴욕 넘버피에이치비 133 웨스트 17번 스트리트
보로트 플로렌스
미국 뉴욕주 10019 뉴욕 넘버3에스 768 9번 애비뉴
알리 압둘라 마흐무드
미국 뉴저지주 07670 테너플라이 177 서식스 로드
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

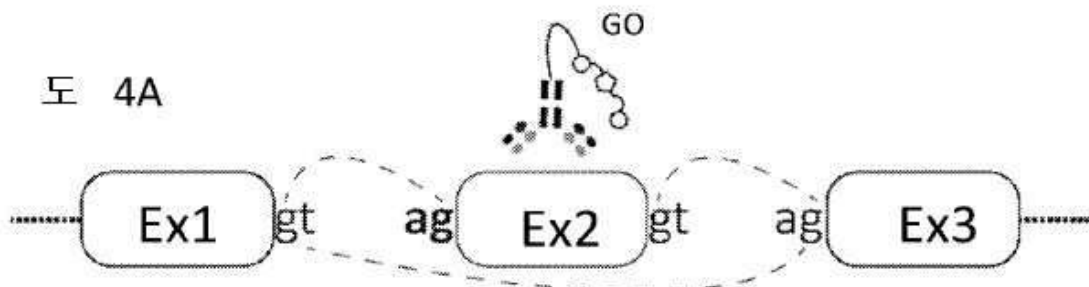
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 발명의 명칭 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 계통 특이적 항원을 저해하기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

혈액 악성종양의 면역요법을 위해, 계통-특이적 세포-표면 항원, 예를 들어, CD33 또는 EMR2를 표적으로 하는 제제, 및 계통-특이적 세포-표면 항원, 예를 들어, CD33 또는 EMR2의 발현에서 변경된 조혈 세포의 집단을 투여하는 방법이 본 명세서에 개시된다. 또한 혈액 악성종양의 면역요법을 위해, 하나 초과와 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제, 및 하나 초과와 계통-특이적 세포-표면 항원의 발현에서 변경된 조혈 세포의 집단을 투여하는 방법이 본 명세서에 개시된다. CD33 또는 EMR2, 또는 하나 초과와 계통-특이적 세포-표면 항원에서 돌연변이를 포함하는 세포가 또한 제공되며, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 이러한 세포를 생산하는 방법도 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
A61P 35/02 (2018.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(30) 우선권주장

63/033,970 2020년06월03일 미국(US)
63/183,791 2021년05월04일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서,

내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자(acceptor) 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 상기 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변경은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부의 뉴클레오타이드 서열에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 변경은 C에서 T로; G에서 A로; A에서 G로; 그리고 T에서 C로의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 5

유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하되, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 변경은 EMR2의 엑손 13에서의 상기 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 변경은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부의 뉴클레오타이드 서열에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 변경은 C에서 T로; G에서 A로; A에서 G로; 그리고 T에서 C로의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 9

유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서,

계통-특이적 항원을 암호화하는 제1 내인성 유전자의 엑손에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위 및 계통-특이적 항원을 암호화하는 제2 내인성 유전자의 엑손에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 상기 제1 내인성 유전자의 상기 엑손에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준 및/또는 상기 제2 내인성 유전자의 상기 엑손에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현을 야기하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제1 내인성 유전자는 CD33이고, 상기 엑손은 엑손 2이며, 상기 제2 내인성 유전자는 EMR2 이고, 상기 엑손은 엑손 13인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 11

유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에서의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환을 포함하되, 상기 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에 포함되며, 상기 뉴클레오타이드 치환은 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하고, 상기 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 유전자에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 야기하며, 상기 에피토프는 면역치료제에 의해 표적화되는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 스플라이스 요소는 스플라이스 수용자, 스플라이스 공여자, 스플라이스 인핸서 및 스플라이스 사일런서로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 13

제11항에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 14

제11항에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 C에서 T로; G에서 A로; A에서 G로; 그리고 T에서 C로의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, CD34+인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포로부터 유래된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 대상체는 건강한 인간 공여자인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 임의의 예측된 비표적 부위에서 돌연변이를 포함하지 않는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 21

복수의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 상기 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 포함하는, 세포 집단.

청구항 22

계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에서의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,

(i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및

(ii) 상기 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계

를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 스플라이스 요소는 스플라이스 수용자, 스플라이스 공여자, 스플라이스 인헨서 및 스플라이스 사일런서로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 유전자에서의 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환은 대안의 스플라이싱을 야기하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 유전자에서의 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환은 대안의 스플라이싱을 야기하고 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 C에서 T로; G에서 A로; A에서 G로; 그리고 T에서 C로의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 28

제22항에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 1 내지 4 및 46 내지 47로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 29

제22항에 있어서, 상기 계통-특이적 항원은 CD33인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 30

제22항에 있어서, 상기 계통-특이적 항원은 EMR2인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 31

제1 계통-특이적 항원 및 제2 계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에서의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,

(i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및

(ii) 상기 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 제1 뉴클레오

타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 제1 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 제1의 촉매적으로 손상된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계, 및

(iii) 추가로, 상기 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 제2 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 제2 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 제2의 촉매적으로 손상된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계

를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 스플라이스 요소는 스플라이스 수용자, 스플라이스 공여자, 스플라이스 인핸서 및 스플라이스 사일런서로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 유전자에서의 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환은 대안의 스플라이싱을 야기하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 유전자에서의 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환은 대안의 스플라이싱을 야기하고 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 C에서 T로; G에서 A로; A에서 G로; 그리고 T에서 C로의 치환으로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 37

제31항에 있어서, 상기 제1 gRNA는 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, 상기 제2 gRNA는 서열번호 4 및 46 내지 47로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 38

제31항에 있어서, 상기 제1 계통-특이적 항원은 CD33이고, 상기 제2 계통-특이적 항원은 EMR2인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 39

제22항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법

청구항 40

제22항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기 편집기는 아데노신 염기 편집기인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 41

제22항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, (a) 및 (b)는 세포 내에 도입된 하나의 벡터 상에서 암호화된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 43

제22항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, (b)는 단백질 형태이고, (a) 및 (b)는 상기 세포에 사전 형성된 리보핵단백질 복합체로서 도입된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 리보핵단백질 복합체는 전기천공법을 통해 세포에 도입된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 45

제22항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 CD34+인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 46

제22항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 유래된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 대상체는 조혈 장애를 갖는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법.

청구항 48

제22항 내지 제47항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

청구항 49

조혈 장애의 치료 방법으로서,

제1항 내지 제20항 및 제48항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 제21항의 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 조혈 장애는 조혈 악성종양인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 유효량의 계통-특이적 항원을 표적으로 하는 제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제제는 계통-특이적 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 계통-특이적 항원을 표적으로 하는 상기 제제는 상기 계통-특이적 항원에 결합하는 상기 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 상기 계통-특이적 항원은 CD33 또는 EMR2인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 유효량의 상기 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항

원을 표적으로 하는 제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제제는 상기 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 상기 면역 세포는 T 세포인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 56

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포, 상기 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 또는 둘 다는 동종이계(allogeneic)인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 57

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포, 상기 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 또는 둘 다 자가(autologous)인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 58

제49항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병 또는 다발성 골수종을 갖는 인간 환자인, 조혈 장애의 치료 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 대상체는 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병 또는 만성 림프모구 백혈병인 백혈병을 갖는 인간 환자인, 조혈 장애의 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2020년 6월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/033,966호; 2020년 6월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/033,970호; 및 2021년 5월 4일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/183,791호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 전문은 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

[0002] **서열목록**

[0003] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용되는 서열목록을 포함한다.

배경 기술

[0004] 표적 면역요법의 출현은 림프모구 백혈병을 갖는 환자에 대한 엄청난 성공을 입증하는 새로운 가능성을 열었다. 그러나, 키메라 항원 T-세포 요법(chimeric antigen T-cell therapy: CAR-T)에 의한 임상 연구는 독특한 표적 가능한 세포 표면 항원의 결여로 인해 CD19-표적 면역요법 이상으로 제한된 성공을 나타냈다. 사실, CD19 면역요법의 성공은 면역글로불린 보충물로 관리될 수 있는 B 세포 무형성증에 달려 있다.

[0005] 그러나, 임의의 표적 면역요법 접근은 암 세포 상에서 독특하게 또는 우선적으로 발현되는 항원을 필요로 한다. 사실, 항원이 면역요법에 대한 이상적인 후보가 되게 하기 위해, 암세포에 고유하고, 이들의 생존에 없어서는 안 되며, 정상 세포 상에서 발현되지 않아야 한다. 지금까지, 암 세포에 대한 진정한 종양 특이적 항원은 발견된 적이 없었다. 암의 경우, 이러한 이상적인 항원이 존재하지 않는 경우에, 계통 특이적이고 악성 세포에 의해 과발현되는 항원의 표적화를 해당 계통 특이적 항원(lineage specific antigen: LSA)을 결여하는 유전자 조작된 줄기 세포의 이식과 조합하는 신규한 접근이 고려되었다.

[0006] 이전에 공개된 작업 및 특허(미국 특허 제10,137,155호)에서, CD33-표적화된 CAR-T 세포 및/또는 AD 겐투주맵 오조가미신(GO)을 이용하는 접근이 계통 특이적 항원을 결실시키기 위해 CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 조작된 CD33 녹아웃(KO) 조혈모세포의 생착 및 재증식(repopulation)에 영향을 미치는 일 없이 CD33+ 급성 골수성 백혈병-보유 마우스를 구조(rescue)할 수 있다는 것이 입증되었다.

[0007] 그러나, CRISPR/WT Cas9에 의한 게놈 편집은 p53-매개 DNA 손상 반응 및 염색체 전좌와 연관된 DNA 이중 가닥

파손(DSB)을 유도한다.

[0008] 따라서, 비표적(off target) 효과 및 약화되는 면역억제 부작용을 야기하지 않는 표적-내성 조혈모세포를 생성하기 위해 상이한 접근이 필요하다.

발명의 내용

[0009] 본 개시내용은 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(예를 들어, 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포)가 계통-특이적 세포-표면 항원을 발현시키는 세포의 세포사를 선택적으로 야기하는 반면, 항원에 대해 결합된 세포(예를 들어, 유전자 조작된 조혈 세포)는 이에 의해 야기되는 세포사를 회피한다는 발견에 적어도 부분적으로 기반한다. 이러한 발견에 기반하여, 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제, 예를 들어, CD33을 표적으로 하는 CAR-T 세포 및 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33)에서 결합되거나 변경된 조혈 세포의 조합을 수반하는 면역요법이 조혈 악성종양 치료의 효능있는 방법을 제공할 것임이 예상되었다.

[0010] 에피토프를 결합하거나 또는 항체 및 키메라 항원 수용체 T-세포(CAR-T)를 포함하는 치료제에 의해 표적화되는 변형된 에피토프를 포함하는 HSC인 표적-내성 조혈모세포를 생성하기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기의 용도가 본 명세서에 기재된다. 이 접근은 추가로 표적화된 면역요법과 염기 편집기에 의해 생성된 표적화-내성 조혈모세포의 이식의 조합에 의해 혈액 악성종양을 갖는 환자의 치료를 가능하게 하고 CRISPR/WT Cas9 게놈 편집의 잠재적 게놈독성을 피할 것이다. 이런 신규한 접근은 CRISPR-기반 사이토신 및 아데닌 염기 편집기(CBE 및 ABE)를 이용하여 HSC/HSPC의 높은 편집 효율을 가능하게 한다. CBE 및 ABE는 DSB를 생성하는 일 없이 표적 영역에서 정확한 염기 치환을 가능하게 하는 각각 사이티딘 또는 아데노신 데아미나제에 융합되는 Cas9 틸대기효소이다. 이들이 DSB를 피하기 때문에, 염기 편집기는 DSB로부터 초래되는 원치않는 삽입결실, 전좌 또는 재배열을 제거하는 보다 안전한 편집 도구인 것으로 간주된다.

[0011] 일 양상에서, 본 개시내용은 유전자 조작 전에 조혈 세포 상에 제시되는 계통-특이적 세포-표면 항원에서 결합된 유전자 조작된 조혈 세포(예를 들어, HSC)를 제공한다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자의 전부 또는 일부는, 예를 들어, 염기 편집기(예를 들어, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 수반)를 이용하여 게놈 편집에 의해 결실된다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자로부터의 엑손을 결실한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자에서의 뉴클레오타이드 치환을 초래한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에서 이되, 뉴클레오타이드 치환은 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 내인성 유전자에서 스플라이스 요소를 표적으로 하되, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵(skip)되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 초기 코돈 종결을 유도한다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 요소는 스플라이스 공여자(donor), 스플라이스 수용자(acceptor), 스플라이스 인핸서 또는 스플라이스 사일런서이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 아데닌 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다.

[0012] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이다. 일부 실시형태에서, CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위는 변경된다. 일부 실시형태에서, CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 변경된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33의 SNP인 rs12459419를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 37을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 1 내지

3 중 어느 하나를 포함하는 서열을 갖는다.

- [0013] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이다. 일부 실시형태에서, EMR2의 엑손 13에서 스플라이스 공여자 부위는 변경된다. 일부 실시형태에서, EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 변경된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 40을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 4 또는 46 내지 47 중 어느 하나를 포함하는 서열을 갖는다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 조혈모세포(예를 들어, $CD34^+/CD33^{\Delta 2}$ 세포 또는 $CD34^+/EMR^{\Delta 13}$)이다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 조혈모세포는 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 얻을 수 있다.
- [0016] 일부 양상에서, 본 개시내용은 제1 계통-특이적 세포 표면 항원 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원, 즉, 제2 계통-특이적 세포-표면 항원, 제3 계통-특이적 세포-표면 항원, 제4 계통-특이적 세포 표면 항원 등의 조합된 저해를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 또한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 조혈 세포에서 결실 또는 저해된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 내인성 유전자의 전부 또는 일부는, 예를 들어, 염기 편집기(예를 들어, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 수반)를 이용하여 게놈 편집에 의해 결실된다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 내인성 유전자로부터의 엑손을 결실한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 내인성 유전자에서의 뉴클레오타이드 치환을 초래한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에서의이되, 뉴클레오타이드 치환은 유전자(들)에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 내인성 유전자(들)에서의 스플라이스 요소를 표적으로 하되, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 유전자(들)에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 초기 코돈 종결을 유도한다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 요소는 스플라이스 공여자, 스플라이스 수용자, 스플라이스 인핸서 또는 스플라이스 사일런서이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 아데닌 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 아데닌 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 제1 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원 또는 제2 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 하나 초과 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 결실 또는 저해된다. 일부 실시형태에서, 하나 초과 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33 및 EMR2와 상이하다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 조혈모세포(예를 들어, $CD34^+/CD33^{\Delta 2}/EMR^{\Delta 13}$ 세포)이다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 조혈모세포는 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 얻을 수 있다.
- [0022] 일부 양상에서, 본 개시내용은 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공한다. 본 개시내용의 일 양상은 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하되, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 야생형 상대와 비교할 때, CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 갖는다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 야생형 상대에 의해 발현된 CD33 에피

토프의 10% 미만을 발현시킨다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD33의 에피토프를 발현시키지 않는다. 일부 실시형태에서, CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위는 변경된다. 일부 실시형태에서, CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 변경된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD34⁺이다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 대상체(예를 들어, 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자 또는 건강한 공여자)의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포로부터 유래된다.

[0023] 일부 양상에서, 본 개시내용은 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공한다. 본 개시내용의 일 양상은 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하되, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 야생형 상대와 비교할 때, EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 갖는다. 본 개시내용의 일 양상은 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하되, 변경된 스플라이스 공여자 부위는 야생형 상대와 비교할 때, 초기 코돈 종결 및 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 생산을 유도한다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 EMR2의 에피토프를 발현시키지 않는다. 일부 실시형태에서, EMR2의 엑손 13에서 스플라이스 공여자 부위는 변경된다. 일부 실시형태에서, EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 변경된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD34⁺이다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 대상체(예를 들어, 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자 또는 건강한 공여자)의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포로부터 유래된다.

[0024] 일부 양상에서, 본 개시내용은 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 엑손에서의 변경된 스플라이스 요소를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공한다. 본 개시내용의 일 양상은 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하되, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 야생형 상대와 비교할 때 CD33의 엑손에 의해 암호화된 에피토프 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 발현 수준을 감소시켰다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD33의 엑손에 의해 암호화된 에피토프 및/또는 야생형 상대에 의해 발현되는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 10% 미만을 발현시킨다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD34⁺이다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 대상체(예를 들어, 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자 또는 건강한 공여자)의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포로부터 유래된다.

[0025] 일부 양상에서, 본 개시내용은 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위 및 내인성 EMR2의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공한다. 본 개시내용의 일 양상은 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하되, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는, 야생형 상대와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프 및/또는 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 갖는다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프 및/또는 야생형 상대에 의해 발현되는 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 10% 미만을 발현시킨다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 야생형 상대와 비교할 때 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 EMR2 생산에서 초기 코돈 종결을 유도한다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD34⁺이다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 대상체(예를 들어, 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자 또는 건강한 공여자)의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포로부터 유래된다.

[0026] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 포함하는 세포 집단을 제공한다.

- [0027] 다른 양상에서, 본 개시내용은 (i) 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및 (ii) 상기 세포에 (a) 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA), 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소, 즉, Cas9 틱내기효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질을 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 단계를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0028] 다른 양상에서, 본 개시내용은 (i) 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및 (ii) 상기 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 가이드 RNA(gRNA), 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소, 즉, Cas9 틱내기효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질을 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 단계를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 방법을 제공한다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자로부터의 엑손을 결실한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자에서의 뉴클레오타이드 치환을 초래한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에서이되, 뉴클레오타이드 치환은 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 내인성 유전자에서 스플라이스 요소를 표적으로 하되, 상기 방법은 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 한다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 요소는 스플라이스 공여자, 스플라이스 수용자, 스플라이스 인핸서 또는 스플라이스 사일렌서이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 아데닌 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 CD33의 엑손 2에 측정하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 37을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 세포에 도입된 하나의 벡터 상에서 암호화된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 사전 형성된 리보핵단백질 복합체로서 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 리보핵단백질 복합체는 전기천공법을 통해 세포에 도입된다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 EMR2의 엑손 13에 측정하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 4, 서열번호 46 및/또는 서열번호 47에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 40을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 세포에 도입된 하나의 벡터 상에서 암호화된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 사전 형성된 리보핵단백질 복합체로서 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 리보핵단백질 복합체는 전기천공법을 통해 세포에 도입된다.
- [0032] 다른 양상에서, 본 개시내용은, (i) 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및 (ii) 세포에 (a) 제1 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA) 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소, 즉, Cas9 틱내기효소에 융합된 촉매적으로 융합된 손상된 Cas 단백질을 도입하는 단계를 포함하고, 추가로 세포에 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제2 가이드 RNA(gRNA), 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소, 즉, Cas9 틱내기효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질을 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 단계를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포의 생산 방법을 제공한다.
- [0033] 다른 양상에서, 본 개시내용은, (i) 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및 (ii) 세포에 (a)

제1 계통-특이적 세포-표면 항원의 스플라이스 요소를 포함하는 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 가이드 RNA(gRNA), 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소, 즉, Cas9 틱대기효소에 융합된 촉매적으로 융합된 손상된 Cas 단백질을 도입하는 단계를 포함하고, 추가로 세포에 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 게놈 내에서 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 제2 가이드 RNA(gRNA), 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소, 즉, Cas9 틱대기효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질을 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 단계를 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포의 생산 방법을 제공한다.

- [0034] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 CD33의 엑손 2에 축적하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 1, 서열번호 2 및/또는 서열번호 3에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 37을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다.
- [0035] 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 세포에 도입된 하나의 벡터 상에서 암호화된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 사전 형성된 리보핵단백질 복합체로서 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 리보핵단백질 복합체는 전기천공법을 통해 세포에 도입된다.
- [0036] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 EMR2의 엑손 13에 축적하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열번호 4, 서열번호 46 및/또는 서열번호 47에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 40을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 세포에 도입된 하나의 벡터 상에서 암호화된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, DNA-변형 효소에 융합된 gRNA 및 촉매적으로 손상된 Cas 단백질은 사전 형성된 리보핵단백질 복합체로서 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 리보핵단백질 복합체는 전기천공법을 통해 세포에 도입된다.
- [0037] 본 개시내용은 또한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 이용하여 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 계통-특이적 세포-표면 항원의 에피토프 발현을 감소시키기 위한 본 명세서에 기재된 gRNA의 용도를 제공한다.
- [0038] 본 개시내용은 또한, 일부 양상에서, 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포의 샘플에서의 계통-특이적 세포-표면 항원의 에피토프 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도를 제공한다.
- [0039] 본 개시내용은 또한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 이용하여 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 CD33의 에피토프 발현을 감소시키기 위한 본 명세서에 기재된 gRNA의 용도를 제공한다.
- [0040] 본 개시내용은 또한 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 CD33의 에피토프 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도를 제공한다.
- [0041] 본 개시내용은 또한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 이용하여 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 EMR2의 에피토프 발현을 감소시키기 위한 본 명세서에 기재된 gRNA의 용도를 제공한다.
- [0042] 본 개시내용은 또한 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 EMR2의 에피토프 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도를 제공한다.
- [0043] 본 개시내용은 또한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 이용하여 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 CD33 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 발현을 감소시키기 위한 본 명세서에 기재된 gRNA의 용도를 제공한다.
- [0044] 본 개시내용은 또한 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포 샘플에서의 CD33 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도를 제공한다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통 특이적 항원은 EMR2이다.

- [0046] 일부 실시형태에서, gRNA는 단일-분자 가이드 RNA(sgRNA)이다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 CD34⁺이다. 일부 실시형태에서, 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포는 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 조혈 장애를 갖는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 건강한 HLA-매칭 공여자이다.
- [0048] 본 개시내용은, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공한다.
- [0049] 다른 양상에서, 본 개시내용은 유효량의 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 장애의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조혈 장애는 조혈 악성종양이다.
- [0050] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하는 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포이다.
- [0051] 일부 양상에서, 본 개시내용은 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단을 제공하되, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 것을 더 포함하며, 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0052] 일부 양상에서, 본 개시내용은 CD33을 표적으로 하는 제제를 제공하되, 제제는 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하고, 치료하는 것은 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제를 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 유효량의 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 것을 더 포함한다.
- [0053] 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단, 및 CD33을 표적으로 하는 제제의 조합물로서, 상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하고, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단, 및 CD33에 결합하는 제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 조합물.
- [0054] 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 CD33을 표적으로 하는 제제와 병행하여 투여된다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 CD33을 표적으로 하는 제제 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 전에 투여된다.
- [0055] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포, 또는 둘 다는 동종이계(allogeneic)이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포, 또는 둘 다는 자가(autologous)이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체에서 항원-결합 단편은 인간 CD33에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 단편(scFv)이다.
- [0056] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 유효량의 EMR2를 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 제제는 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, EMR2를 표적으로 하는 제제는 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포이다.
- [0057] 일부 양상에서, 본 개시내용은 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단을 제공하되, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 유효량의 EMR2를 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 것을 더 포함하며, 제제는 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다.
- [0058] 일부 양상에서, 본 개시내용은 EMR2를 표적으로 하는 제제를 제공하되, 제제는 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하고, 치료하는 것은 유효량의 EMR2를 표적으로 하는 제제를 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 유효량의 본 명세서에 기재된 유전자 조작

된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 것을 더 포함한다.

- [0059] 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단, 및 EMR2를 표적으로 하는 제제의 조합물로서, 상기 제제는 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하고, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단, 및 EMR2에 결합하는 제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 조합물.
- [0060] 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 EMR2를 표적으로 하는 제제와 병행하여 투여된다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 EMR2를 표적으로 하는 제제 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, EMR2를 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 전에 투여된다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포, 또는 둘 다는 동종이계이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포, 또는 둘 다는 자가이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체에서 항원-결합 단편은 인간 EMR2에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 단편(scFv)이다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함) 및 유효량의 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하는 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, CD33 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 CD33 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포이다.
- [0063] 일부 양상에서, 본 개시내용은 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단을 제공하되, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함) 및 유효량의 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)를 대상체에게 투여하는 것을 더 포함한다.
- [0064] 일부 양상에서, 본 개시내용은 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 CD33을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함) 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)를 제공하되, 치료하는 것은 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제, 및 유효량의 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)를 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 유효량의 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0065] 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단 및 CD33을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함) 및 유효량의 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)의 조합물로서, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 및 CD33에 결합하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 제제를 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 조합물.

- [0066] 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하고 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 표적으로 하는 제제, 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하고 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제는 동일한 제제이다. 일부 실시형태에서, 제제는 CD33 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 면역 세포이다.
- [0067] 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 CD33을 표적으로 하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제와 병행하여 투여된다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 CD33을 표적으로 하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, CD33을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 전에 투여되고 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 후에 투여된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 전에 투여되고, CD33을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 후에 투여된다.
- [0068] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포, 또는 둘 다는 동종이계이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포, 또는 둘 다는 자가이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체에서 항원-결합 단편은 인간 CD33 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 단편(scFv)이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체에서 항원-결합 단편은 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 단편(scFv)이다.
- [0069] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이다.
- [0070] 일부 실시형태에서, CD33 및/또는 EMR2 및/또는 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단에서 변경되거나, 발현이 감소되거나 결실된 에피토프를 표적으로 하며, 제제와 함께 투여된다.
- [0071] 일부 실시형태에서, 대상체는 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병 또는 다발성 골수종을 갖는 인간 환자이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병 또는 만성 림프모구 백혈병인 백혈병을 갖는 인간 환자이다.
- [0072] 본 명세서의 조성물 및 방법의 특징은 또한 다음에 열거되는 실시형태에 기재된다.
- [0073] 1. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에서의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환을 포함하되, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에 포함되며, 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하되, 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 유전자에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 야기하며, 에피토프는 면역치료제에 의해 표적화되는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0074] 2. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 상기 스플라이스 요소는 스플라이스 수용자, 스플라이스 공여자, 스플라이스 인핸서 및 스플라이스 사일런서로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0075] 3. 실시형태 1 또는 2에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0076] 4. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0077] 5. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환 또는 "G"의 "A"으로의 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0078] 6. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환 또는 "T"의 "C"으로의 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

- [0079] 7. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0080] 8. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 상기 에피토프의 상기 감소된 발현 수준은 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이들로부터 말단 분화된) 세포에서의 발현 수준이며, 상기 야생형 상대 세포는 야생형 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이들로부터 말단 분화된) 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0081] 9. 실시형태 8에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포는 골수아세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0082] 10. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0083] 11. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 수준의 20% 미만인 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0084] 12. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 CD33의 엑손 2의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0085] 13. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부의 뉴클레오타이드 서열에서의 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0086] 14. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0087] 15. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0088] 16. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0089] 17. 실시형태 10 내지 16에 있어서, 상기 변경은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0090] 18. 실시형태 10 내지 17에 있어서, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준(예를 들어, 야생형 상대 세포 수준의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만)을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0091] 19. 실시형태 10 내지 18에 있어서, CD33의 에피토프의 상기 감소된 발현 수준은 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포에서의 발현 수준이며, 상기 야생형 상대 세포는 야생형 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0092] 20. 실시형태 19에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포는 골수아세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0093] 21. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하되 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

- [0094] 22. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하되, 상기 변경된 스플라이스 공여자 부위는 야생형 상대와 비교할 때 초기 코돈 종결 및 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 생산을 유도하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0095] 23. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하되, 상기 변경은 EMR2의 엑손 13의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0096] 24. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하되, 상기 변경은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부의 뉴클레오타이드 서열에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0097] 25. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 포함하되, 상기 변경은 서열번호 4 또는 46 내지 47 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0098] 26. 실시형태 21 내지 25에 있어서, 상기 변경은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0099] 27. 실시형태 21 내지 25에 있어서, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준(예를 들어, 야생형 상대 세포 수준의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만)을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0100] 28. 실시형태 21 내지 26에 있어서, EMR2의 에피토프의 상기 감소된 발현 수준은 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포에서의 발현 수준이며, 상기 야생형 상대 세포는 야생형 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0101] 29. 실시형태 29에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포는 골수아세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0102] 30. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, CD34+인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0103] 31. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0104] 32. 실시형태 31에 있어서, 상기 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0105] 33. 실시형태 31에 있어서, 상기 대상체는 건강한 인간 공여자(예를 들어, HLA-매칭 공여자)인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0106] 34. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에서의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환(상기 뉴클레오타이드 치환이 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에 포함되며 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하고 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 유전자에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 야기하며 에피토프는 면역치료제에 의해 표적화됨) 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에서의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 치환(상기 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에 포함되며 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하고 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 항원을 암호화하는 유전자에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 야기하며 에피토프 둘 다 면역치료제(들)에 의해 표적화됨)을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0107] 35. 실시형태 34에 있어서, 상기 스플라이스 요소는 스플라이스 수용자, 스플라이스 공여자, 스플라이스 인핸서 및 스플라이스 사이런서로 이루어진 군으로부터 선택된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0108] 36. 실시형태 34 또는 35에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

- [0109] 37. 실시형태 34 또는 35에 있어서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0110] 38. 실시형태 34 내지 37에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환 또는 "G"의 "A"으로의 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0111] 39. 실시형태 34 내지 37에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환 또는 "T"의 "C"으로의 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0112] 40. 실시형태 34 내지 39에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 치환은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0113] 41. 실시형태 34 내지 40에 있어서, 에피토프의 상기 감소된 발현 수준은 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포에서의 발현 수준이며, 상기 야생형 상대 세포는 야생형 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0114] 42. 실시형태 41에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포는 골수아세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0115] 43. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자의 엑손에서의 변경된 요소의 변경인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0116] 44. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하되, 상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위 및 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이되, 상기 변경은 EMR2의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0117] 45. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하고(상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고, 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래함), 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 더 포함하는(상기 변경은 EMR2의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하고/하거나 야생형 상대 세포와 비교할 때 초기 코돈 종결 및 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 생산을 유도함), 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0118] 46. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하고(상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어짐), 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 더 포함하는(상기 변경은 EMR2의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고, 서열번호 4 또는 46 내지 47 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어짐), 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0119] 47. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하고(상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어짐), 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 더 포함하는(상기 변경은 EMR2의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고, 서열번호 4 또는 46 내지 47 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어짐), 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.

- [0120] 48. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 포함하고(상기 변경은 CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어짐), 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자 부위를 더 포함하는(상기 변경은 EMR2의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위에서의 뉴클레오타이드 치환이고, 서열번호 4 또는 46 내지 47 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA의 사용에 의해 이루어짐), 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0121] 49. 실시형태 43 내지 48에 있어서, 상기 변경(들)은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0122] 50. 실시형태 43 내지 49에 있어서, 상기 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준(예를 들어, 야생형 상대 세포 수준의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만) 및/또는 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준(예를 들어, 야생형 상대 세포 수준의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만)을 초래하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0123] 51. 실시형태 43 내지 50에 있어서, 야생형 상대에 의해 발현된 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 20% 미만 및/또는 야생형 상대에 의해 발현된 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 20% 미만을 발현시키는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0124] 52. 실시형태 43 내지 51에 있어서, CD33 및/또는 EMR2의 에피토프의 상기 감소된 발현 수준은 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포에서의 발현 수준이며, 상기 야생형 상대 세포는 야생형 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0125] 53. 실시형태 52에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포는 골수아세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해 세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0126] 54. 실시형태 34 내지 53에 있어서, CD34+인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0127] 55. 실시형태 34 내지 53에 있어서, 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0128] 56. 실시형태 55에 있어서, 상기 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0129] 57. 실시형태 55에 있어서, 상기 대상체는 건강한 인간 공여자(예를 들어, HLA-매칭 공여자)인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0130] 58. 실시형태 43 내지 57에 있어서, 내인성 CD33 유전자를 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 촉매적으로 손상된 CRISPR 엔도뉴클레아제와 접촉시키는 단계 및 내인성 EMR2 유전자를 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 촉매적으로 손상된 CRISPR 엔도뉴클레아제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 이루어진, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0131] 59. 선행하는 실시형태 중 어느 것에 있어서, 임의의 예측된 비표적 부위에서 돌연변이를 포함하지 않는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0132] 60. 선행하는 실시형태 중 어느 것의 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 포함하는(예를 들어, 조혈모세포, 조혈 선조 세포 또는 이들의 조합을 포함하는), 세포 집단.
- [0133] 61. 내인성 CD33 유전자의 엑손 2의 결실 또는 변경 및 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13의 결실 또는 변경을 포함하는, 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 포함하는, 세포집단.
- [0134] 62. 실시형태 61에 있어서, 하나 이상의 비조작된 CD33 유전자 및/또는 비조작된 EMR2 유전자를 포함하는 하나 이상의 세포를 더 포함하는, 세포 집단.
- [0135] 63. 실시형태 61 내지 62에 있어서, CD33의 경우 동형 접합적 야생형이고/이거나 EMR2의 경우 동형 접합적 야생형인 하나 이상의 세포를 더 포함하는, 세포 집단.

- [0136] 64. 실시형태 61 내지 63 중 어느 것에 있어서, CD33의 경우 이형 접합적 야생형이고/이거나 EMR2의 경우 이형 접합적 야생형인 하나 이상의 세포를 더 포함하는, 세포 집단.
- [0137] 65. 실시형태 61 내지 64 중 어느 것에 있어서, CD33 및/또는 EMR2의 상기 감소된 발현 수준은 상기 조절 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포에서의 발현 수준이며, 상기 야생형 상대 세포는 야생형 조절 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된(예를 들어, 이로부터 말단 분화된) 세포인, 세포 집단.
- [0138] 66. 실시형태 65에 있어서, 상기 조절 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포는 골수아세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해 세포인, 세포 집단.
- [0139] 67. 실시형태 61 내지 66 중 어느 것에 있어서, 조절모세포 및 조절 선조 세포를 포함하는, 세포 집단.
- [0140] 68. 실시형태 1 내지 59 중 어느 것의 유전자 조작된 조절 줄기 세포 또는 선조 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0141] 69. 실시형태 60 내지 67 중 어느 것의 세포 집단을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0142] 70. 실시형태 1 내지 33 중 어느 것의 유전자 조작된 조절 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 중 어느 것의 세포 집단의 제조 방법으로서,
- [0143] (i) 조절 줄기 세포 또는 선조 세포(예를 들어, 야생형 조절 줄기 세포 또는 선조 세포)를 제공하는 단계, 및
- [0144] (ii) 상기 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조절 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 가이드 RNA(gRNA), 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 DNA-변형 효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질을 도입하여, 유전자 조작된 조절 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0145] 를 포함하는, 방법.
- [0146] 71. 실시형태 34 내지 59 중 어느 것의 유전자 조작된 조절 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 중 어느 것의 세포 집단의 제조 방법으로서,
- [0147] (i) 조절 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및
- [0148] (ii) 상기 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조절 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 제1 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 제1 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 제1의 촉매적으로 손상된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계, 및
- [0149] (iii) 추가로, 세포에 (a) 스플라이스 요소를 포함하는 조절 줄기 세포 또는 선조 세포의 게놈 내에서 제2 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 제2 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 제2의 촉매적으로 손상된 Cas9 엔도뉴클레아제)를 도입하여, 유전자 조작된 조절 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0150] 를 포함하는, 방법.
- [0151] 72. 실시형태 70 내지 71에 있어서, 상기 방법은 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 내인성 유전자(들)에서의 뉴클레오타이드 치환을 초래하는, 방법.
- [0152] 73. 실시형태 70 내지 72 중 어느 것에 있어서, 상기 방법은 내인성 유전자(들)에서의 스플라이스 요소를 표적으로 하되, 상기 방법은 유전자(들)에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하는, 방법.
- [0153] 74. 실시형태 70 내지 73 중 어느 것에 있어서, 상기 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 하는, 방법.
- [0154] 75. 실시형태 70 내지 73 중 어느 것에 있어서, 상기 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 하는, 방법.
- [0155] 76. 실시형태 70 내지 75 중 어느 것에 있어서, 상기 스플라이스 요소(들)는 스플라이스 공여자, 스플라이스 수용자, 스플라이스 인핸서 또는 스플라이스 사일런서인, 방법.
- [0156] 77. 실시형태 70 내지 76 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기(들)는 사이토신 염기 편집기인, 방법.

- [0157] 78. 실시형태 70 내지 76 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기(들)는 아데닌 염기 편집기인, 방법.
- [0158] 79. 실시형태 70 내지 78 중 어느 것에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제(들)는 Cas9 틱내기효소인, 방법.
- [0159] 80. 실시형태 77에 있어서, 상기 사이토신 염기 편집기(들)는 BE4Max인, 방법.
- [0160] 81. 실시형태 78에 있어서, 상기 아데노신 염기 편집기(들)는 ABE8e인, 방법.
- [0161] 82. 실시형태 70 내지 81 중 어느 것에 있어서, 상기 대안의 스플라이싱은 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현을 초래하는, 방법.
- [0162] 83. 실시형태 70 내지 81 중 어느 것에 있어서, 상기 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 및/또는 초기 코돈 종결 및 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 생산을 초래하는, 방법.
- [0163] 84. 서열번호 1 내지 4 및 46 내지 47 중 어느 것의 서열, 또는 이의 역보체, 또는 앞서 언급한 것 중 어느 것에 대해 적어도 90% 또는 95% 동일성을 갖는 서열 또는 앞서 언급한 것 중 어느 것에 대해 1, 2 또는 3개 이하의 돌연변이를 갖는 서열을 포함하는, 가이드 리보핵산(gRNA).
- [0164] 85. 실시형태 84에 있어서, 하나 이상의 화학적 변형(예를 들어, 핵염기, 당 또는 골격 부분에 대한 화학적 변형)을 포함하는, gRNA.
- [0165] 86. 실시형태 84 및 85 중 어느 것에 있어서, Cas9에 결합하는, gRNA.
- [0166] 87. 서열번호 1 내지 3을 포함하는 gRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 gRNA 및 이들의 조합, 또는 gRNA를 암호화하는 핵산을 포함하는, 키트 또는 조성물.
- [0167] 88. 실시형태 87에 있어서, 제2 gRNA, 또는 제2 gRNA를 암호화하는 핵산을 더 포함하되, 상기 제2 gRNA는 CD33이 아닌 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는, 키트.
- [0168] 89. 실시형태 88에 있어서, 제2 gRNA는 EMR2를 표적으로 하는, 키트 또는 조성물.
- [0169] 90. 실시형태 89 및 90 중 어느 것에 있어서, 상기 제2 gRNA는 서열번호 4 또는 46 내지 47 중 어느 하나를 포함하는, 키트 또는 조성물.
- [0170] 91. 실시형태 88 내지 90 중 어느 것에 있어서, 제3 gRNA, 또는 상기 제3 gRNA를 암호화하는 핵산을 더 포함하는, 키트 또는 조성물.
- [0171] 92. 실시형태 91에 있어서, 상기 제3 gRNA는 CD33 및 EMR2가 아닌 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는, 키트 또는 조성물.
- [0172] 93. 실시형태 87 내지 92 중 어느 것에 있어서, 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 하나 이상의 촉매적으로 손상된 CRISPR 엔도뉴클레아제를 더 포함하는, 키트 또는 조성물.
- [0173] 94. 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포의 샘플에서 CD33의 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도로서, gRNA는 서열번호 1 내지 3을 포함하는, 용도.
- [0174] 95. 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포의 샘플에서 EMR2의 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도로서, gRNA는 서열번호 4 및 46 내지 47을 포함하는, 용도.
- [0175] 96. 조혈 세포 줄기 또는 선조 세포의 샘플에서 CD33 및/또는 EMR2의 발현을 감소시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도로서, gRNA는 서열번호 1 내지 4 및 46 내지 47을 포함하는, 용도.
- [0176] 97. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,
- [0177] (i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및
- [0178] (ii) 세포에 (a) 서열번호 1 내지 3을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 gRNA에 결합하는 뉴클레아제(예를 들어, 엔도뉴클레아제)에 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0179] 를 포함하는, 방법.
- [0180] 98. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,

- [0181] (i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및
- [0182] (ii) 세포에 (a) 서열번호 1 내지 3에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 테아미나제(염기 편집기)에 융합된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0183] 를 포함하는, 방법.
- [0184] 99. 실시형태 97 및 98에 있어서, 상기 gRNA 서열은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부를 표적으로 하는, 방법.
- [0185] 100. 실시형태 97 내지 99에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 37을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는, 방법.
- [0186] 101. 실시형태 97 내지 100 중 어느 것에 있어서, 상기 방법은 CD33의 엑손 2의 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에서 뉴클레오타이드 치환을 초래하고, 상기 뉴클레오타이드 치환은 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하는, 방법.
- [0187] 102. 실시형태 101에 있어서, 상기 전사체의 상기 대안의 스플라이싱은 CD33의 엑손 2의 에피토프의 감소된 발현을 초래하는, 방법.
- [0188] 103. 실시형태 97 내지 102 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기이고, BE4max인, 방법.
- [0189] 104. 실시형태 97 내지 102 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기는 아데노신 염기 편집기이고, ABE8e인, 방법.
- [0190] 105. 실시형태 97 내지 104 중 어느 것에 있어서, 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2의 에피토프의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 초래하는, 방법.
- [0191] 106. 실시형태 97 내지 105 중 어느 것에 있어서, 복수의 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 상에서 수행되는, 방법.
- [0192] 107. 실시형태 97 내지 106 중 어느 것에 있어서, 실시형태 60 내지 67 중 어느 것에 따른 세포 집단을 생산하는, 방법.
- [0193] 108. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,
- [0194] (i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및
- [0195] (ii) 세포에 (a) 서열번호 4 또는 46 내지 47을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 테아미나제(염기 편집기)에 융합된 gRNA에 결합하는 뉴클레아제(예를 들어, 엔도뉴클레아제)에 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0196] 를 포함하는, 방법.
- [0197] 109. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,
- [0198] (i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 제공하는 단계, 및
- [0199] (ii) 세포에 (a) 서열번호 4 또는 46 내지 47에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 테아미나제(염기 편집기)에 융합된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0200] 를 포함하는, 방법.
- [0201] 110. 실시형태 108 및 109에 있어서, 상기 gRNA 서열은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부를 표적으로 하는, 방법.
- [0202] 111. 실시형태 108 내지 110에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 40을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는, 방법.
- [0203] 112. 실시형태 108 내지 111 중 어느 것에 있어서, 상기 방법은 EMR2의 엑손 13의 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에서 뉴클레오타이드 치환을 초래하고, 상기 뉴클레오타이드 치환은 상기 유전자에 의해 암호화된 전

사체의 대안의 스플라이싱을 초래하는, 방법.

- [0204] 113. 실시형태 112에 있어서, 상기 전사체의 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13의 에피토프의 감소된 발현을 초래하고/하거나 초기 코돈 종결 및 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 생산을 유도하는, 방법.
- [0205] 114. 실시형태 108 내지 112 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기이고, BE4max인, 방법.
- [0206] 115. 실시형태 108 내지 112 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기는 아데노신 염기 편집기이고, ABE8e인, 방법.
- [0207] 116. 실시형태 108 내지 115 중 어느 것에 있어서, 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13의 에피토프의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 초래하는, 방법.
- [0208] 117. 실시형태 108 내지 116 중 어느 것에 있어서, 복수의 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 상에서 수행되는, 방법.
- [0209] 118. 실시형태 108 내지 117 중 어느 것에 있어서, 실시형태 60 내지 67 중 어느 것에 따른 세포 집단을 생산하는, 방법.
- [0210] 119. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,
- [0211] (i) 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포(예를 들어, 야생형 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포)를 제공하는 단계,
- [0212] (ii) 세포에 (a) 서열번호 1 내지 3을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 gRNA에 결합하는 뉴클레아제(예를 들어, 엔도뉴클레아제)(예를 들어, Cas9 엔도뉴클레아제)에 도입하는 단계, 및
- [0213] (iii) 추가로 세포에 (a) 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 gRNA에 결합하는 뉴클레아제(예를 들어, 엔도뉴클레아제)(예를 들어, Cas9 엔도뉴클레아제)에 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0214] 를 포함하는, 방법.
- [0215] 120. 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포의 생산 방법으로서,
- [0216] (i) 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 제공하는 단계,
- [0217] (ii) 세포에 (a) 서열번호 1 내지 3에 대해 적어도 90% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 Cas9 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계, 및
- [0218] (iii) 추가로 세포에 (a) 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (b) 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 Cas9 엔도뉴클레아제에 도입하여, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 및/또는 선조 세포를 생산하는 단계
- [0219] 를 포함하는, 방법.
- [0220] 121. 실시형태 119 내지 120 중 어느 것에 있어서, 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2의 에피토프의 감소된 발현 수준 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 엑손 에피토프의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 초래하는, 방법.
- [0221] 122. 실시형태 119 내지 121 중 어느 것에 있어서, 복수의 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 상에서 수행되는, 방법.
- [0222] 123. 실시형태 119 내지 122 중 어느 것에 있어서, 복수의 조혈모세포 및 복수의 조혈 선조 세포를 포함하는 세포 집단 상에서 수행되는, 방법.
- [0223] 124. 실시형태 119 내지 123 중 어느 것에 있어서, 실시형태 60 내지 67 중 어느 것에 따른 세포 집단을 생산하는, 방법.

- [0224] 125. 실시형태 119 내지 123 중 어느 것에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이고, 상기 방법은 야생형 상대와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 초래하고/하거나 초기 코돈 종결 및 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 생산을 유도하는, 방법.
- [0225] 126. 실시형태 125에 있어서, 상기 gRNA는 서열번호 4 또는 46 내지 47인, 방법.
- [0226] 127. 실시형태 97 내지 126 중 어느 것에 있어서, (a) 및 (b)의 상기 핵산은 세포 내에 도입된 하나의 벡터 상에서 암호화된, 방법.
- [0227] 128. 실시형태 127에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터인, 방법.
- [0228] 129. 실시형태 97 내지 126 중 어느 것에 있어서, 상기 염기 편집기는 단백질 형태이고, (a) 및 (b)는 사전 형성된 리보핵단백질 복합체로서 상기 세포에 도입되는, 방법.
- [0229] 130. 실시형태 129에 있어서, 리보핵단백질 복합체는 전기천공법을 통해 세포에 도입된, 방법.
- [0230] 131. 실시형태 97 내지 130 중 어느 것에 있어서, 상기 gRNA는 단일-분자 가이드 RNA(sgRNA)인, 방법.
- [0231] 132. 실시형태 97 내지 131 중 어느 것에 있어서, 상기 gRNA는 변형된 sgRNA인, 방법.
- [0232] 133. 실시형태 97 내지 132 중 어느 것에 있어서, 상기 gRNA는 화학적으로 변형된 sgRNA인, 방법.
- [0233] 134. 실시형태 97 내지 133 중 어느 것에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 CD34+인, 방법.
- [0234] 135. 실시형태 97 내지 133 중 어느 것에 있어서, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 유래된, 방법.
- [0235] 136. 실시형태 135에 있어서, 상기 대상체는 조혈 장애를 갖는, 방법.
- [0236] 137. 실시형태 135에 있어서, 상기 대상체는 건강한 공여자인, 방법.
- [0237] 138. 실시형태 97 내지 137 중 어느 것의 방법 또는 용도에 의해 생산된, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포.
- [0238] 139. 실시형태 138의 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 포함하는(예를 들어, 조혈모세포, 조혈 선조 세포 또는 이들의 조합을 포함하는), 세포 집단.
- [0239] 140. 유효량의 실시형태 1 내지 43 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 장애의 치료 방법을 제공한다.
- [0240] 141. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시형태 1 내지 20 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단으로서, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0241] 142. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시형태 1 내지 20 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단, 및 CD33을 표적으로 하는 제제의 조합물로서, 상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하고, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단, 및 CD33에 결합하는 제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0242] 143. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시형태 1 내지 9, 21 내지 29 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단으로서, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 유효량의 EMR2를 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제제는 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0243] 144. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시형태 1 내지 9, 21 내지 29 및 138 중 어느 것의 유전자 조작

된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단, 및 EMR2를 표적으로 하는 제제의 조합물로서, 상기 제제는 EMR2에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하고, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단, 및 EMR2에 결합하는 제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.

- [0244] 145. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시형태 1 내지 9, 43 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단으로서, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 유효량의 CD33를 표적으로 하는 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 제제는 CD33 및 유효량의 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제를 포함하고, 상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0245] 146. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시형태 1 내지 9, 43 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단 및 CD33을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함) 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)의 조합물로서, 치료하는 것은 유효량의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 및 CD33에 결합하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 조혈 장애의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0246] 147. 실시형태 145의 조합물 및 실시형태 146의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2인, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0247] 148. 암 면역요법에서 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단.
- [0248] 149. 암 면역요법에서 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단으로서, 상기 환자는 조혈 장애를 갖는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0249] 150. 조혈 장애를 갖는 환자의 조혈 재증식에서 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단.
- [0250] 151. 조혈 장애를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 실시형태 1 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단으로서, 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 환자를 재증식시키는, 방법.
- [0251] 152. 면역 요법에서 CD33을 표적으로 하는 제제 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 세포독성 효과를 감소시키는 데 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단.
- [0252] 153. CD33을 표적으로 하는 제제 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 이용하는 면역 요법 방법에서 사용하기 위한 실시형태 1 내지 59 및 138 중 어느 것의 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 실시형태 60 내지 67 및 169 중 어느 것의 세포 집단으로서, 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 본 명세서에 기재된 세포 집단은 CD33을 표적으로 하는 제제 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원의 세포독성 효과를 감소시키는, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단.
- [0253] 154. 실시형태 140 내지 153 중 어느 것에 있어서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 CD33 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제와 병행하여 투여되는, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0254] 155. 실시형태 140 내지 153 중 어느 것에 있어서, 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단은 CD33 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제 전에 투여되는,

방법, 세포, 제제 또는 조합물.

- [0255] 156. 실시형태 140 내지 153 중 어느 것에 있어서, 상기 CD33 및/또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 유전자 조작된 조절 줄기 세포 또는 선조 세포 또는 세포 집단 전에 투여되는, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0256] 157. 실시형태 140 내지 156 중 어느 것에 있어서, 상기 조절 장애는 조절 악성종양인, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0257] 158. 실시형태 140 내지 157 중 어느 것에 있어서, 유효량의 CD33을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함) 및/또는 유효량의 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제(상기 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함함)를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0258] 159. 실시형태 158에 있어서, 상기 CD33을 표적으로 하는 제제는 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포이고 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 면역 세포인, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0259] 160. 실시형태 152 내지 159 중 어느 것에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2인, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0260] 161. 실시형태 159에 있어서, 상기 면역 세포는 T 세포인, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0261] 162. 실시형태 140 내지 161 중 어느 것에 있어서, 상기 대상체는 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병 또는 다발성 골수종을 갖는 인간 환자인, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.
- [0262] 163. 실시형태 163에 있어서, 상기 대상체는 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병 또는 만성 림프모구 백혈병인 백혈병을 갖는 인간 환자인, 방법, 세포, 제제 또는 조합물.

도면의 간단한 설명

[0263] 다음의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 개시내용의 특정 양상을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본 명세서에 제시된 특정 실시형태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참고로 하여 더 잘 이해할 수 있다.

도 1은 0형, 1형, 2형 및 3형 계통-특이적 항원의 예시적인 도시를 제시하는 도면.

도 2는 0형 계통-특이적 세포-표면 항원인 CD307을 표적으로 하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포를 나타내는 개략도를 도시한 도면. CD307을 발현시키는 다발성 골수종(MM) 세포뿐만 아니라 CD307을 발현시키는 다른 세포, 예컨대, 형질세포는 항-CD307키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포에 의해 표적화된다.

도 3은 2형 계통-특이적 세포-표면 항원인 CD33을 표적으로 하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포를 나타내는 개략도를 도시한 도면. CD33을 발현시키는 급성 골수성 백혈병(AML) 세포. 인간 조절모세포(HSC)는 CD33이 결핍되도록 유전자 조작되고, 따라서 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포에 의해 인식되지 않는다. HSC는 골수성 세포를 발생시킬 수 있다.

도 4는 CD33의 염기 편집 전략을 도시한 도면. 도 4A는 엑손 1 내지 3 영역 및 가능한 스플라이싱 결과의 상세한 설명을 나타낸다. ag: 스플라이싱 수용자 부위(SA). gt: 스플라이싱 공여자 부위. 점선은 가능한 스플라이싱 사건을 도시한다. GO 겐투주맵 오조가마이신(Ab 아이콘)은 엑손 2에 위치한 에피토프를 인식한다. 도 4B는 엑손 2 SA(적색) 및 엑손 스플라이싱 인핸서 부위(황색의 ESE)가 강조된 인트론1(소문자)/엑손2(대문자) 접합부 DNA 서열을 나타낸다. 도 4C는 CD33 mRNA 전장(CD33^{FL})이 7 엑손을 포함한다는 것을 나타낸다. 엑손 2는 Ig-유사 V-형 도메인을 암호화한다. CD33^{A2}는 변경된 엑손 스플라이싱 인핸서(ESE) 부위를 초래하는 C>T를 변화시키는 공통 다형성(rs12459419)으로 인해 엑손 2를 결여한다.

도 5는 ABE가 최대 95% 효율, 무시할 만한 삽입결실을 갖는 표적화된 부위에서 A>G 전환을 도입하고 엑손 2 스킵을 유도한다는 것을 나타낸 도면. 도 5A는 야생형 게놈 서열(상단)과 비교되는 편집 세포의 생어 서열분석(Sanger sequencing) 프로파일이다. ESE 또는 SA를 돌연변이시키는 사이토신 또는 아데닌의 편집을 화살표로 나

타낸다. 도 5B는 표적 부위에서 편집 결과를 도시하는 CRISPResso2에 의한 HTS의 결과를 나타낸다. 표적화된 뉴클레오타이드를 둘러싸는 대략 250bp는 추출된 게놈 DNA로부터 PCR-증폭되고, Illumina MiSeq 상에서 서열분석되었다. 결과는 각각의 표적화된 염기가 의도된 돌연변이를 획득하였다는 것을 나타낸다. 도 5C는 엑손 2에 위치한 에피토프를 인식하는 2개의 상이한 항체 클론 WM53 및 P67.6을 이용하여 FACS 분석에 의해 전기천공법 7일 후에 편집 세포에서의 CD33 발현 평가를 나타낸다. BE4-매개 편집 후에, CD34⁺ 세포의 대략 30%는 CD33 발현을 나타내지만, ABE-매개 편집 후에는 5%가 발현을 나타낸다. 도 5D는 ESE 또는 SA 편집이 엑손 2 스킵을 유도한다는 것을 나타낸다. CD34⁺ 편집 세포에서 엑손 스킵은 CD33^{Δ2}(엑손 접합부 1 내지 3에 걸쳐있음)에 특이적이거나, 또는 (엑손 1, 5 및 7에서) 모든 아이소폼에 공통인 프라이머 세트에 cDNA 상에서 PCR을 수행함으로써 특성규명되었다. PCR 산물은 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 분리되었고, SYBR-안전 형광(SYBR-safe fluorescence)에 의해 시각화하였다. 겔 아래에서, PCR 산물의 생어 서열분석은 편집 세포에서 엑손 2의 부재를 확인하였지만, 모든 다른 엑손은 온전하다.

도 6은 시험관내 분화 WT 또는 CD33^{Δ2} 단핵구가 정상 식세포 능력을 나타낸다는 것과 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 시험관내 GO 세포독성에 내성이 있다는 것을 나타내는 도면. 도 6A는 시험관내 분화된 WT 또는 CD33^{Δ2} 단핵구가, 이콜라이(*E.Coli*) 생물입자(bioparticle) 내재화에 의해 측정하는 바와 같이, 비슷한 식세포작용 능력을 나타낸다는 것을 나타낸다. 좌측 측면은 시험관내 분화된 WT 또는 CD33^{Δ2} 단핵구에 의한 이콜라이 생물입자 내재화의 대표적인 FAC 플롯이다. 액틴 중합 저해제인 사이토칼라진 D에 의한 처리는 식세포작용을 없앤다. 우측은 식세포작용 정량화를 도시하는 그래프이다. 도 6B는 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 시험관내 GO 세포독성에 내성이 있다는 것을 나타낸다. 세포를 GO와 함께 48시간 동안 인큐베이션시키고, 세포독성을 FACS에 의해 분석하였다. CD34⁺CD33^{Δ2}는 동형 접합적 rs12459419 A14V SNP를 갖는 공여자보다는 GO 세포독성에 대해 동일한 내성을 나타낸다.

도 7은 CD34⁺CD33^{Δ2}가 생착되고, 완전한 조혈기관계통을 개괄하며, 생체내 겐투주압 오조가미신(GO)에 내성이 있다는 것을 도시한 도면. 도 7A는 이식 후 16주에 분석한 골수(BM) 및 비장으로부터의 인간 CD45 집단 내에서 인간 CD45+ 세포의 빈도 및 선조세포 골수모양(CD123) 및 림프모양(CD10)뿐만 아니라 성숙 골수모양(CD14) 및 림프모양(CD19), 및 T 세포(CD3)의 빈도를 도시하는 그래프이다. 도 7B는 CD34^{WT} 또는 CD34⁺CD33^{Δ2}를 생착시킨 마우스의 BM에 대해 H&E 염색 및 항-CD33에 의한 면역세포화학의 대표적인 영상을 도시한 도면. 도 7C는 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 생체내 GO에 내성이라는 것을 나타낸다. 12주 후 이식 마우스의 말초 혈액(PB)을 CD33⁺CD14⁺ 세포 또는 CD33^{Δ2}CD14⁺ 세포의 존재에 대해 분석했다. 이어서, 마우스에 2.5ugr GO를 주사하고, 채혈하고 나서, 자루에 넣어서, GO 처리 1주 후에 인간화된 마우스의 PB 및 BM에서 골수성 세포의 존재를 평가하였다. GO 처리 전에, CD34^{WT} 또는 CD34⁺CD33^{Δ2} 이식 마우스는 PB에서 CD14⁺ 세포의 동일한 빈도를 나타냈다(상단 FACS 플롯). GO 주사 1주 후에, CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 생착된 마우스의 PB 및 BM에서 CD33⁻CD14⁺ 세포가 검출되었지만, CD33⁺ 및 CD14⁺ 세포는 CD34^{WT} 생착 마우스의 PB 및 BM에서 사라졌다. 도 7D는 이식 후 16주에 골수 샘플로부터의 생착 WT(비편집) 또는 편집 세포에서의 표적 부위(A7)에서 CD33 표적 상(on-target) A-G 편집의 그래프이다. 이식 16주 후에, 마우스의 골수로부터의 게놈 DNA로부터 CD33 좌위를 증폭시켰다. HTS에 의해 앰플리콘을 서열분석하고, A7 위치에서 A에서-G로의 편집을 정량화하였다.

도 8은 비표적 분석 결과를 나타낸다. 도 8A는 19개의 상위 비표적 확인 좌위를 요약하는 표이다. 도 8B는 이식 16주 후에 골수로부터의 생착 인간 WT(비편집) 또는 편집 세포에서의 19개의 확인된 상위 비표적 좌위에서 A7 위치에서의 A에서-G로의 편집 평가 그래프이다. 도 8C는 이식 16주 후에 골수로부터의 생착 인간 WT(비편집) 또는 편집 세포에서의 19개의 확인된 상위 비표적 좌위에서 삽입결실 평가 그래프이다.

도 9는 CD33 및 EMR2의 염기 편집 전략 및 ABE가 CD34⁺ 세포의 이중 편집을 야기하는 표적화된 부위에서 A>G 전환을 도입한다는 것을 도시한 도면. 도 9A(상단)는 EMR2, 엑손 13, gtgagt: 스플라이싱 공여자 부위(SD)의 상세한 설명을 나타낸다. 도 9A(하단)는 엑손 13 SD(적색)가 강조되고 볼드체의 프로토스페이스가 있는 인트론12(소문자)/엑손13(대문자) 접합부 DNA 서열을 나타낸다. 도 9B는 야생형 게놈 서열(상단)과 비교되는 편집 세포의 생어 서열분석 프로파일이다. CD33 엑손 2의 SA 또는 EMR2 엑손 13의 SD를 돌연변이시키는 아테닌의 편집을 화살표로 나타낸다. 도 9C는 뉴클레오택션 1주 후 WT 및 편집 세포의 FACS 분석을 나타낸다.

도 10A 내지 도 10D는 CD33을 표적으로 하는 항원-결합 단편을 포함하는 예시적 키메라 수용체의 개략도를 도시한 도면. 도 10A: 항-CD33 scFv, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 공자극 도메인 및 신호전달 도메인을 포함하는 CD33을 표적으로 하는 일반적 키메라 수용체. 도 10B: 항-CD33 scFv, CD8로부터의 힌지 도메인, CD8로부터의 막관통 도메인 및 CD28 및 CD3 ζ 로부터의 세포내 도메인을 포함하는 CD33을 표적으로 하는 키메라 수용체이다. 도 10C: 항-CD33 scFv, CD8로부터의 힌지 도메인, CD8로부터의 막관통 도메인 및 ICOS(또는 CD27, 4-1BB 또는 OX-40) 및 CD3 ζ 로부터의 세포내 도메인을 포함하는 CD33을 표적으로 하는 키메라 수용체이다. 도 10D: 항-CD33 scFv, CD8로부터의 힌지 도메인, CD8로부터의 막관통 도메인 및 OX40, CD28 및 CD3 ζ 로부터의 세포내 도메인을 포함하는 CD33을 표적으로 하는 키메라 수용체이다.

도 11은 면역독소의 개략도를 도시한 도면.

도 12A 내지 도 12B는 빈 벡터(empty vector) 또는 항-CD33 키메라 수용체를 암호화하는 벡터로 형질도입된 K562 세포에서 발현된 항-CD33 키메라 수용체의 발현을 도시한 도면. 도 12A: CD3 ζ 를 인식하는 1차 항체를 이용하는 웨스턴 블롯. 표는 시험한 키메라 수용체 각각의 추정 분자량을 제공한다. 도 12B: 항-CD33 키메라 수용체에 대해 양성으로 염색된 세포 집단에서 증가를 나타내는 유세포분석.

도 13A 내지 도 13C는 항-CD33 키메라 수용체가 CD33에 결합한다는 것을 도시한 도면. 도 13A: Ponceau 염색된 단백질 겔. 레인 1, 3, 5: CD33 분자. 레인 2, 4, 6: CD33 분자 + APC 접합체. 도 13B: CD3 ζ 를 인식하는 1차 항체를 이용하는 웨스턴 블롯. 레인 1, 3 및 5는 CD33 분자와 함께 공동 인큐베이션시킨 키메라 수용체를 포함하고, 레인 2, 4 및 6은 CD33-APC 접합체와 함께 공동 인큐베이션시킨 키메라 수용체를 포함한다. 도 13C: 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키고 CD33에 결합하는 세포 집단에서 증가를 나타내는 유세포 분석.

도 14A 내지 도 14B는 표시된 키메라 수용체를 발현시키는 NK92 세포에 의한 K562 세포의 세포독성을 도시한 도면. 도 14A: 빈 HIVzsG 벡터와 비교되는 CART1 및 CART2. 도 14B: 빈 HIVzsG 벡터와 비교되는 CART3.

도 15A 내지 도 15B는 표시된 키메라 수용체를 발현시키는 NK92 세포에 의한 CD33이 결여된 K562 세포의 세포독성(y-축 상에서 세포독성 백분율로 표현함)을 도시한 도면. 도 15A: CD33-표적화 CRISPR/Cas 시약으로 전처리된 K562 세포의 미분류 집단. 도 15B: CD33이 결여된 K562 세포의 단일 클론. 칼럼은 좌측에서 우측까지 빈 HIVzsG 벡터, CART1, CART2 및 CART3에 대응한다.

도 16A 내지 도 16B는 1차 T 세포 집단의 유세포분석을 도시한 도면. 도 16A: T 세포 마커 C4⁺, CD8⁺ 또는 CD4⁺CD8⁺ 둘 다의 발현에 기반한 세포의 분류. 도 16B: 1차 T 세포의 표시된 집단에 대한 CD33의 상대 발현.

도 17A 내지 도 17B는 표시된 키메라 수용체를 발현시키는 1차 T 세포에 의한 K562 세포의 세포독성을 도시한 도면. 도 17A: CD4⁺ T 세포. 도 17B: CD4⁺/CD8⁺(CD 4/8) 및 CD8⁺(CD8).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0264] 암세포의 세포 표면 상에 존재하는 항원을 표적으로 하는 암 면역요법은 표적 항원이 또한 대상체의 발달 및/또는 생존에 필요하거나 또는 결정적으로 관련되는 정상 비-암세포 표면 상에 존재할 때, 특히 문제이다. 이들 항원의 표적화는 암세포에 추가로 이러한 세포에 대한 면역요법의 세포독성 효과로 인해 대상체에서 해로운 효과를 야기할 수 있다.

[0265] 본 명세서에 기재된 방법, 핵산 및 세포는 암세포 상에 존재하는 항원(예를 들어, 1형 또는 2형 항원)뿐만 아니라 대상체의 발달 및/또는 생존에 중요한 세포의 표적화를 가능하게 한다. 상기 방법은, (1) 표적 계통-특이적 세포-표면 항원을 지니는 세포의 수를 이러한 항원을 표적으로 하는 제제를 이용하여 감소시키는 단계; 및 (2) 항원을 제시하고 따라서 계통-특이적 세포-표면 항원에 대해 결핍된 조절 세포를 갖는 제제의 투여로 인해 사멸될 수 있는 정상 세포(예를 들어, 비-암세포)의 대체 단계를 포함한다. 본 명세서에 기재된 방법은 관심의 계통-특이적 세포-표면 항원을 발현시키고 또한 대상체의 발달 및/또는 생존에 중요할 수 있는 계통-특이적 항원을 발현시키는 비-암세포 집단을 유지하는 암세포를 포함하는 표적 세포에 대한 감시(surveillance)를 유지할 수 있다.

[0266] 따라서, 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33) 및 조절 악성종양을 치료하기 위한 계통-특이적 세포-표면 항원에서 결핍된 조절 세포, 예컨대, 조절모세포(HSC) 또는 조절 선조 세포(HPC)를 표적으로 하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포의 공동 사용이 본 명세서에 기재된다. 또한 키메라 수용체, 이를 암호화하는 핵산, 이를 포함하는 벡터 및 이러한 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포(예를 들어,

T 세포)가 본 명세서에 제공된다.

[0267] 본 개시내용은 또한 계통-특이적 항원, 예컨대, 본 명세서에 기재된 것이 결핍된 유전자 조작된 조혈 세포뿐만 아니라 이의 제조 방법(예를 들어, 계놈 편집 방법)을 제공한다.

[0268] 또한, 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33) 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, EMR2) 및 조혈 악성종양을 치료하기 위한 계통-특이적 세포-표면 항원(들)이 결핍된 조혈 세포, 예컨대, 조혈모세포(HSC) 또는 조혈 선조 세포(HPC)를 표적으로 하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포의 공동 사용이 본 명세서에 기재된다. 또한 키메라 수용체, 이를 암호화하는 핵산, 이를 포함하는 벡터 및 이러한 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포(예를 들어, T 세포)가 본 명세서에 제공된다. 본 개시내용은 또한 계통-특이적 항원, 예컨대, 본 명세서에 기재된 것이 결핍된 유전자 조작된 조혈 세포뿐만 아니라 이의 제조 방법(예를 들어, 계놈 편집 방법)을 제공한다.

[0269] 또한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하는 계놈 편집 조혈 세포의 방법이 본 명세서에 기재된다. CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 사용은 CRISPR-기반 사이토신 및 아데닌 염기 편집기(CBE 및 ABE)를 이용하여 HSC/HSPC의 높은 편집 효율을 가능하게 한다. CBE 및 ABE는 DSB를 생성하는 일 없이 표적 영역에서 정확한 염기 치환을 가능하게 하는 각각 사이티딘 또는 아데노신 데아미나제에 융합되는 Cas9 틱대기효소이다. 이들이 DSB를 피하기 때문에, 염기 편집기는 DSB로부터 초래되는 원치않는 삽입결실, 전좌 또는 재배열을 제거하는 보다 안전한 편집 도구인 것으로 간주된다.

[0270] 스플라이스 요소의 뉴클레오타이드 서열을 특이적으로 변경시킴으로써 조혈 세포를 변경시키기 위한 염기 편집기, 특히 아데노신 염기 편집기, ABE8e의 고도로 효과적인 용도를 본 명세서에 나타낸다. 스플라이스 요소의 변경은 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래하여, 추가로 유전자에 의해 암호화된, 예를 들어, 유전자의 엑손에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 야기한다. CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 인헨서 부위를 변경하기 위한 염기 편집기 및 gRNA의 용도를 본 명세서에 나타낸다. 특히, ABE8e 염기 편집기 및 가이드 RNA를 이용하는 계놈 편집은 접합부 DNA 서열을 표적으로 하도록 특이적으로 설계되었고, 삽입결실 없이 최대 95%의 효율을 나타냈다.

[0271] 또한 EMR2의 엑손 13의 스플라이스 공여자 부위를 변경시키기 위한 염기 편집기의 용도를 본 명세서에 나타낸다.

[0272] 추가적으로, 본 명세서에 기재된 사이티딘 또는 아데노신 데아미나제에 융합된 Cas9 틱대기효소는 mRNA 또는 단백질 형태로 사용될 수 있다. 후자의 형태는 전자보다 더 적은 비표적 효과를 초래하고, 생체내에서 생착될 수 있고 GO에 대한 CD34 세포 내성을 제공하는 HSC를 편집하기 위해 성공적으로 사용되었다.

[0273] 예를 들어, 실시예 1 내지 5를 참조한다.

[0274] **정의**

[0275] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 상호 호환적으로 사용되고, 척추동물, 바람직하게는 인간과 같은 포유류를 지칭한다. 포유류는 인간 영장류, 비-인간 영장류 또는 무린, 소, 말, 개 또는 고양이 종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시내용과 관련하여, 용어 "대상체"는 또한 시험관내 또는 생체외에서 배양되거나 생체내에서 조작될 수 있는 조직 및 세포를 포함한다. 용어 "대상체"는 용어 "유기체"와 상호 호환적으로 사용될 수 있다.

[0276] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호 호환적으로 사용된다. 이들은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 다형체 형태, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중 하나 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드의 예는 유전자 또는 유전자 단편의 암호화 또는 비암호화 영역, 엑손, 인트론, 전령 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 폴리뉴클레오타이드 내의 하나 이상의 뉴클레오타이드는 추가로 변형될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 가로막힐 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 또한 중합 후에, 예컨대, 표지 제제와의 접합에 의해 변형될 수 있다.

[0277] 용어 "혼성화"는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드가 반응되어 뉴클레오타이드 잔기의 염기 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 왓슨 크릭(Watson Crick) 염기쌍, 후그스테

인(Hoogstein) 결합에 의해, 또는 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 발생될 수 있다. 복합체는 듀플렉스 구조를 형성하는 두 가닥, 다중-가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥, 단일 자기-혼성화 가닥 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 더 광대한 방법, 예컨대, PCR의 개시, 또는 효소에 의한 폴리뉴클레오타이드의 절단에서 단계를 구성할 수 있다. 주어진 서열에 의해 혼성화할 수 있는 서열은 주어진 서열의 "보체"로서 지칭된다.

[0278] 용어 "재조합 발현 벡터"는 작제물이 mRNA, 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 때, 숙주 세포에 의한 mRNA, 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드의 발현을 허용하는 유전자-변형 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 의미하고, mRNA, 단백질, 폴리펩타이드 또는 펩타이드가 세포 내에서 발현되게 하는 데 충분한 조건 하에서 벡터는 세포와 접촉된다. 본 개시내용의 벡터는 전체로서 천연 유래가 아니다. 벡터의 일부는 천연 유래일 수 있다. 본 개시내용의 비천연 유래 재조합 발현 벡터는 단일-가닥 또는 이중-가닥이고, 천연 공급원으로부터 부분적으로 합성되거나 얻을 수 있고, 천연, 비천연 또는 변경된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는, DNA 및 RNA를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0279] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "형질감염", "형질전환" 또는 "형질도입"은 물리적 또는 화학적 방법을 이용하는 것에 의한 숙주 세포 내로의 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오타이드의 도입을 지칭한다.

[0280] "항체", "항체의 단편", "항체 단편", "항체의 기능성 단편" 또는 "항원-결합 부분"은 특정 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분을 의미하기 위해 상호 호환적으로 사용된다 (Holliger et al., *Nat. Biotech.* (2005) 23(9): 1126). 본 항체는 항체 및/또는 이의 단편일 수 있다. 항체 단편은 Fab, F(ab')₂, scFv, 이항화 연결된 Fv, Fc 또는 변이체 및/또는 혼합물을 포함한다. 항체는 키메라, 인간화, 단일쇄 또는 이중특이성일 수 있다. IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 포함하는 모든 항체 아이소타입은 본 개시내용에 포함된다. 적합한 IgG 하위유형은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 항체 경쇄 또는 중쇄 가변 영역은 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 3개의 추가변 영역에 의해 가로막힌 프레임워크 영역으로 이루어진다. 본 항체 또는 항원-결합 부분의 CDR은 비-인간 또는 인간 공급원으로부터 유래될 수 있다. 본 항체 또는 항원-결합 부분의 프레임워크는 인간, 인간화, 비-인간(예를 들어, 인간에서 항원성을 감소시키도록 변형된 무린 프레임워크), 또는 합성 프레임워크(예를 들어, 공통 서열)일 수 있다.

[0281] 본 항체 또는 항원-결합 부분은 약 10⁻⁷M 미만, 약 10⁻⁸M 미만, 약 10⁻⁹M 미만, 약 10⁻¹⁰M 미만, 약 10⁻¹¹M 미만 또는 약 10⁻¹²M 미만의 해리 상수(K_D)로 특이적으로 결합할 수 있다. 본 개시내용에 따른 항체의 친화도는 통상적인 기법을 이용하여 용이하게 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1949) 51:660]; 및 미국 특허 제5,283,173호, 제5,468,614호, 또는 균등물).

[0282] 용어 "키메라 수용체", "키메라 항원 수용체" 또는 대안적으로 "CAR"은 전체적으로 상호 호환적으로 사용되고, 아래에 정의되는 바와 같이 자극 b군자로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함하는 적어도 세포의 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 신호전달 도메인을 포함하는 재조합 폴리펩타이드 작제물을 지칭한다(또한 본 명세서에서 "세포내 신호전달 도메인"으로 지칭됨). 문헌[Lee et al., *Clin. Cancer Res.* (2012) 18(10):2780; Jensen et al., *Immunol Rev.* (2014) 257(1):127]. 일 실시형태에서, 자극 분자는 T 세포 수용체 복합체와 회합된 체타쇄이다. 일 양상에서, 세포질 신호전달 도메인은 아래에 정의되는 바와 같은 적어도 하나의 공자극 분자로부터 유래된 하나 이상의 기능성 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 공자극 분자는 또한 4-1BB(즉, CD137), CD27 및/또는 CD28 또는 해당 분자의 단편일 수 있다. 다른 양상에서, CAR은 세포의 항원 인식 도메인, 막관통 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 융합 단백질을 포함한다. CAR은 세포의 항원 인식 도메인, 막관통 도메인 및 공자극 분자로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. 대안적으로, CAR은 세포의 항원 인식 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 공자극 분자(들)로부터 유래된 두 기능성 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함한다. CAR은 또한 세포의 항원 인식 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 공자극 분자(들)로부터 유래된 두 기능성 신호전달 도메인 및 자극 분자로부터 유래된 기능성 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질을 포함할 수 있다. 핵산 서열에 의해 암호화된 CAR의 항원 인식 모이어티는 임의의 계통 특이적, 항원-결합 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체 단편은 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 이의

일부), 불변 영역(또는 이의 일부) 또는 임의의 앞서 언급한 것의 조합물을 포함할 수 있다.

- [0283] 용어 "신호전달 도메인"은 제2 전령을 생성하거나 또는 이러한 전령에 반응함으로써 효과기로서 작용함으로써 정해진 신호전달 경로를 통해 세포 활성을 조절하도록 세포 내에서 정보를 전달함으로써 작용하는 단백질의 기능성 부분을 지칭한다.
- [0284] 용어 "제타" 또는 대안적으로 "제타 쇠", "CD3-제타" 또는 "TCR-제타"는 GenBank 수탁번호 NP_932170, NP_000725 또는 XP_011508447로서 제공되는 단백질로서 정의되거나; 또는 비-인간 종, 예를 들어, 마우스, 설치류, 원숭이, 유인원 등으로부터의 균등한 잔기, 및 "제타 자극 도메인" 또는 대안적으로 "CD3-제타 자극 도메인" 또는 "TCR-제타 자극 도메인"은 T 세포 활성화에 필요한 초기 신호를 기능적으로 전달하는 데 충분한 제타 쇠의 세포질 도메인으로부터의 아미노산 잔기로서 정의된다.
- [0285] 용어 "유전자 조작된" 또는 "유전자 변형된"은 유전자 조작에 의해, 예를 들어, 게놈 편집에 의해 조작되는 세포를 지칭한다. 즉, 세포는 상기 세포에서 천연 유래되지 않는 이종성 서열을 포함한다. 전형적으로, 이종성 서열은 벡터 시스템을 통해 또는 리포솜을 포함하는 세포에 핵산 분자를 도입하기 위한 다른 수단을 통해 도입된다. 이종성 핵산 분자는 세포 게놈에 통합될 수 있거나 또는 염색체외로, 예를 들어, 플라스미드의 형태로 존재할 수 있다. 상기 용어는 또한 유전자 조작된, 단리된 CAR 폴리펩타이드를 세포에 도입하는 실시형태를 포함한다.
- [0286] 용어 "자가"는 이후에 동일한 개체에 재도입될 동일 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0287] 용어 "동종이계"는 물질이 도입된 개체와 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 둘 이상의 개체는 하나 이상의 좌위에서 유전자가 동일하지 않지 않을 때 서로 동종이계인 것으로 언급된다.
- [0288] 용어 "세포 계통"은 공통 혈통을 갖고 동일 유형의 식별 가능한 세포로부터 특정 식별 가능한/기능화 세포로 발생하는 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 세포 계통은 호흡기, 전립선, 췌장, 지방, 신장, 장, 신경, 골격, 혈관, 간, 조혈, 근육 또는 심장 세포 계통을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0289] 용어 "저해"는 계통 특이적 항원의 유전자 발현 또는 기능과 관련하여 사용될 때 계통 특이적 항원의 유전자 발현 또는 기능 수준의 감소를 지칭하며, 여기서, 저해는 유전자 발현 또는 기능에 의한 방해의 결과이다. 저해는 검출 가능한 발현 또는 기능이 없는 경우에 완전할 수 있거나, 부분적일 수 있다. 부분적 저해는 거의 완전한 저해로부터 저해가 거의 없음의 범위일 수 있다. 특정 표적 세포를 제거함으로써, CAR T 세포는 특정 세포 계통의 전반적 발현을 효과적으로 저해할 수 있다.
- [0290] "계통-특이적 항원에서 결핍된" 조혈 세포와 같은 세포는 천연 유래 상대와 비교할 때 계통-특이적 항원의 실질적으로 감소된 발현 수준을 갖는 세포, 예를 들어, 동일 유형의 내인성 조혈 세포 또는 계통-특이적 항원을 발현시키지 않는, 즉, FACS와 같은 일상적 분석에 의해 검출할 수 없는 세포를 지칭한다. 일부 예에서, "항원에서 결핍된" 세포의 계통-특이적 항원의 발현 수준은 천연 유래 상대의 동일한 계통-특이적 항원의 발현 수준의 약 40%보다 낮을 수 있다(예를 들어, 30%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 더 낮을 수 있다).
- [0291] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "스플라이스 요소"는 스플라이스 수용자 부위, 스플라이스 공여자 부위, 스플라이스 인핸서 부위 및 스플라이스 사일런서 부위를 포함한다.
- [0292] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "약"은 특정 값 +/- 5%를 지칭한다. 예를 들어, 약 40%의 발현 수준은 35% 내지 45% 발현의 임의의 양을 포함할 수 있다.
- [0293] **계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제**
- [0294] 본 개시내용의 양상은, 예를 들어, 표적 암세포 상에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 표적으로 하는 제제(예를 들어, CD33을 표적으로 하는 제제로서, 예를 들어, CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제로서, 예를 들어, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제)를 제공한다. 이러한 제제는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하고 이를 표적으로 하는 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 항원-결합 단편은 계통-특이적 항원에 특이적으로 결합하는 단일 쇠 항체(scFv)일 수 있다.
- [0295] *A. 계통-특이적 세포-표면 항원*
- [0296] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "계통-특이적", "계통-특이적 세포-표면 항원" 및 "세포-표면 계통-특이적 항원"은 상호 호환적으로 사용될 수 있고, 세포 표면 상에 충분히 존재하며 세포 계통(들)의 하나 이상의 집

단과 연관되는 임의의 항원을 지칭한다. 예를 들어, 항원은 세포 계통(들)의 하나 이상의 집단 상에 존재하고, 다른 세포 집단의 세포 표면 상에 존재하지 않을 수 있다(또는 감소된 수준으로 존재함).

[0297] 일반적으로, 계통-특이적 세포-표면 항원은, 항원 및/또는 항원을 제시하는 세포 집단이 숙주 유기체의 생존 및/또는 발생에 필요한지의 여부 같은 다수의 인자에 기반하여 분류될 수 있다. 예시적인 유형의 계통-특이적 항원의 요약은 아래의 표 1에 제공한다. 또한 도 1을 참조한다.

표 1

계통 특이적 항원의 분류

계통 특이적 항원의 유형	계통 특이적 항원의 특징
0형	a) 항원이 유기체의 생존에 필요하며, 그리고 b) 0형 항원을 지니는 세포 유형이 유기체의 생존에 필요하고, 종양 또는 종양-연관 바이러스에 고유하지 않음
1형	a) 항원이 유기체의 생존에 필요하지 않고, 그리고 b) 1형 항원을 지니는 세포 유형이 유기체의 생존에 필요하지 않음
2형	a) 항원이 유기체의 생존에 필요하지 않고, 그리고 b) 2형 항원을 지니는 세포 유형이 유기체의 생존에 필요함
3형	a) 항원이 유기체의 생존에 필요하지 않고, 그리고 b) 항원을 지니는 세포 유형이 유기체의 생존에 필요하지 않음 c) 항원은 종양 또는 종양 연관 바이러스에 고유함 예는 EBV 감염 종양 세포(비인두암 및 버킷 림프종)를 포함하는 EBV 감염 세포에서의 LMP-2 항원임

[0298]

[0299] 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 0형 계통-특이적 세포-표면 항원은 조직 항상성 및 생존에 필수적이며, 0형 계통-특이적 세포-표면 항원을 지니는 세포 유형이 또한 대상체 생존에 필수적일 수 있다. 따라서, 항상성 및 생존에서의 0형 계통-특이적 세포-표면 항원, 또는 0형 계통-특이적 세포-표면 항원을 지니는 세포의 중요성을 고려하면, 이러한 항원 및 이러한 항원을 지니는 세포의 저해 또는 제거가 대상체의 생존에 해로울 수 있기 때문에, 항원의 이런 범주를 표적으로 하는 것은 통상적인 CAR T 세포 면역요법을 이용할 때 문제가 될 수 있다. 결과적으로, 계통-특이적 세포-표면 항원(예컨대, 0형 계통-특이적 항원) 및/또는 이러한 항원을 지니는 세포 유형은, 예를 들어, 대상체에서 필수적인 흔치않은 기능을 수행하기 때문에 생존에 필요할 수 있으며, 이어서, 이런 유형의 계통 특이적 항원은 CAR T 세포 기반 면역요법에 대한 불량한 표적일 수 있다.

[0300] 0형 항원과 대조적으로, 1형 계통-특이적 세포-표면 항원 및 1형 계통-특이적 세포-표면 항원을 지니는 세포는 대상체의 조직 항상성 또는 생존에 필요하지 않다. 1형 계통-특이적 세포-표면 항원의 표적화는 대상체에서 해

로운 결과를 야기할 가능성이 없다. 예를 들어, 정상 형질세포와 다발성 골수종(MM) 세포 둘 다에 대해 고유하게 발현된 1형 항원인 CD307을 표적으로 하도록 조작된 CAR T 세포는 세포 유형 둘 다의 제거를 야기할 것이다(도 2)(Elkins et al., *Mol Cancer Ther.* (2012) 10:2222). 그러나, 형질세포 계통이 유기체 생존을 위해 소비될 수 있기 때문에, CD307 및 기타 1형 계통 특이적 항원은 CAR T 세포 기반 면역요법에 적합한 항원이다. 1형 부류의 계통 특이적 항원은 난소, 고환, 전립선, 유방, 자궁내막 및 췌장을 포함하는 매우 다양한 상이한 조직에서 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제제는 1형 항원인 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 한다.

[0301] 2형 항원의 표적화는 1형 항원과 비교할 때 유의미한 어려움을 제시한다. 2형 항원은 하기를 특징으로 하는 것이다: (1) 유기체의 생존에 불필요한(즉, 생존에 필요하지 않은) 항원; 및 (2) 항원을 지니는 세포 계통이 유기체의 생존에 불필요함(즉, 생존에 특정 세포 계통이 필요함). 예를 들어, CD33은 정상 골수성 세포에서 뿐만 아니라 급성 골수성 백혈병(AML) 세포에서 발현되는 2형 항원이다(Dohner et al., (2015) *NEJM* 373:1136). 결과적으로, CD33 항원을 표적으로 하도록 조작된 CAR T 세포는 정상 세포뿐만 아니라 대상체의 생존과 양립할 수 없는 AML 세포 둘 다의 사멸을 야기할 수 있었다(도 3). 일부 실시형태에서, 제제는 2형 항원인 계통-특이적 항원 세포-표면을 표적으로 한다.

[0302] 본 개시내용의 방법 및 조성물에 의해 매우 다양한 항원이 표적으로 될 수 있다. 이들 항원에 대한 단클론성 항체는 상업적으로 구매되거나, 관심 항원에 의한 동물의 면역화 다음에 위에서 논의한 바와 같은 통상적인 단클론성 항체 방법, 예를 들어, 문헌[Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256: 495]의 표준 체세포 혼성화 기법을 포함하는 표준 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 항체 또는 항체를 암호화하는 핵산은 임의의 표준 DNA 또는 단백질 서열분석 기법을 이용하여 서열분석될 수 있다.

[0303] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 세포를 이용하여 표적화되는 계통-특이적 세포-표면 항원은 백혈구 또는 백혈구의 하위집단의 계통-특이적 세포-표면 항원이다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 항원 세포-표면은 골수성 세포와 연관된 항원이다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 분화 항원의 클러스터(CD)이다. CD 항원의 예는 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, CD33, 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, CD144, 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, CD271, 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, 306, CD307a, CD307b, CD307c, D307d, 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 및 CD363을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

www.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf를 참조한다.

- [0304] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD19, CD20, CD11, CD123, CD56, CD34, CD14, CD33, CD66b, CD41, CD61, CD62, CD235a, CD146, CD326, LMP2, CD22, CD52, CD10, CD3/TCR, CD79/BCR 및 CD26이다.
- [0305] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이다.
- [0306] 대안적으로 또는 추가로, 계통-특이적 세포-표면 항원은 암 항원, 예를 들어, 암세포 상에 차별적으로 존재하는 계통-특이적 세포-표면 항원일 수 있다. 일부 실시형태에서, 암 항원은 조직 또는 세포 계통에 특이적인 항원이다. 특정 암 유형과 연관된 계통-특이적 세포-표면 항원의 예는 CD20, CD22(비호지킨 림프종, B-세포 림프종, 만성 림프구 백혈병(CLL)), CD52(B-세포 CLL), CD33(급성 골수성 백혈병(AML)), CD10(gp100)(공통(프레-B) 급성 림프구성 백혈병 및 악성 흑색종), CD3/T-세포 수용체(TCR)(T-세포 림프종 및 백혈병), CD79/B-세포 수용체(BCR)(B-세포 림프종 및 백혈병), CD26(상피 및 림프모양 악성종양), 인간 백혈구 항원(HLA)-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ(림프모양 악성종양), RCAS1(부인과 암종, 담도성 선암종 및 췌장의 관 선암종)뿐만 아니라 전립선 특이적 막 항원을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0307] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이고, AML 세포와 연관된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이고, AML 세포와 연관된다.
- [0308] B. 항원-결합 단편
- [0309] 임의의 항체 또는 이의 항원-결합 단편(예를 들어, CD33 또는 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원, 예를 들어, EMR2에 결합함)은 본 명세서에 기재된 바와 같은 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제를 작제하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 항체 또는 항원-결합 단편은 통상적인 방법에 의해, 예를 들어, 하이브리도마 기술 또는 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0310] 예를 들어, 관심의 계통-특이적 항원에 특이적인 항체는 통상적인 하이브리도마 기술에 의해 생성될 수 있다. KLH와 같은 담체 단백질에 결합될 수 있는 세포-표면 계통-특이적 항원은 해당 복합체에 대한 항체 결합을 생성하기 위해 숙주 동물을 면역화시키는 데 사용될 수 있다. 숙주 동물의 면역화 경로 및 스케줄은 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이 항체 자극 및 생산을 위한 확립되고 통상적인 기법을 따른다. 마우스, 인간화 및 인간 항체의 생산을 위한 일반적인 기법은 당업계에 공지되어 있고, 본 명세서에 기재되어 있다. 인간 하이브리도마 세포주를 비롯한, 인간을 포함하는 임의의 포유류 대상체 또는 이로부터의 항체 생성 세포가 포유류 생산을 위한 기반으로 작용하도록 조작될 수 있다는 것이 상정된다. 전형적으로, 숙주 동물은 본 명세서에 기재된 바와 같이 포함하는 면역원의 양이 복잡내, 근육내, 경구, 피하, 족저내 및/또는 진피내로 접종된다.
- [0311] 하이브리도마는, 문헌[Kohler and Milstein *Nature* (1975) 256:495-497]의 일반적 체세포 혼성화 기법을 이용하여 또는 문헌[Buck et al., *In Vitro* (1982) 18:377-381]에 의해 변형된 바와 같이, 림프구 및 불멸 골수종 세포로부터 제조될 수 있다. X63-Ag8.653 및 미국 캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 Salk Institute, Cell Distribution Center로부터의 골수종 계통을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 이용 가능한 골수종 계통이 혼성화에서 사용될 수 있다. 일반적으로, 기법은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 후소겐(fusogen)을 이용하거나, 또는 당업자에게 잘 공지된 전기적 수단에 의해 골수종 세포 및 림프모양 세포를 융합시키는 것을 수반한다. 융합 후에, 세포를 배지로부터 분리시키고, 비혼성화된 모 세포를 제거하기 위해 하이포잔틴-아미노프테린-티미딘(HAT) 배지와 같은 선택 성장 배지에서 성장시켰다. 혈청의 보충 유무와 상관없이 본 명세서에 기재된 임의의 배지는 단클론성 항체를 분비하는 하이브리도마를 배양시키는 데 사용될 수 있다. 세포 융합 기법에 대한 다른 대안으로서, EBV 불멸 B 세포는 본 명세서에 기재된 TCR-유사 단클론성 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 하이브리도마는 원한다면, 확장 및 서브클로닝되고, 상청액은 통상적인 면역분석 절차(예를 들어, 방사면역측정법, 효소 면역분석 또는 형광 면역분석)에 의해 항-면역원 활성에 대해 분석된다.
- [0312] 항체의 공급원으로서 사용될 수 있는 하이브리도마는 계통-특이적 항원에 결합할 수 있는 단클론성 항체를 생산하는 모 하이브리도마의 모든 유도체, 자손 세포를 포괄한다. 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마는 공지된 절차를 이용하여 시험관내에서 또는 생체내에서 성장될 수 있다. 단클론성 항체는 배양 배지 또는 체액으로부터, 원한다면 통상적인 면역글로블린 정제 절차, 예컨대, 황산암모늄 침전, 겔 전기영동, 투석, 크로마토그래피 및 한외여과에 의해 분리될 수 있다. 원치않는 활성이 존재하는 경우에는, 예를 들어, 고상에 부착된 면역원으로 이루어진 흡착제 위로 제제를 실행하고 면역원의 목적하는 항체를 방출함으로써, 제거될 수 있다. 2기능성 또는 유도체화제, 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포석신이미드 에스터(시스테인 잔기를 통한 접합), N-하이드록시석신이미드(라이신 잔기를 통한), 글루타르알데하이드, 석신 무수물, SOCl₂ 또는 R₁N=C=NR(여

기서, R 및 R1은 상이한 알킬기임을 이용하여 면역화될 중에서 면역원성인 단백질, 예를 들어, 열쇠구멍 샷갓 조개 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 저해제에 접합된 표적 아미노산 서열을 포함하는 표적 항원 또는 단편에 의한 숙주 동물의 면역화는 항체(예를 들어, 단클론성 항체)의 집단을 수득할 수 있다.

[0313] 원한다면, 관심의 항원(예를 들어, 하이브리도마에 의해 생산됨)은 서열분석될 수 있고, 이어서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 발현 또는 증식을 위해 벡터에 클로닝될 수 있다. 관심의 항체를 암호화하는 서열은 숙주 세포 내 벡터에서 유지될 수 있고, 이어서, 숙주 세포는 확장되며, 장래의 사용을 위해 냉동될 수 있다. 대안에서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체를 "인간화"하기 위해 또는 친화도(친화도 성숙) 또는 항체의 다른 특징을 개선시키기 위해 유전자 조작에 사용될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역은 항체가 임상 시험 및 인간 치료에서 사용되는 경우 면역 반응을 피하기 위해 인간 불변 영역과 더 비슷하게 되도록 조작될 수 있다. 계통-특이적 항원에 대해 더 큰 친화도를 얻기 위해 항체 서열을 유전자 조작하는 것이 바람직할 수 있다. 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 변화가 항체에 대해 이루어질 수 있고 표적 항원에 대한 이의 결합 특이성을 여전히 유지할 수 있다는 것은 당업자에게 분명할 것이다.

[0314] 다른 실시형태에서, 완전 인간 항체는 특정 인간 면역글로불린 단백질을 발현시키도록 조작된 상업적으로 입수 가능한 마우스를 이용함으로써 얻어질 수 있다. 더 바람직한(예를 들어, 완전 인간 항체) 또는 더 강한 면역 반응을 생성하도록 설계된 유전자이식 동물은 또한 인간화된 또는 인간 항체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술의 예는 Amgen, Inc.(캘리포니아주 프리몬트 소재)로부터의 Xenomouse™ 및 Medarex, Inc.(뉴저지주 프린스턴 소재)로부터의 HuMAb-Mouse™ 및 TC Mouse™이다. 다른 대안에서, 항체는 파지 디스플레이 또는 효모 기술에 의해 재조합적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,565,332호; 제5,580,717호; 제5,733,743호; 및 제6,265,150호; 및 문헌[Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* (1994) 12:433-455]을 참조한다. 대안적으로, 파지 디스플레이 기술(McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-553)은 비면역화된 공여자로부터의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로 부터의 인간 항체 및 항체 단편을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0315] 무손상 항체(전장 항체)의 항원-결합 단편은 일상적인 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 항체 분자, 및 F(ab')₂ 단편의 이황화 브리지를 환원시킴으로써 생성될 수 있는 Fab 단편의 펩신 분해에 의해 생산될 수 있다.

[0316] 유전자 조작된 항체, 예컨대, 인간화된 항체, 키메라 항체, 단일쇄 항체, 및 이중 특이성 항체는, 예를 들어, 통상적인 재조합 기술을 통해 생산될 수 있다. 일례에서, 표적 항원에 특이적인 단클론성 항체를 암호화하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여(예를 들어, 단클론성 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함으로써) 용이하게 단리 및 서열분석될 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용한다. 일단 단리되면, DNA는 하나 이상의 발현 벡터에 위치될 수 있고, 이어서, 이는 재조합 숙주 세포에서 단클론성 항체의 합성을 얻기 위해 이콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포에 형질감염된다. 예를 들어, PCT 공개 WO 87/04462를 참조한다. 이어서, DNA는, 예를 들어, 상동성 무린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 암호화 서열을 치환함으로써(Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1984) 81:6851), 또는 비-면역글로불린 폴리펩타이드에 대한 암호화 서열의 모두 또는 일부를 면역글로불린 암호화 서열에 공유 결합시킴으로써, 변형될 수 있다. 해당 방식에서, 표적 항원의 결합 특이성을 갖는 유전자 조작된 항체, 예컨대, "키메라" 또는 "혼성체" 항체가 제조될 수 있다.

[0317] "키메라 항체"의 생산에 대해 개발된 기법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1984) 81, 6851; Neuberger et al., *Nature* (1984) 312, 604; 및 Takeda et al., *Nature* (1984) 314:452]을 참조한다.

[0318] 인간화된 항체를 작제하기 위한 방법은 또한 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 86:10029-10033]을 참조한다. 일례로서, 모 비-인간 항체의 VH 및 VL의 가변 영역에 당업계에 공지된 방법에 따라 3차원 분자 모델링 분석을 실시하였다. 다음에, 정확한 CDR 구조의 형성에 중요한 것으로 예측된 프레임워크 아미노산 잔기는 동일한 분자 모델링 분석을 이용하여 확인된다. 동시에, 모 비-인간 항체의 아미노산 서열과 상동성인 아미노산 서열을 갖는 인간 VH 및 VL 쇄는 검색 질의로서 모 VH 및 VL 서열을 이용하여 임의의 항체 유전자 데이터베이스로부터 확인된다. 이어서, 인간 VH 및 VL 수용자 유전자가 선택된다.

[0319] 선택된 인간 수용자 유전자 내의 CDR 영역은 모 비-인간 항체 또는 이의 기능성 변이체로부터의 CDR 영역으로 대체될 수 있다. 필요한 경우, CDR 영역과 상호작용하는 데 중요한 것으로 예측되는 모 쇄의 프레임워크 영역

내의 잔기(위의 설명을 참조)는 인간 수용자 유전자 내 대응하는 잔기를 치환하는 데 사용될 수 있다.

[0320] 단일쇄 항체는 중쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 연결함으로써 제조할 기술을 통해 제조될 수 있다. 바람직하게는, 가요성 링커는 두 가변 영역 사이에 혼입될 수 있다. 대안적으로, 단일쇄 항체의 생산에 대해 기재된 기법(미국 특허 제4,946,778 및 4,704,692)은 과지 또는 효모 scFv 라이브러리를 생산하는 데 적합할 수 있고, 계통-특이적 항원에 특이적인 scFv 클론은 일상적인 절차 후 라이브러리로부터 확인될 수 있다. 양성 클론은 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 것을 확인하기 위해 추가적인 선별이 실시될 수 있다.

[0321] 일부 예에서, 관심의 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이고, 항원-결합 단편은 CD33, 예를 들어, 인간 CD33에 특이적으로 결합한다. 항-인간 CD33 항체의 예시적인 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열은 아래에 제공된다. CDR 서열은 볼드체로 나타내고, 아미노산 서열에서 밑줄 표시된다.

[0322] 항-CD33 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 5)

QVQLQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSY~~YI~~HWIKQTPGQGLEWVGV~~IY~~PGN
DDISYNOKFOGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARE~~EVRLRY~~FDVWGQ
 GTT~~VT~~VSS

[0323]

[0324] 항-CD33 중쇄 가변 영역의 핵산 서열(서열번호 6)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTG
 AAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTACATCCACTGG
 ATCAAGCAGACCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGC
 AACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCC
 GACAAGAGCAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGAC
 AGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTACTTCGACGTGTGG
 GGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

[0325]

[0326] 항-CD33 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 7)

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCK~~SS~~QSVFFSSQKN~~Y~~LAWYQQIPGQSPRL~~LI~~Y~~W~~AS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFLT~~IS~~SVQPEDLAIYYC~~HOY~~LSSRTFGQGTKLEIKR

[0327]

[0328] 항-CD33 중쇄 가변 영역의 핵산 서열(서열번호 8)

GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCGAGAGG
 GTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCAGCCAGAAG
 AACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCT
 ACTGGGCCAGCACCAGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTTACCGGCAGCGGCA
 GCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCGAGGACCTGGCCA
 TCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCT
 GGAGATCAAGAGG

[0329]

[0330] 본 명세서에 기재된 바와 같은 CD33을 표적으로 하는 제제를 작제하는 데 사용하기 위한 항-CD33 항체 결합 단편은 서열번호 5 및 서열번호 7과 동일한 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 영역을 포함할 수 있다. 이러한 항체는 프레임워크 영역 중 하나 이상에서 아미노산 잔기 변이를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 항-CD33 항체 단편은 서열번호 5와 적어도 70% 서열 동일성(예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상)을 공유하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열번호 7과 적어도 70% 서열 동일성(예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상)을 공유하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0331] 두 아미노산 서열의 "동일성 백분율"은 문헌[Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:5873-77]에서와 같이 변형된 문헌[Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:2264-68]의

알고리즘을 이용하여 결정된다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)에 혼입된다. BLAST 단백질 검색은 본 개시내용의 단백질 분자에 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해 XBLAST 프로그램, 점수=50, 단어 길이=3에 의해 수행될 수 있다. 두 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, Gapped BLAST가 문헌[Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* (1997) 25(17):3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램의 디폴트 파라미터(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)가 사용될 수 있다.

[0332] C. 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포

[0333] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제는 계통-특이적 항원(예를 들어, CD33, EMR2)에 결합할 수 있는 항원-결합 단편(예를 들어, 단일쇄 항체)을 포함하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포이다. 키메라 수용체의 항원-결합 단편에 의해 세포 표면 상에 계통-특이적 항원을 갖는 표적 세포(예를 들어, 암세포)의 인식은 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포에서 효과기 기능을 활성화시킬 수 있는 키메라 수용체의 신호전달 도메인(들)(예를 들어, 공자극 신호전달 도메인 및/또는 세포질 신호전달 도메인)에 활성화 신호를 전달한다.

[0334] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 키메라 수용체는 숙주 세포 표면 상에서 발현될 수 있고 세포-표면 계통-특이적 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 비천연 유래 분자를 지칭한다. 일반적으로, 키메라 수용체는 상이한 분자로부터 유래된 적어도 2개의 도메인을 포함한다. 본 명세서에 기재된 항원-결합 단편에 추가로, 키메라 수용체는 힌지 도메인, 막관통 도메인, 적어도 하나의 공자극 도메인 및 세포질 신호전달 도메인 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 N 말단에서 C 말단까지 세포-표면 계통-특이적 항원, 힌지 도메인, 막관통 도메인 및 세포질 신호전달 도메인에 결합하는 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 공자극 도메인을 추가로 포함한다.

[0335] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 항원-결합 단편과 막관통 도메인 사이에 위치될 수 있는 힌지 도메인을 포함한다. 힌지 도메인은 단백질의 두 도메인 사이에서 일반적으로 발견되는 아미노산 세그먼트이고, 단백질의 가요성 및 서로에 대해 도메인 중 하나 또는 둘 다의 움직임을 가능하게 할 수 있다. 키메라 수용체의 다른 도메인에 대한 항원-결합 단편의 이러한 가요성 및 움직임을 제공하는 임의의 아미노산 서열이 사용될 수 있다.

[0336] 힌지 도메인은 약 10 내지 200개의 아미노산, 예를 들어, 15 내지 150개의 아미노산, 20 내지 100개의 아미노산, 또는 30 내지 60개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 200개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0337] 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 천연 유래 단백질의 힌지 도메인이다. 힌지 도메인을 포함하기 위한 당업계에 알려진 임의의 단백질의 힌지 도메인은 본 명세서에 기재된 키메라 수용체에서 사용하기에 적합하다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 천연 유래 단백질의 힌지 도메인의 적어도 일부이고, 키메라 수용체에 가요성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 또는 CD28 α 의 힌지 도메인이다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 의 힌지 도메인의 일부, 예를 들어, CD8 α 또는 CD28 α 의 힌지 도메인의 적어도 15개(예를 들어, 20, 25, 30, 35 또는 40개)의 연속적 아미노산을 포함하는 단편이다.

[0338] 항체의 힌지 도메인, 예컨대, 항체의 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD는 또한 본 명세서에 기재된 키메라 수용체에서 사용하기에 적합하다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 불변 도메인 CH1 및 CH2에 결합하는 힌지 도메인이다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인이고, 항체의 힌지 도메인 및 항체의 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 항체이다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH3 불변 영역을 포함한다.

[0339] 또한 비천연 유래 펩타이드인 힌지 도메인을 포함하는 키메라 수용체가 본 개시내용의 범주 이내이다. 일부 실시형태에서, Fc 수용체의 세포외 리간드-결합 도메인의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이의 힌지 도메인은

펩타이드 링커, 예컨대, $(Gly_xSer)_n$ 링커이되), x 및 n 은 독립적으로 3 내지 12의 정수일 수 있으며, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 이상을 포함한다.

- [0340] 본 명세서에 기재된 키메라 수용체의 힌지 도메인에서 사용될 수 있는 추가적인 펩타이드 링커는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Wriggers et al. *Current Trends in Peptide Science* (2005) 80(6): 736-746] 및 PCT 공개 WO 2012/088461을 참조한다.
- [0341] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 키메라 수용체에서 사용하기 위한 막관통 도메인은 당업계에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "막관통 도메인"은 세포막, 바람직하게는 진핵 세포막에서 열학적으로 안정적인 임의의 단백질 구조를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 키메라 수용체에서 사용하기에 적합한 막관통 도메인은 천연 유래 단백질로부터 얻을 수 있다. 대안적으로, 막관통 도메인은 합성, 비-천연 유래 단백질 세그먼트, 예를 들어, 세포막에서 열역학적으로 안정적인 소수성 단백질 세그먼트일 수 있다.
- [0342] 막관통 도메인은 막관통 도메인이 막을 가로지르게 하는 통과 및 횡수 및 단백질 배향을 비롯한 막관통 도메인 위상에 기반하여 분류된다. 예를 들어, 일회-통과 막 단백질(single-pass membrane protein)은 세포막을 1회 가로지르고, 다회-통과 막 단백질은 세포막 적어도 2회(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7회 이상) 가로지른다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 일회 통과 막관통 도메인이다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 세포의 세포의 측면에 대해 키메라 수용체의 N 말단 및 세포의 세포내 측면에 대해 키메라 수용체의 C 말단으로 배향되는 일회 통과 막관통 도메인이다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 일회 통과 막관통 단백질로부터 얻어진다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 의 막관통 도메인이다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인이다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 ICOS의 막관통도메인이다.
- [0343] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 하나 이상의 공자극 신호전달 도메인을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "공자극 신호전달 도메인"은 면역 반응, 예컨대, 효과기 기능을 유도하기 위해 세포 내에서 신호 전달을 매개하는 단백질의 적어도 일부를 지칭한다. 본 명세서에 기재된 키메라 수용체의 공자극 신호전달 도메인은 신호를 전달하고 면역 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포, 대식세포, 호중구 또는 호산구에 의해 매개되는 반응을 조절하는 공자극 단백질로부터의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다.
- [0344] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 하나 초과(적어도 2, 3, 4개 이상의) 공자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 상이한 공자극 단백질로부터 얻은 하나 초과(적어도 2, 3, 4개 이상의) 공자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 공자극 신호전달 도메인을 포함하지 않는다.
- [0345] 일반적으로, 다수의 면역 세포는 항원 특이적 신호의 자극에 추가로, 세포 증식, 분화 및 생존을 촉진시키고 세포의 효과기 기능을 활성화시키기 위해 공자극을 필요로 한다. 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)에서 공자극 신호전달 도메인의 활성화는 세포가 사이토카인, 식세포 특성, 증식, 분화, 생존 및/또는 세포독성의 생산 및 분비를 증가 또는 감소시키도록 유도할 수 있다. 임의의 공자극 단백질의 공자극 신호전달 도메인은 본 명세서에 기재된 키메라 수용체에서 사용하기에 적합할 수 있다. 공자극 신호전달 도메인의 유형(들)은 키메라 수용체가 발현되는 면역 세포의 유형(예를 들어, 1차 T 세포, T 세포주, NK 세포주) 및 목적하는 면역 효과기 기능(예를 들어, 세포독성)과 같은 인자에 기반하여 선택된다. 키메라 수용체에서 사용하기 위한 공자극 신호전달 도메인의 예는 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, Cd40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 공자극 단백질의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다. 일부 실시형태에서, 공자극 도메인은 4-1BB, CD28 또는 ICOS로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 공자극 도메인은 CD28로부터 유래되고, 키메라 수용체는 4-1BB 또는 ICOS로부터의 제2 공자극 도메인을 포함한다.
- [0346] 일부 실시형태에서, 공자극 도메인은 하나 초과(적어도 2, 3, 4개 이상의) 공자극 도메인 또는 하나 초과(적어도 2, 3, 4개 이상의) 공자극 도메인의 일부를 포함하는 융합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 공자극 도메인은 CD28 및 ICOS로부터의 공자극 도메인의 융합체이다.
- [0347] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 임의의 세포질 신호전달 도메인은 본 명세서에 기재된 키메라 수용체에서 사용될 수 있다. 일반적으로, 세포질 신호전달 도메인은 신호, 예컨대, 세포의 리간드-결합 도메인과 이의 리간드의 상호작용을 증계하여, 세포의 효과기 기능(예컨대, 세포독성) 유도와 같은 세포 반응을 자극한다.
- [0348] 당업자에게 분명한 바와 같이, T 세포 활성화에 관련된 인자는 세포질 신호전달 도메인의 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(ITAM)의 인산화이다. 당업계에 공지된 임의의 ITAM-포함 도메인은 본 명세서에 기재된 키메

라 수용체를 작제하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, ITAM 모티프는 6 내지 8개의 아미노산에 의해 분리되는 아미노산 서열 YxxL/I의 2개의 반복부를 포함하여(각각의 x는 독립적으로 임의의 아미노산임), 보존된 모티프 YxxL/Ix(6-8)YxxL/I를 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포질 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래된다.

[0349] 예시적인 키메라 수용체는 아래의 표 2 및 표 3에 제공된다.

표 2

키메라 수용체의 예시적인 성분

키메라 수용체 성분	아미노산 서열
항원-결합 단편	경쇄-GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (서열번호 9)-중쇄
CD28 공자극 도메인	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYQPYAPPRDFAAYRS (서열번호 10)
ICOS 공자극 도메인 (볼드체), ICOS 막관통 도메인(이탤릭체) 및 ICOS 의 세포외 도메인의 일부(밑줄 표시)	<u>LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKF</u> <i>WLPIGCAAFVVVCILGCILICWLT</i> KKKYSSS VHDPNGEYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL (서열번호 11)
ICOS 공자극 도메인	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTA KKSRLTDVTL (서열번호 12)
CD28 로부터의 힌지 도메인(이탤릭) 및 막관통 도메인(볼드체)을 포함하는 CD28/ICOS 키메라(밑줄로 나타낸 ICOS 부분)	<i>IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP</i> <i>FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA</i> FIIFWVRSKRSRLLHSDYMFMRAVNTAKK <u>SRLTDVTL</u> (서열번호 13)
CD3 ζ 세포질 신호전달 도메인	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR (서열번호 14)

[0350]

[0351] 키메라 수용체의 작제를 위한 예시적인 성분의 핵산 서열을 아래에 제공한다.

[0352] CD28 세포내 신호전달 도메인-DNA-인간(서열번호 15)

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCA
 TTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCT
 AAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGC
 TAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT
 GCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCA
 TTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG
 TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT
 GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG
 CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG
 GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT
 CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCT
 CGC

[0353]

[0354] ICOS 세포내 신호전달 도메인-DNA-인간(서열번호 16)

CTATCAATTTTGGATCCTCCTCCTTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCA
 TATTTATGAATCACAACCTTTGTTGCCAGCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGT
 GCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCATACTTATTTGTTGGCTTACAAA
 AAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAG
 AGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAA
 GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTA
 TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACG
 TGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAG
 GCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTG
 GGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGT
 CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCC
 CTCGC

[0355]

[0356] CD28/ICOS COSTIMULATORY SIGNALING REGION-DNA-인간(서열번호 17)

ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCA
 TTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCT
 AAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGC
 TAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT
 GCACAGTGACTACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACT
 CACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTA
 CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGA
 GTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCC
 GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
 TGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAG
 GGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC
 GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0357]

[0358] 일부 실시형태에서, 핵산 서열은 CD33에 결합하고 서열번호 5에서의 CDR과 동일한 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 7에서의 CDR과 동일한 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단편을 암호화한다. 일부

실시형태에서, 항원-결합 단편은 서열번호 5에 의해 제공되는 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 서열번호 7에 의해 제공되는 바와 같은 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 적어도 막관통 도메인 및 세포질 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 힌지 도메인 및/또는 공자극 신호전달 도메인을 추가로 포함한다.

[0359] 표 3은 예시적인 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 제공한다. 예시적인 작제물은 N-말단에서 C-말단까지, 항원-결합 단편, 막관통 도메인 및 세포질 신호전달 도메인을 갖는다. 일부 예에서, 키메라 수용체는 항원-결합 단편과 막관통 도메인 사이에 위치한 힌지 도메인을 추가로 포함한다. 일부 예에서, 키메라 수용체는 막관통 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이에 위치될 수 있는 하나 이상의 공자극 도메인을 추가로 포함한다.

표 3

예시적인 키메라 수용체

작제물	벡터	항원-결합 단편 특이성	힌지 도메인	막관통 도메인	신호전달 도메인 1	신호전달 도메인 2	신호전달 도메인 3
CART1 (서열번호 18)	HIV- ζ -Gfp	CD33	CD8 α	CD8	4-1BB	CD3 ζ	없음
CART2 (서열번호 19)	HIV- ζ -Gfp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	없음
CART3 (서열번호 20)	HIV- ζ -Gfp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	4-1BB	CD3 ζ
CART8 (서열번호 21)	HIV- ζ -Gfp	CD33	CD8 α	ICOS	ICOS	4-1BB	CD3 ζ
CART4dual (서열번호 22)	HIV- ζ -dT	CD19	CD8 α	CD28	CD3 ζ	-	-
CART5dual (서열번호 23)	HIV- ζ -Gfp	CD33	CD8 α	CD28	CD28	-	-
CART6 (서열번호 24)	HIV- ζ -dT	CD19	CD8 α	CD28	CD28	CD3 ζ	-
CART7 (서열번호 25)	HIV- ζ -Gfp	CD33	CD28h ge	CD28	CD28	CD3 ζ	-

[0360]

[0361] 위의 표 3에 열거된 예시적 키메라 수용체의 아미노산 서열을 아래에 제공한다:

[0362] CART1 아미노산 서열(서열번호 18)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYL
 AWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH
 QYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEEVVKPGASVK
 MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTAD
 KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQTTVTVSSALSNSIMYFS
 HFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDIYWA
 PLAGTCGVLLLSLVITKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC
 ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRR
 KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDAL
 HMQUALPPR

[0363]

[0364] CART2 아미노산 서열(서열번호 19)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYL
 AWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH
 QYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEEVVKPGASVK
 MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTAD
 KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQTTVTVSSALSNSIMYFSH
 FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVL
 VVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP
 PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTAT
 KDTYDALHMQUALPPR

[0365]

[0366] CART3 아미노산 서열(서열번호 20)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYL
 AWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH
 QYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEEVVKPGASVK
 MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTAD
 KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQTTVTVSSALSNSIMYFS
 HFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWV
 LVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY
 APPRDFAAYSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRV
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
 ALPPR

[0367]

[0368] CART8 아미노산 서열(서열번호 21)

MWLQSLLLLGTVACSSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYL
AWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH
QYLSSRTFGQGKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVK
MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTAD
KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFS
HFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFWLPI
GCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTLT
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0369]

[0370] CART4dual 아미노산 서열(서열번호 22)

MWLQSLLLLGTVACSSISIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP
DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT
FGGGTKLEIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY
GVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT
DDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPT
TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

[0371]

[0372] CART5dual 아미노산 서열(서열번호 23)

MWLQSLLLLGTVACSSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYL
AWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH
QYLSSRTFGQGKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQQPGAEVVKPGASVK
MSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTAD
KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFS
HFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWV
LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY
APPRDFAAYRS

[0373]

[0374] CART6 아미노산 서열(서열번호 24)

MWLQSLLLLGTVACSIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKP
 DGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYT
 FGGGTKLEIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESGGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY
 GVSWIRQPPRKLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKQVFLKMNSLQT
 DDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPT
 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVGGLAC
 YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKN
 PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
 QALPPR

[0375]

[0376] CART7 아미노산 서열(서열번호 25)

MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYL
 AWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCH
 QYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGSTKGVVQLQPPGAEVVKPGASVK
 MSCASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNQKFQGKATLTAD
 KSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQTTVTVSSIEVMYPPPYL
 DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPKPFVWLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
 RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
 QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0377]

[0378] 위의 표 3에 열거된 예시적 키메라 수용체의 핵산 서열을 아래에 제공한다:

[0379]

CART1 핵산 서열(서열번호 26)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCT
 GGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
 CCAGAGCGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGC
 AGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
 AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCC
 TGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAG
 TACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGG
 GCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGG
 CCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCC
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCA
 CTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTAC
 CCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCC
 TGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACC
 AGCGAGGACAGCGCCGTGTAATACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACT
 TCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCAAC
 AGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTCTGCCCCGCAAGCCTACC
 ACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCC
 TCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACA

[0380]

CCAGAGGCCTGGATATCTACATCTGGGCCCCACTGGCCGGCACCTGTGGCGTG
 CTGCTGCTGTCTCTCGTGATCACCAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACAT
 CTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGC
 TGTAGCTGCCGTTCCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGA
 AGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
 GTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAG
 CGGAGAGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTC
 AGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTC
 CGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACT
 GTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATG
 CAGGCCCTGCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0381]

[0382] CART2 핵산 서열(서열번호 27)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCT
 GGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
 CCAGAGCGTGTTCCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAAGTACCTGGCCTGGTATCAGC
 AGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGA
 AAGCGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCC
 TGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAG
 TACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGG
 GCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGG
 CCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCC
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCA
 CTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTAC
 CCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCC
 TGACCGCCGACAAGTCTAGCACCCACCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACC
 AGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTA
 TCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGC
 ATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCCGTGTTTCTGCCCCCAAGCCTACCACA
 ACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCT
 GTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCA
 GAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTTCGTGGGCGGAGTGCTGGCC
 TGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAA

[0383]

GCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCA
 GGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCCTCCAGAGACTTCGCCCGC
 CTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGC
 AGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTA
 CGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCC
 AGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGA
 TGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAA
 GGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTAT
 GACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAAC
 TATTCTAG

[0384]

[0385] CART3 핵산 서열(서열번호 28)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCT
 GGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
 CCAGAGCGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAATACTGGCCTGGTATCAGC
 AGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
 AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCC
 TGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAG
 TACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGG
 GCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGG
 CCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCC
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCA
 CTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTAC
 CCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCC
 TGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACC
 AGCGAGGACAGCGCCGTGTAATACTACTGCGCCAGAGAAGTGCAGGCTGCGGTACT
 TCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCAAC
 AGCATCATGTAATTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTCTGCCCCGCAAGCCTACC
 ACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCC
 TCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACA
 CCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTG
 GCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGCCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGC
 AAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGC

[0386]

CAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCCTCCAGAGACTTCGCC
 GCCTACAGATCCAAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGC
 CCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGTAGCTGCCG
 GTTCCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGA
 AGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGC
 TGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCC
 GGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT
 GTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCTACTCCGAGATCGGA
 ATGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGC
 CTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCC
 CCCCAGATGAAATTCATCGACGTAACTATTCTAG

[0387]

[0388] CART4dual1 핵산 서열(서열번호 29)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGC
 AGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCC
 AGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGT
 GAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGAT
 TTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAA
 CAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACAC
 CTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAG
 CCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCTGCAGGAATCTGGCCCTGGACT
 GGTGGCCCCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCC
 TGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAA
 TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGA
 AGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAG
 ATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTA
 CTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTG
 ACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGT
 GTTCTGCCCCGCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCCAG
 CCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCA
 GCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCT
 GGTGGTTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCT
 TCATCATCTTTTGGGTGCGCGTGAAGTTCAGCCGCAGCGCCGATGCCCTGCC
 TATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGG
 AAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCG
 GCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCAAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAA
 AGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCG
 GAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAG
 GACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCTCGCTGAAATTCATC
 GACGTAACTATTCTAG

[0389]

[0390] CART5dual1 핵산 서열(서열번호 30)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCT
 GGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
 CCAGAGCGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAAGTACCTGGCCTGGTATCAGC
 AGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
 AAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCC
 TGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAG
 TACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATCAAGCGGG
 GCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGG
 CCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCC
 GTGAAGATGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCA
 CTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTAC
 CCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTCCAGGGCAAGGCCACCC
 TGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACC
 AGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACT
 TCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCAAC
 AGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACC
 ACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCC
 TCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACA
 CCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTG
 GCCTGTTACAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGC
 AAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGC
 CAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCTCCCAGAGACTTCGCC
 GCCTACAGAAGCTGAAATTCATCGACGTAACTATTCTAG

[0391]

[0392]

CART6 핵산 서열(서열번호 31)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGC
 AGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCC
 AGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGT
 GAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGGCTGCCCTCTAGAT
 TTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAA
 CAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACAC
 CTTCCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAG
 CCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCTGCAGGAATCTGGCCCTGGACT
 GGTGGCCCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCC
 TGCCTGACTATGGCGTGTCTGGATCAGACAGCCCCCAGAAAGGGCCTGGAA
 TGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGACAACCTACTACAACAGCGCCCTGA
 AGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAG
 ATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTA
 CTACTACGGCGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTG
 ACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGT
 GTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCAG
 CCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCA
 GCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCT
 GGTGGTTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCT
 TCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTAC
 ATGAACATGACCCCCAGACGGCCAGGCCCCACCCGGAAACACTATCAGCCTT
 ACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGA
 TCCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCT
 GAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCG
 GGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGCCTG
 TATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCA
 TGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCT
 GAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCC
 CTCGCTGAAATTCATCGACGTAACTATTCTAG

[0393]

[0394] CART7 핵산 서열(서열번호 32)

GGTGTTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGC
 TGCTGGGCACCGTGGCCTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCT
 GGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAG
 CCAGAGCGTGTTCCTCAGCAGCTCCCAGAAGAAGTACCTGGCCTGGTATCAGC
 AGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGA
 AAGCGGCGTGCCCCGATAGATTACCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCC
 TGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAG
 TACCTGAGCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGG
 GCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGG
 CCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCC
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCA
 CTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGGTGGGAGTGATCTAC
 CCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACCC
 TGACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACC
 AGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACT
 TCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCCAGCATCGAAGTGAT
 GTACCCCCCTCCCTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACG
 TGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCCAGCCCTCTGTTTCTGGCCCTAGCAAGCCC
 TTCTGGGTGCTGGTGGTTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCGT
 GACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGC
 ACAGCGACTACATGAACATGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCA
 CTATCAGCCTTACGCCCTCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGA
 AGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCT
 GTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAG
 CGGAGAGGCAGGGACCCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTC
 AGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTC
 CGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACT
 GTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATG
 CAGGCCCTGCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0395]

[0396]

더 나아가, 또한 AML 환자에서 CD33을 표적으로 하는 키메라 수용체에 추가로 EMR2를 표적으로 하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포가 본 명세서에 상정된다. 이는 두 상이한 접근에 의해 달성될 수 있다: 1) 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포 및 항-EMR2 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포를 별개로 생성하고, 면역 세포 유형을 둘 다 갖는 환자에 별개로 주입하는 것; 또는 2) CD33과 EMR2를 둘 다 동시에 표적으로 하는 면역 세포를 생성하는 것(Kakarla et al., *Cancer* (2014) 2:151).

[0397]

본 명세서에 기재된 임의의 키메라 수용체는 일상적인 방법, 예컨대, 제조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 본 명세서의 키메라 수용체의 제조 방법은 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 수용체의 각각의 도메인 및 선택적으로 힌지 도메인, 막관통 도메인, 적어도 하나의 공자극 신호전달 도메인 및 세포질 신호전달 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 생성을 수반한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 성분 각각을 암호화하는 핵산은 제조합 기술을 이용하여 함께 결합된다.

[0398]

키메라 수용체 성분 각각의 서열은 일상적인 기술, 예를 들어, 당업계에 공지된 다양한 공급원 중 어느 하나로 부터의 PCR 증폭을 통해 얻을 수 있다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체 성분 중 하나 이상의 서열은 인간 세포로부터 얻어진다. 대안적으로, 키메라 수용체의 하나 이상의 성분의 서열이 합성될 수 있다. 각각의 성분(예를 들어, 도메인)의 서열은 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어, 펩타이드 링커를 암호화하는 핵산 서열을

이용하여) 결합되어 PCR 증폭 또는 결찰과 같은 방법을 이용하여 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 형성한다. 대안적으로, 키메라 수용체를 암호화하는 핵산이 합성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산은 DNA이다. 다른 실시형태에서, 핵산은 RNA이다.

- [0399] 각각의 성분의 서열에 결합하기 전 또는 후의 키메라 수용체 성분(예를 들어, 항원-결합 단편) 중 하나 이상 내에서 하나 이상의 잔기의 돌연변이. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체 성분에서의 하나 이상의 돌연변이는 표적에 대한 성분(예를 들어, 표적 항원에 대한 항원-결합 단편)의 친화도를 조절(증가 또는 감소)하고/하거나 성분 활성을 조절하도록 생성될 수 있다.
- [0400] 통상적인 기술을 통해 발현을 위한 적합한 면역 세포에 임의의 본 명세서에 기재된 키메라 수용체가 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포, 예컨대, 1차 T 세포 또는 T 세포주이다. 대안적으로, 면역 세포는 NK 세포, 예컨대, 확립된 NK 세포주(예를 들어, NK-92 세포)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 CD8(CD8⁺) 또는 CD8 및 CD4(CD8⁺/CD4⁺)를 발현시키는 T 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 확립된 T 세포주의 T 세포, 예를 들어, 293T 세포 또는 Jurkat 세포이다.
- [0401] 1차 T 세포는 임의의 공급원, 예컨대 말초 혈액 단핵세포(PBMC), 골수, 조직, 예컨대, 비장, 림프절, 흉선 또는 종양 조직으로부터 얻을 수 있다. 목적하는 면역 세포 유형을 얻는 데 적합한 공급원은 당업자에게 분명할 것이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 집단은 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자로부터, 예컨대, 환자로부터 얻은 골수로부터 또는 PBMC로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 집단은 건강한 공여자로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포가 후속적으로 투여될 대상체로부터 얻는다. 세포가 얻어진 동일한 대상체에게 투여된 면역 세포는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 얻어진 면역 세포는 동종이계 세포로서 지칭된다.
- [0402] 목적하는 숙주 세포의 유형은 세포를 자극 분자와 함께 공동 인큐베이션시킴으로써 얻어진 세포 집단 내에서 확장될 수 있고, 예를 들어, 항-CD3 및 항-CD28 항체는 T 세포의 확장을 위해 사용될 수 있다.
- [0403] 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 수용체 작제물을 발현시키는 면역 세포를 작제하기 위해, 키메라 수용체 작제물의 안정적 또는 일시적인 발현을 위한 발현 벡터는 본 명세서에 기재된 통상적인 방법을 통해 작제될 수 있고 면역 숙주 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, 키메라 수용체를 암호화하는 핵산은 적합한 프로모터에 대한 작동 가능한 결합에서 적합한 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터에 클로닝될 수 있다. 핵산 및 벡터는 서로 짝지어지고 결찰효소에 의해 결합될 수 있는 각 분자 상의 상보성 단부를 생성하기 위해 적합한 조건 하에 제한 효소와 접촉될 수 있다. 대안적으로, 합성 핵산 링커는 키메라 수용체를 암호화하는 핵산의 말단에 결찰될 수 있다. 합성 링커는 벡터 내 특정 제한 부위에 대응하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 발현 벡터/플라스미드/바이러스 벡터의 선택은 키메라 수용체의 발현을 위해 숙주 세포 유형에 따라 것이지만, 진핵 세포에서의 통합 및 복제에 적합하여야 한다.
- [0404] 다양한 프로모터가 거대세포바이러스(CMV) 급초기 프로모터, 바이러스 LTR, 예컨대, 라우스 육종 바이러스 LTR, HIV-LTR, HTLV-1 LTR, 말로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV) LTR, 골수증식 육종 바이러스(MPSV) LTR, 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) LTR, 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 단순포진 tk 바이러스 프로모터, EF1- α 인트론 유무와 상관없이 연장인자 1-알파(EF1- α) 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체의 발현을 위해 사용될 수 있다. 키메라 수용체의 발현을 위한 추가적인 프로모터는 면역 세포에서 임의의 구성적으로 활성인 프로모터를 포함한다. 대안적으로, 임의의 조절 가능한 프로모터가 사용될 수 있으므로, 이의 발현은 면역 세포 내에서 조절될 수 있다.
- [0405] 추가적으로, 벡터는, 예를 들어, 다음 중 일부 또는 모두를 포함할 수 있다: 선택 가능한 마커 유전자, 예컨대, 숙주 세포에서 안정적 또는 일시적인 형질감염의 선택을 위한 네오마이신 유전자; 고수준의 전사를 위한 인간 CMV의 급초기 유전자로부터의 인헨서/프로모터 서열; mRNA 안정성을 위한 SV40으로부터의 전사 종결 및 RNA 가공 신호; α -글로빈 또는 β -글로빈과 같은 고도로 발현된 유전자로부터의 mRNA 안정성 및 번역 효율을 위한 5'-및 3'-비번역 영역; 적절한 에피솜 복제를 위한 SV40 폴리오마 복제기점 및 CoIE1; 내부 리보솜 결합 부위(IRES); 다기능 다중 클로닝 부위; 센스 및 안티센스 RNA의 시험관내 전사를 위한 T7 및 SP6 RNA 프로모터; 축발될 때 벡터를 지니는 세포가 사멸되게 하는 "자살 스위치" 또는 "자살 유전자"(예를 들어, HSV 티미딘 키나제, 유도성 카스파제, 예컨대, iCasp9); 및 키메라 수용체의 발현을 평가하기 위한 리포터 유전자. 이식유전자를 포함하는 벡터를 생산하기 위한 적합한 벡터 및 방법은 잘 공지되어 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터 제조의 예는, 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용되는

US2014/0106449에서 찾을 수 있다.

- [0406] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체 작제물 또는 상기 키메라 수용체를 암호화하는 핵산은 DNA 분자이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체 작제물 또는 상기 키메라 수용체를 암호화하는 핵산은 DNA 벡터이고, 면역 세포에 전기천공될 수 있다(예를 들어, 문헌[Till et al., *Blood* (2012) 119(17): 3940-3950] 참조). 일부 실시형태에서, 키메라 수용체를 암호화하는 핵산은 면역 세포에 전기천공될 수 있는 RNA 분자이다.
- [0407] 본 명세서에 기재된 키메라 수용체 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 임의의 벡터가 또한 본 개시내용의 범주 이내이다. 이러한 벡터는 적합한 방법에 의해 숙주 세포, 예컨대, 숙주 면역 세포에 전달될 수 있다. 면역 세포에 벡터를 전달하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, DNA, RNA, 또는 트랜스포존 전기천공법, DNA, RNA 또는 트랜스포존을 전달하기 위해 리포솜 또는 나노입자 같은 형질감염 시약; 기계적 변형에 의한 DNA, RNA 또는 트랜스포존 또는 단백질의 전달(예를 들어, 문헌[Sharei et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2013) 110(6): 2082-2087]; 또는 바이러스 형질도입을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 바이러스 형질도입에 의해 숙주 세포에 전달된다. 전달을 위한 예시적인 바이러스 방법은 재조합 레트로바이러스(예를 들어 PCT 공개 번호 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 미국 특허 제5,219,740호 및 제4,777,127호; GB 특허 제2,200,651호; 및 유럽 특허 제0 345 242호), 알파바이러스 기반 벡터, 및 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터(예를 들어, PCT 공개 번호 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655 참조)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 레트로바이러스이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 아데노-연관 바이러스이다.
- [0408] 키메라 수용체를 암호화하는 벡터가 바이러스 벡터를 이용하여 숙주 세포에 도입된 예에서, 면역 세포를 감염시킬 수 있고 벡터를 지니는 바이러스 입자는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있고, 예를 들어, PCT 출원 공개 번호 WO 1991/002805A2, WO 1998/009271 A1 및 미국 특허 제6,194,191호에서 찾을 수 있다. 바이러스 입자는 세포 배양물 상청액으로부터 채취되고, 바이러스 입자를 면역 세포와 접촉시키기 전에 단리 및/또는 정제될 수 있다.
- [0409] 임의의 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현시키는 숙주 세포의 제조 방법은 생체의 면역 세포를 활성화 및/또는 확장시키는 단계를 포함한다. 숙주 세포를 활성화시키는 것은 세포가 효과기 기능(예를 들어, 세포독성)을 수행할 수 있는 활성화 상태로 숙주 세포를 자극하는 것을 의미한다. 숙주 세포를 활성화시키는 방법은 키메라 수용체의 발현을 위해 사용되는 숙주 세포 유형에 따라 다를 것이다. 숙주 세포를 확장시키는 것은 키메라 수용체를 발현시키는 세포 수 증가를 초래하는 임의의 방법, 예를 들어, 숙주 세포가 증식되게 하는 것 또는 숙주 세포가 증식되도록 자극하는 것을 수반할 수 있다. 숙주 세포의 확장을 자극하기 위한 방법은 키메라 수용체의 발현을 위해 사용되는 숙주 세포 유형에 따라 다를 것이며, 당업자에게 분명할 것이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 키메라 수용체를 발현시키는 숙주 세포는 대상체에게 투여하기 전에 생체외에서 활성화 및/또는 확장된다.
- [0410] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 표적으로 하는 제제는 항체-약물 접합체(ADC)이다. 당업자에게 분명할 바와 같이, 용어 "항체-약물 접합체"는 "면역독소"와 상호 호환적으로 사용될 수 있고, 독소 또는 약물 분자에 접합된 항체(또는 이의 항원-결합 단편)를 포함하는 융합 분자를 지칭한다. 대응하는 항원에 대한 항체의 결합은 세포 표면(예를 들어, 표적 세포) 상에서 항원을 제시하는 세포에 독소 또는 약물 분자의 전달을 가능하게 하여, 표적 세포의 사멸을 초래한다.
- [0411] 일부 실시형태에서, 제제는 항체-약물 접합체이다. 일부 실시형태에서, 항체-약물 접합체는 표적 세포에서 세포독성을 유도하는 항원-결합 단편 및 독소 또는 약물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체-약물 접합체는 2형 항원을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항체-약물 접합체는 CD33 또는 EMR2를 표적으로 한다.
- [0412] 일부 실시형태에서, 항체-약물 접합체의 항원-결합 단편은 서열번호 5에 의해 제공되는 중쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 CDR 및 서열번호 7에 의해 제공되는 경쇄 가변 영역과 동일한 경쇄 CDR을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항체-약물 접합체의 항원-결합 단편은 서열번호 5에 의해 제공되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 7에 의해 제공되는 경쇄 가변 영역을 갖는다.
- [0413] 항체-약물 접합체에서 사용하기에 적합한 독소 또는 약물은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 당업자에게 분명할 것이다. 예를 들어, 문헌[Peters et al., *Biosci. Rep.* (2015) 35(4): e00225; Beck et al., *Nature Reviews*

Drug Discovery (2017) 16:315-337; Marin-Acevedo et al., *J. Hematol. Oncol.* (2018)11: 8; Elgundi et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) 122: 2-19]을 참조한다.

[0414] 일부 실시형태에서, 항체-약물 접합체는 항체 및 약물 분자에 부착하는 링커(예를 들어, 펩타이드 링커, 예컨대, 절단 가능한 링커)를 추가로 포함할 수 있다. 항체-약물 접합체의 예는, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 브렌톡시맙 베도틴, 글렘바투무맙 베도틴/CDX-011, 데파톡시주맙 마포도틴/ABT-414, PSMA ADC, 폴라투주맙 베도틴/RG7596/DCDS4501A, 데닌투주맙 마포도틴/SGN-CD19A, AGS-16C3F, CDX-014, RG7841/DLYE5953A, RG7882/DMUC406A, RG7986/DCDS0780A, SGN-LIV1A, 엔포르투맙 베도틴/ASG-22ME, AG-15ME, AGS67E, 텔리소투주맙 베도틴/ABBV-399, ABBV-221, ABBV-085, GSK-2857916, 티소투맙 베도틴/HuMax-TF-ADC, HuMax-Ax1-ADC, 피나투주맙 베도틴/RG7593/DCDT2980S, 리파스투주맙 베도틴/RG7599/DNIB0600A, 인두사투맙 베도틴/MLN-0264/TAK-264, 반도르투주맙 베도틴/RG7450/DSSTP3086S, 소피투주맙 베도틴/RG7458/DMUC5754A, RG7600/DMOT4039A, RG7336/DEDN6526A, ME1547, PF-06263507/ADC 5T4, 트라스투주맙 엠탄신/T-DM1, 미르베크시맙 소라브탄신/IMGN853, 콜톡시맙 라브탄신/SAR3419, 나라톡시맙 엠탄신/IMGN529, 인다톡시맙 라브탄신/BT-062, 아네투맙 라브탄신/BAY 94-9343, SAR408701, SAR428926, AMG 224, PCA062, HKT288, LY3076226, SAR566658, 로르보투주맙 메르탄신/IMGN901, 칸투주맙 메르탄신/SB-408075, 칸투주맙 라브탄신/IMGN242, 라프리톡시맙 엠탄신/IMGN289, IMGN388, 비바투주맙메르탄신, AVE9633, BIIB015, MLN2704, AMG 172, AMG 595, LOP 628, 바다스톡시맙 타리린/SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-CD19B, SGN-CD123A, SGN-CD352A, 로발피투주맙 테시린/SC16LD6.5, SC-002, SC-003, ADCT-301/HuMax-TAC-PBD, ADCT-402, MEDI3726/ADC-401, IMGN779, IMGN632, 겐투주맙 오조가미신, 이노투주맙 오조가미신/CMC-544, PF-06647263, CMD-193, CMB-401, 트라스투주맙 듀오카마진/SYD985, BMS-936561/MDX-1203, 사시투주맙 고비테칸/IMMU-132, 라베투주맙 고비테칸/IMMU-130, DS-8201a, U3-1402, 밀라투주맙 독소루비신/IMMU-110/hLL1-DOX, BMS-986148, RC48-ADC/헤르투주맙-vc-MMAE, PF-06647020, PF-06650808, PF-06664178/RN927C, 루파르투맙 아마도틴/ BAY1129980, 아프루투맙 익사도틴/BAY1187982, ARX788, AGS62P1, XMT-1522, AbGn-107, MEDI4276, DSTA4637S/RG7861을 포함한다. 일례로서, 항체-약물 접합체는 겐투주맙 오조가미신이다.

[0415] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 단백질의 에피토프에 대한 항체-약물 접합체의 결합은 항체-약물 접합체의 내재화를 유도하고, 약물(또는 독소)은 세포내에서 방출될 수 있다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 단백질의 에피토프에 대한 항체-약물 접합체의 결합은 독소 또는 약물의 내재화를 유도하고, 이는 독소 또는 약물이 계통-특이적 단백질을 발현시키는 세포(표적 세포)를 사멸시키는 것을 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 단백질의 에피토프에 대한 항체-약물 접합체의 결합은 독소 또는 약물의 내재화를 유도하고, 이는 계통-특이적 단백질을 발현시키는 세포(표적 세포)의 활성을 조절할 수 있다. 본 명세서에 기재된 항체-약물 접합체에서 사용되는 독소 또는 약물의 유형은 임의의 특정 유형으로 제한되지 않는다.

[0416] 본 명세서에 기재된 ADC는 본 명세서에 기재된 바와 같은 병용 요법을 받은 적이 있는 대상체에 대한 후속 치료로서 사용될 수 있다.

[0417] **하나 이상의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)이 결핍된 조혈 세포**

[0418] 본 개시내용은 또한 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33)이 결핍되도록 유전적으로 변형된 조혈 세포, 예컨대, 조혈모세포(HSC) 및/또는 조혈 선조 세포(HPC)를 제공한다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포, 예컨대, 조혈모세포(HSC) 및/또는 조혈 선조 세포(HPC)는 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33) 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, EMR2)이 결핍되도록 유전적으로 변형되었다.

[0419] 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 세포를 유전적으로 변형시키는 데 사용되었고, 비표적 효과 및 바람직하지 않고 쇠약하게 하는 면역억제 부작용을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 하나의 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 계통-특이적 세포-표면 항원 이 결핍되도록 세포를 변형시키는 데 사용되고, 제2 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에서 결핍되도록 세포를 변형시키는 데 사용된다. 하나 초과인 계통-특이적 세포-표면 항원에서 결핍되도록 세포를 변형시키기 위한 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 성공적인 용도가 본 명세서에 나타난다. 일부 실시형태에서, 하나 초과인 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 다중 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 동일한 세포에서 결실 또는 저해될 수 있다.

[0420] 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 내인성 유전자에서 특정 뉴클레오타이드 치환을 초래하는 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 용도가 본 명세서에 나타난다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내에서이되, 뉴클레오타이드 치환은 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이스

싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 내인성 유전자에서 스플라이스 요소를 표적으로 하되, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 스킵되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 에피토프를 암호화하는 엑손이 연장되게 한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 초기 코돈 중절을 유도한다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 요소는 스플라이스 공여자, 스플라이스 수용자, 스플라이스 인핸서 또는 스플라이스 수용자이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 에피토프는 치료 또는 면역치료제에 의해 표적화된다.

- [0421] 본 명세서에 기재된 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 DNA-변형 효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질, 즉, 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기) 및 단일 가이드 RNA에 융합된 Cas9 틱내기효소를 포함한다. 각각의 CRISPR-기반 염기 편집기 복합체는 계통 특이적 항원 폴리뉴클레오타이드에 결합할 수 있고, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환을 가능하게 하여, 폴리뉴클레오타이드를 변형시킨다. 하나 초과의 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 하나 초과의 계통-특이적 세포-표면 항원을 변형시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0422] 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 사이토신 염기 편집기에 융합된 Cas 틱내기효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 사이토신 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 사이토신 염기 편집기는 BE4max이다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 CD33을 표적으로 하고, gRNA는 서열번호 1 및 2로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0423] 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 아데노신 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 사이토신 염기 편집기는 ABE8e이다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 CD33을 표적으로 하고, gRNA는 서열번호 3이다.
- [0424] 일부 실시형태에서, CD33의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위는 변경된다. 일부 실시형태에서, CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 변경된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 엑손 2에서의 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서 부위를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33의 SNP인 rs12459419를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 CD33의 인트론 1/엑손 2 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 37을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다.
- [0425] 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 아데노신 염기 편집기이다. 일부 실시형태에서, 사이토신 염기 편집기는 ABE8e이다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 EMR2를 표적으로 하고, gRNA는 서열번호 4이다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 EMR2를 표적으로 하고, gRNA는 서열번호 46이다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 EMR2를 표적으로 하고, gRNA는 서열번호 47이다.
- [0426] 일부 실시형태에서, EMR2의 엑손 13에서 스플라이스 공여자 부위는 변경된다. 일부 실시형태에서, EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부의 뉴클레오타이드 서열은 변경된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "C"에서 "T"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "G"에서 "A"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "A"에서 "G"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 치환은 "T"에서 "C"로의 치환이다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 엑손 13에서의 스플라이스 공여자 부위를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 EMR2의 인트론 12/엑손 13 접합부를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 서열번호 40을 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 한다.
- [0427] 일부 실시형태에서, 앞서 기재된 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템 모두는 리보핵단백질(RNP) 기반 전달 시스템에서 염기 편집기 단백질 및 gRNA를 포함할 수 있다.
- [0428] 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 본 명세서에서 "HSPC"("조혈 줄기 및/또는 선조 세포")로 지칭되는 HSC, HPC

또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 세포 집단은 복수의 조혈모세포를 포함하고; 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 세포 집단은 복수의 조혈 선조 세포를 포함하며; 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 세포 집단은 복수의 조혈모세포 및 복수의 조혈 선조 세포를 포함한다. HSC는 골수성 세포(예를 들어, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호염기구, 수지상 세포, 적혈구, 혈소판 등) 및 림프모양 세포(예를 들어, T 세포, B 세포, NK 세포)를 각각 추가로 생성하는 골수모양 세포와 림프모양 선조 세포를 둘 다 생성할 수 있다. HSC는 HSC의 식별 및/또는 단리, 및 세포 계통과 관련된 세포 표면 마커의 부재에 대해 사용될 수 있는 세포 표면 마커 CD34(예를 들어, CD34⁺)의 발현을 특징으로 한다. 따라서, 일부 실시형태에서, HSC는 CD34⁺이다.

[0429] 일부 실시형태에서, HSC는 포유류 대상체와 같은 대상체로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, 포유류 대상체는 비-인간 영장류, 설치류(예를 들어, 마우스 또는 래트), 소, 돼지, 말 또는 가축 동물이다. 일부 실시형태에서, HSC는 인간 환자, 예컨대, 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, HSC는 건강한 공여자로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, HSC는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포가 후속적으로 투여될 대상체로부터 얻는다. 세포가 얻어진 동일한 대상체에게 투여된 HSC는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 얻어진 HSC는 동종이계 세포로서 지칭된다.

[0430] HSC는 당업계에 공지된 통상적인 수단을 이용하여 임의의 적합한 공급원으로부터 얻을 수 있다. 일부 실시형태에서, HSC는 대상체로부터의 샘플, 예컨대, 골수 샘플 또는 혈액 샘플로부터 얻는다. 대안적으로, 또는 추가로, HSC는 탱줄로부터 얻을 수 있다. 일부 실시형태에서, HSC는 골수 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)로부터 유래된다. 일반적으로, 골수 세포는 대상체의 장골능, 대퇴골, 경골, 척추, 갈비뼈 또는 기타 뼈속질공간으로부터 얻을 수 있다. 골수는 환자로부터 채취될 수 있고, 당업계에 공지된 다양한 분리 및 세척 절차를 통해 단리된다. 골수 세포의 단리를 위한 예시적인 절차는 다음의 단계들을 포함한다: a) 골수 샘플의 추출; b) 3가지 분획에서 골수 현탁액을 원심분리하고, 중간체 분획, 또는 버피코트를 수집하는 단계; c) 단계 (b)로부터의 버피코트 분획을 분리 유체, 통상적으로 Ficoll(TM)에서 1회 이상 원심분리시키고, 골수 세포를 함유하는 중간체 분획을 수집하는 단계; 및 d) 재주입 가능한 골수 세포의 회수를 위해 단계 (c)로부터의 수집 분획을 세척하는 단계.

[0431] HSC는 전형적으로 골수에 존재하지만, 말초 혈액으로부터 HSC를 채취하기 위해 가동화 제제(mobilizing agent)를 투여함으로써 순환 혈액에 동원될 수 있다. 일부 실시형태에서, HSC를 얻은 대상체에 과립구 집락 자극 인자(G-CSF)와 같은 가동화 제제가 투여된다. 가동화 제제를 이용하는 동원 후에 수집된 HSC의 수는 전형적으로 가동화제의 사용 없이 얻은 세포 수보다 더 크다. 일부 실시형태에서, HSC는 말초 혈액 HSC이다.

[0432] 일부 실시형태에서, 샘플은 대상체로부터 얻고, 이어서, 목적하는 세포 유형이 풍부하다. 예를 들어, PBMC 및/또는 CD34⁺ 조혈 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 혈액으로부터 단리될 수 있다. 세포는 또한, 예를 들어, 목적하는 세포 유형의 세포 표면 상의 에피토프에 대한 항체 결합에 의한 단리 및/또는 활성화에 의해, 다른 세포로부터 단리될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 방법은 수용체 관여(engagement)를 활성화시키는 일 없이 특정 세포 유형을 선택적으로 풍부화시키기 위해 세포 표면 마커에 항체를 이용하는 음성 선택을 포함한다.

[0433] HSC의 집단은 계통 특이적 세포-표면 항원에서 걸뿔되도록 HSC를 유전적으로 조작하기 전 또는 후에 확장될 수 있다. 세포는 하나 이상의 사이토카인, 예컨대, 줄기 세포 인자(SCF), Flt-3 리간드(Flt3L), 트롬보포이에틴(TPO), 인터류킨 3(IL-3) 또는 인터류킨 6(IL-6)을 포함하는 확장 배지를 포함하는 조건 하에서 배양될 수 있다. 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25일 또는 필요한 임의의 범위에 대해 확장될 수 있다. 일부 실시형태에서, HSC는 대상체로부터 얻은 샘플로부터 목적하는 세포 집단(예를 들어, CD34⁺/CD33⁻)의 단리 후 및 유전자 조작 전에 확장된다. 일부 실시형태에서, HSC는 유전자 조작 후에 확장되고, 이에 의해 유전자 변형되고 계통-특이적 세포-표면 항원에서 걸뿔된 세포를 선택적으로 확장시킨다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형 후에 목적하는 특징(예를 들어, 표현형 또는 유전자형)을 갖는 세포("클론") 또는 몇몇 세포가 선택되고 독립적으로 확장될 수 있다.

[0434] 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 항원 세포-표면(예를 들어, CD33)이 걸뿔되도록(예를 들어, 발현되지 않도록) 유전자 조작된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33) 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에서 걸뿔되도록(예를 들어, 발현되지 않도록) 유전자 조작된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 제제(들)에 의해 표적으로 되는 동일한 계통-특이적 세포-표면 항원(들)이 걸뿔되도록 유전자 조작된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 조혈 세포가 유전자 조작된 조혈 세포와 동일한 유형의 천연 유래 조혈 세포와 비교할 때 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 실질적으로 감소된 발현을 갖다면(예를 들어, 동일한 세포 표면 마커, 예컨대, CD34의 존재를 특징으로 함), 조혈 세포는 계통-특이적 세

포-표면 항원(들)이 결핍되는 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 검출 가능한 발현은 없다(예를 들어, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 발현시키지 않는다). 계통-특이적 세포-표면 항원의 발현 수준은 당업계에서 공지된 임의의 수단에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 계통-특이적 세포-표면 항원의 발현 수준은 항원-특이적 항체로 항원을 검출함으로써 평가될 수 있다(예를 들어, 유세포 분석, 웨스턴 블롯팅).

[0435] 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 세포 상에서의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 발현은 천연 유래 조혈 세포(예를 들어, 야생형 상대) 상의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 발현과 비교된다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작은 천연 유래 조혈 세포 상의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 발현과 비교할 때 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%만큼 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 발현 수준의 감소를 초래한다. 즉, 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 세포는 천연 유래 조혈 세포(예를 들어, 야생형 상대)와 비교할 때 계통-특이적 세포-표면 항원(들)(예를 들어, CD33)을 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 더 적게 발현시킨다.

[0436] 일부 실시형태에서, 유전자 조작은 천연 유래 조혈 세포 상의 야생형 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 발현 수준과 비교할 때 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%만큼 야생형 계통-특이적 세포-표면 항원(들)(예를 들어, CD33)만큼 발현 수준의 감소를 초래한다. 즉, 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 세포는 천연 유래 조혈 세포(예를 들어, 야생형 상대)와 비교할 때 야생형 계통-특이적 세포-표면 항원(들)(예를 들어, CD33)의 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 이하를 발현시킨다.

[0437] 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 전체 내인성 유전자가 결핍된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 전체 내인성 유전자는 결실되었다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 내인성 유전자의 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 일부(예를 들어, 절단된 단백질)를 발현시킨다. 다른 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 내인성 유전자의 일부는 결실되었다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 유전자의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 이상은 결실되었다.

[0438] 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 세포 상에서의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 엑손에 의해 암호화된 에피토프의 발현은 천연 유래 조혈 세포(예를 들어, 야생형 상대) 상의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 에피토프의 발현과 비교된다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작은 천연 유래 조혈 세포 상의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 에피토프 발현과 비교할 때 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%만큼 계통-특이적 세포-표면 항원(들)의 에피토프의 발현 수준의 감소를 초래한다. 즉, 일부 실시형태에서, 유전자 조작된 조혈 세포는 천연 유래 조혈 세포(예를 들어, 야생형 상대)와 비교할 때 계통-특이적 세포-표면 항원(들)(예를 들어, CD33)의 에피토프의 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 더 적게 발현시킨다.

[0439] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환은 내인성 유전자의 엑손에 의해 암호화된 에피토프에서 이루어진다.

[0440] 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 조혈 세포가 항원(들)이 결핍되도록(예를 들어, 항원(들)의 실질적으로 감소된 발현을 갖도록), 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부는 결실되거나 하나 이상의 비-암호화 서열일 수 있다.

[0441] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이다. CD33의 예측된 구조는 2개의 면역글로불린 도메인, 즉, IgV 도메인 및 IgC2 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD33의 엑손 2는 결실된다. 일부 실시형태에서, 내인성 CD33 유전자의 엑손 2에서의 변경된 스플라이스 수용자 또는 엑손 스플라이싱 인핸서는 변경되고, 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 CD33의 엑손 2에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준을 야기한다.

[0442] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이다. 일부 실시형태에서, EMR2의 엑손 13은 결실된다. 일부 실시형태에서, 내인성 EMR2 유전자의 엑손 13에서의 변경된 스플라이스 공여자는 변경되고, 변경은 야생형 상대 세포와 비교할 때 EMR2의 엑손 13에 의해 암호화된 에피토프의 감소된 발현 수준

을 야기한다. 일부 실시형태에서, 대안의 스플라이싱은 야생형 상대 세포와 비교할 때 돌연변이 또는 절단된 EMR2의 초기 코돈 종결 및 생산을 유도한다.

- [0443] 하나 이상의 세포-표면 계통-특이적 항원에서 결핍되거나 변경된 임의의 유전자 조작된 조혈 세포, 예컨대, HSC는 일상적인 방법에 의해 또는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 조작은 게놈 편집을 이용하여 수행된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "게놈 편집"은 표적 유전자의 발현을 낮추기 위해 유기체의 임의의 단백질-암호화 또는 비-암호화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 게놈을 변형시키는 방법을 지칭한다.
- [0444] 본 개시내용의 일 양상에서, 정상 세포의 변형된 집단에 의한 종양 세포의 대체는 계통-특이적 항원이 변형된 정상 세포를 이용하여 수행된다. 이러한 변형은 규칙적인 간격을 둔 짧은 회문구조 반복부(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat: CRISPR)-기반 염기 편집기 시스템을 이용하는 임의의 계통 특이적 항원의 고갈 또는 저해를 포함할 수 있다.
- [0445] CRISPR-Cas 시스템은 박테리아, 인간, 초파리, 제브라피시 및 식물을 포함하지만, 이들이 제한되지 않는, 다양한 유기체의 게놈을 편집하기 위해 성공적으로 이용되었다. 예를 들어, 문헌[Jiang et al., *Nature Biotechnology* (2013) 31(3):233; Qi et al., *Cell* (2013) 5:1173; DiCarlo et al., *Nucleic Acids Res.* (2013) 7:4336; Hwang et al., *Nat. Biotechnol* (2013), 3:227); Gratz et al., *Genetics* (2013) 194:1029; Cong et al., *Science* (2013) 6121:819; Mali et al., *Science* (2013) 6121:823; Cho et al. *Nat. Biotechnol* (2013) 3: 230; 및 Jiang et al., *Nucleic Acids Research* (2013) 41(20):e188]을 참조한다.
- [0446] 본 개시내용은 계통 특이적 항원 폴리뉴클레오타이드에서 표적 서열과 혼성화되는 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하며, 여기서, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 DNA-변형 효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질, 즉, 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 Cas9 틸내기효소 및 단일 가이드 RNA를 포함한다. CRISPR-기반 염기 편집기 복합체는 계통 특이적 항원 폴리뉴클레오타이드에 결합할 수 있고, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환을 가능하게 하여, 폴리뉴클레오타이드를 변형시킨다.
- [0447] 본 개시내용의 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 유전자 내의 또는 인접한 암호화 또는 비암호화 영역, 예를 들어, 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론 내의, 또는 암호화 영역 상류 또는 하류 중 하나의 비-전사 영역 내의, 관심의 영역에 결합하고/하거나 이를 절단할 수 있다. 본 개시내용에서 사용되는 가이드 RNA(gRNA)는, gRNA가 게놈 내 사전 결정된 절단 부위(표적 부위)에 대한 염기 편집기 단백질-gRNA 복합체의 결합을 지지하도록 설계될 수 있다. 절단 부위는 알려지지 않은 서열의 영역 또는 SNP, 뉴클레오타이드 삽입, 뉴클레오타이드 결실, 재배열 등을 포함하는 영역을 포함하는 단편을 방출하도록 선택될 수 있다.
- [0448] 본 개시내용에서 사용되는 가이드 RNA(gRNA)는, gRNA가 게놈 내 사전 결정된 표적 부위에 대한 염기 편집기 단백질-gRNA 복합체의 결합을 지지하도록 설계될 수 있다. 표적 부위는 SNP, 뉴클레오타이드 삽입, 뉴클레오타이드 결실, 재배열 등을 포함하는 영역일 수 있다.
- [0449] 용어 "gRNA", "가이드 RNA" 및 "CRISPR 가이드 서열"은 전체적으로 상호 호환적으로 사용될 수 있고, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 염기 편집기 단백질의 특이성을 결정하는 서열을 포함하는 핵산을 지칭한다. gRNA는 숙주 세포의 게놈에서 표적 핵산 서열에 (상보적으로, 부분적으로 또는 완전히) 혼성화된다. 표적 핵산에 혼성화는 gRNA 또는 이의 일부는 15 내지 25개의 뉴클레오타이드, 18 내지 22개의 뉴클레오타이드 또는 19 내지 21개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산에 혼성화하는 gRNA 서열은 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 표적 핵산에 혼성화하는 gRNA 서열은 10 내지 30개 또는 15 내지 25개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0450] 표적 핵산에 결합하는 서열에 추가로, 일부 실시형태에서, gRNA는 또한 스캐폴드 서열을 포함한다. 표적 핵산 및 스캐폴드 서열에 상보적인 서열을 둘 다 암호화하는 gRNA의 발현은 표적 핵산에 대한 결합(혼성화)과 표적 핵산에 대한 엔도뉴클레아제의 보충 둘 다의 이중적인 기능을 갖고, 이는 부위-특이적 CRISPR 활성을 초래한다. 일부 실시형태에서, 이러한 키메라 gRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)로서 지칭될 수 있다.
- [0451] 일부 실시형태에서, gRNA는 변형되고, 예를 들어, 화학적으로 변형된다. 변형된 gRNA는 다음 중 적어도 하나의 화학적 구조에 대해 변형을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함한다: 핵염기, 당 및 포스포다이에스터 결합 또는 골격 위치(예를 들어, 뉴클레오타이드 인산염). 예시적인 gRNA 변형은 당염자에게 분명할 것이고, 예를 들어, 문헌[Lee et al., *Elife* (2017) May 2:6] 및 미국 특허 공개 제2016/0289675호에서 찾을 수 있다. 추가적인 적합한 변형은 포스포로티오에이트 골격 변형, 2'-O-Me-변형 당, 2'-F-변형 당, 리보스 당의 이환식 뉴클

레오타이드-cEt로의 대체, 3'티오PACE(MSP) 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 적합한 gRNA 변형은, 예를 들어, 예를 들어, 문헌[Rahdar et al. *PNAS* (2015) 112 (51): E7110-E7117 및 Hendel et al., *Nat Biotechnol.* (2015 Sep) 33(9): 985-989]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본 명세서에 이들의 전문이 참조에 의해 인용된다.

[0452]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 gRNA는 화학적으로 변형된다. 예를 들어, gRNA는 하나 이상의 2'-O 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부에서 2'-O 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부에서 2'-O 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부와 3' 단부 둘 다에서 2'-O-변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 5' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 5' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부의 제2 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제4 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시형태에서, gRNA의 3' 단부에서 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시형태에서, gRNA의 3' 단부에서 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 5' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 제2 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제4 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 대한 인산염 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 대한 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 대한 티오PACE 결합을 포함한다.

[0453]

일부 실시형태에서, gRNA는 하나 이상의 2'-O-변형 및 3' 인-변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 및 3' 단부에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 하나 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 대체된 골격을 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 5' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 5' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형이다. 일부 실시형태에서, gRNA의 3' 단부에서 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시형태에서, gRNA의 3' 단부에서 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터의 제2 뉴클레오타이드 및 gRNA의 5' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 제2 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터의 제3 뉴클레오타이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제4 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3' 인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다.

이드 및 gRNA의 3' 단부로부터의 제4 뉴클레오타이드는 각각 티오PACE 결합을 포함한다.

- [0457] gRNA의 화학적 변형은, 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용되는 문헌[Hendel et al., *Nature Biotech.* (2015) 33(9)]에 기재되어 있다.
- [0458] tracrRNA로도 지칭되는 본 명세서에 사용된 바와 같은 "스캐폴드 서열"은 상보성 gRNA 서열에 결합된(혼성화된) 표적 핵산에 Cas 엔도뉴클레아제를 보충하는 핵산 서열을 지칭한다. 적어도 하나의 줄기 루프 구조를 포함하고 엔도뉴클레아제를 보충하는 임의의 스캐폴드 서열은 본 명세서에 기재된 유전자 요소 및 벡터에서 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드 서열은 당업자에게 분명할 것이고, 예를 들어, 문헌[Jinek, et al. *Science* (2012) 337(6096):816-821, Ran, et al. *Nature Protocols* (2013) 8:2281-2308], PCT 출원 공개 W02014/093694, 및 PCT 출원 공개 W02013/176772에서 찾을 수 있다.
- [0459] 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 스캐폴드 서열을 포함하지 않고, 스캐폴드 서열은 별개의 전사체로서 발현된다. 이러한 실시형태에서, gRNA 서열은 스캐폴드 서열 일부에 대해 상보성이고 스캐폴드 서열에 결합하는(혼성화하는) 작용을 하며 표적 핵산에 엔도뉴클레아제를 보충하는 추가적인 서열을 더 포함한다.
- [0460] 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 표적 핵산에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 적어도 100% 상보성이다(또한 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 gRNA 서열의 상보성의 교시를 위해 참조로 인용되는 미국 특허 제8,697,359호 참조). 표적 핵산의 3' 단부 근처의 표적 핵산과 CRISPR 가이드 서열 사이의 미스매치가 뉴클레아제 절단 활성을 없앨 수 있다는 것이 입증되었다(Upadhyay, et al. *Genes Genome Genetics* (2013) 3(12):2233-2238). 일부 실시형태에서, gRNA 서열은 표적 핵산의 3' 단부에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 적어도 100% 상보성이다(예를 들어, 표적 핵산 3' 단부의 마지막 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드).
- [0461] 표적 핵산은 엔도뉴클레아제와 상호작용할 수 있고 표적 핵산에 대한 엔도뉴클레아제 활성을 표적으로 하는 데 추가로 관련될 수 있는, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 의해 3' 측면 상에 측정된다. 일반적으로 표적 핵산에 측정하는 PAM 서열은 엔도뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제가 유래된 공급원에 따라 다른 것으로 여겨진다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NGG이다. 스트렙토코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NNGRRT이다. 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NNNNGATT이다. 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NNAGAA이다. 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NAAAAC이다. Cpf1 뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 TTN이다.
- [0462] 일부 실시형태에서, 세포를 유전자 조작하는 것은 또한 세포에 CRISPR-기반 염기 편집기 단백질을 도입하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 및 gRNA를 암호화하는 핵산은 동일한 핵산(예를 들어, 벡터) 상에 제공된다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 단백질 및 gRNA를 암호화하는 핵산은 상이한 핵산(예를 들어, 상이한 벡터) 상에 제공된다. 대안적으로, 또는 추가로, CRISPR-기반 염기 편집기는 단백질 형태로 세포에 제공 또는 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 CRISPR-기반 염기 편집기에 단백질 형태로 복합체화된다.
- [0463] 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 Cas9 효소 또는 이의 변이체이다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 스트렙토코커스 피오게네스(SpCas9), 스트렙토코커스 아우레우스(SaCas9), 네이세리아 메닝기티디스(NmCas9), 스트렙토코커스 써모필러스, 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)(CjCas9) 또는 트레포네마 덴티콜라로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 Cas9 상동체 또는 오솔로그이다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 단백질 활성을 변경시키도록 추가로 변형된다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 "틈내기효소" 또는 "Cas9n"으로 지칭되는 엔도뉴클레아제의 촉매 잔기 중 하나를 비활성화시키도록 변형되었다. Cas9 틈내기효소 엔도뉴클레아제는 표적 핵산의 하나의 DNA 가닥을 절단한다. 예를 들어, 문헌[Dabrowska et al. *Frontiers in Neuroscience* (2018) 12(75)]을 참조한다. 효소의 RuvC 및 HNH 촉매적 도메인에서 하나 이상의 돌연변이는 Cas9 효율을 개선시킬 수 있다는 것이 나타났다. 예를 들어, 문헌[Sarai et al. *Currently Pharma. Biotechnol.* (2017) 18(13)]을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 촉매적으로 비활성화된 Cas9이다. 예를 들어, dCas9는 촉매적으로 활성 잔기의 돌연변이(D10 및 H840)를 포함하고, 뉴클레아제 활성을 갖지 않는다. 대안적으로, 또는 추가로, Cas9 엔도뉴클레아제는 다른 단백질 또는 이의 일부에 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, dCas9는 리프레

서 도메인, 예컨대, KRAB 도메인에 융합된다. 일부 실시형태에서, 이러한 dCas9 융합 단백질은 다중복합 유전자 리프레션(예를 들어, CRISPR 간섭(CRISPRi))에 대해 본 명세서에 기재된 작제물과 함께 사용된다. 일부 실시형태에서, dCas9는 활성체 도메인, 예컨대, VP64 또는 VPR에 융합된다. 일부 실시형태에서, 이러한 dCas9 융합 단백질은 유전자 활성화(예를 들어, CRISPR 활성화(CRISPRa))를 위해 본 명세서에 기재된 작제물과 함께 사용된다. 일부 실시형태에서, dCas9는 후성적 조절 도메인, 예컨대, 히스톤 데메틸라제 도메인 또는 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 도메인에 융합된다. 일부 실시형태에서, dCas9는 LSD1 또는 p300, 또는 이의 일부에 융합된다. 일부 실시형태에서, dCas9 융합은 CRISPR-기반 후성적 조절을 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, dCas9 또는 Cas9는 Fok1 뉴클레아제 도메인에 융합된다. 일부 실시형태에서, Fok1 뉴클레아제 도메인에 융합된 Cas9 또는 dCas9는 게놈 편집을 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, Cas9 또는 dCas9는 형광 단백질(예를 들어, GFP, RFP, mCherry 등)에 융합된다. 일부 실시형태에서, 형광 단백질에 융합된 Cas9/dCas9 단백질은 게놈 좌위의 표지 및/또는 시각화 또는 Cas 엔도뉴클레아제를 발현시키는 세포의 식별을 위해 사용된다.

[0464] 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 효소의 특이성을 향상시키도록 변형된다(예를 들어, 비표적 효과를 감소시키고, 강한 표적 상 절단을 유지함). 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 향상된 특이성 Cas9 변이체(예를 들어, eSPCas9)이다. 예를 들어, 문헌[Slaymaker et al. *Science* (2016) 351 (6268): 84-88]을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 고충실도 Cas9 변이체(예를 들어, SpCas9-HF1)이다. 예를 들어, 문헌[Kleinstiver et al. *Nature* (2016) 529: 490-495]을 참조한다.

[0465] Cas 효소, 예컨대, Cas 엔도뉴클레아제는 당업계에 공지되어 있으며, 다양한 공급원으로부터 얻을 수 있고/있거나, 효소의 하나 이상의 활성 또는 특이성을 조절하기 위해 조작/변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 효소는 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 실시형태에서, Cas 효소는 조작/변형 없이 Cas 효소가 인식하는 PAM 서열과 상이한 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 실시형태에서, Cas 효소는 효소의 비표적 활성을 감소시키도록 조작/변형되었다.

[0466] 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 엔도뉴클레아제 활성의 특이성을 추가로 변경하도록 변형된다(예를 들어, 비표적 절단의 감소, 세포에서 Cas 엔도뉴클레아제 활성 또는 생애의 감소, 상동-직접(homology directed) 재조합의 증가 및 비-상동성 말단 봉합의 감소). 예를 들어, 문헌[Komor et al. *Cell* (2017) 168: 20-36]을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 엔도뉴클레아제의 PAM 인식을 변경시키도록 변형된다. 예를 들어, Cas 엔도뉴클레아제 SpCas9는 PAM 서열 NGG를 인식하는 반면, 엔도뉴클레아제(예를 들어, VQR SpCas9, EQR SpCas9, VRER SpCas9)의 하나 이상의 변형을 포함하는 SpCas9의 완화된 변이체는 PAM 서열 NGA, NGAG, NGCG를 인식할 수 있다. Cas 엔도뉴클레아제가 변형되지 않은 Cas 엔도뉴클레아제와 비교할 때 더 잠재적인 PAM 서열을 인식하는 경우에, 변형된 Cas 엔도뉴클레아제의 PAM 인식은 "완화된" 것으로 간주된다. 예를 들어, Cas 엔도뉴클레아제 SaCas9는 PAM 서열 NNGRRT를 인식하는 반면, 엔도뉴클레아제의 하나 이상의 변형을 포함하는 SaCas9(예를 들어, KKH SaCas9)의 완화된 변이체는 PAM 서열 MNNRRT를 인식할 수 있다. 일례로서, Cas 엔도뉴클레아제 FnCas9는 PAM 서열 NNG를 인식하는 반면, 엔도뉴클레아제의 하나 이상의 변형을 포함하는 FnCas9(예를 들어, RHA FnCas9)의 완화된 변이체는 PAM 서열 YG를 인식할 수 있다. 일례로서, Cas 엔도뉴클레아제는 치환 돌연변이 S542R 및 K607R을 포함하는 Cpf1 엔도뉴클레아제이고, PAM 서열 TYCV를 인식한다. 일례로서, Cas 엔도뉴클레아제는 치환 돌연변이 S542R, K607R 및 N552R을 포함하는 Cpf1 엔도뉴클레아제이고, PAM 서열 TATV를 인식한다. 예를 들어, 문헌[Gao et al. *Nat. Biotechnol.* (2017) 35(8): 789-792]을 참조한다.

[0467] 일부 실시형태에서, 하나 초과(예를 들어, 2, 3 이상의) Cas 엔도뉴클레아제가 사용된다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제 중 적어도 하나는 Cas9 효소이다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제 중 적어도 하나는 Cpf1 효소이다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제 중 적어도 하나는 스트렙토코커스 피오게네스로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제 중 적어도 하나는 스트렙토코커스 피오게네스로부터 유래되고, Cas9 엔도뉴클레아제 중 적어도 하나는 스트렙토코커스 피오게네스가 아닌 유기체로부터 유래된다.

[0468] 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 염기 편집기이다. 염기 편집기 엔도뉴클레아제는 일반적으로 기능 도메인에 융합된 촉매적 비활성화 Cas 엔도뉴클레아제를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964; Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788]을 포함한다.

[0469] CRISPR-기반 염기 편집 시스템은 일반적으로, 편집을 생성하는 데아미나제에 융합된 Cas 틸내기효소 또는 Cas; Cas를 특정 좌위로 표적화하는 gRNA; 및 Cas 단백질에 의해 구체화된 편집 창 내의 편집을 위한 표적 염기를 포함한다.

- [0470] 현재 두 부류의 염기 편집기, 즉, 사이토신(CBE) 및 아데닌(ABE)이 있다. CBE는 C의 T로의 변화(또는 반대 가닥 상에서 G의 A로의 변화)를 매개한다. ABE는 A의 G로의 변화(또는 반대 가닥 상에서 T의 C로의 변화)를 생성한다. 이는 12개의 가능한 변화 중 4개만을 설명한다.
- [0471] 제1 사이토신 염기 편집기는 사이티딘 데아미나제를 비활성 dCas9와 결합시킴으로써 생성되었다(Komor et al., *Nature* (2016) 533:420-424). 이들 융합은 DNA를 절단하지 않고 사이토신을 유라실로 전환시킨다. 이어서, 유라실은 후속적으로 DNA 복제 또는 수선을 통해 티민으로 전환된다. 유라실 DNA 글리코실라제(UGI)의 저해제를 dCas9에 융합시키는 것은 U를 다시 C 돌연변이로 변화시키는 염기 절단 수선을 방지한다. 염기 편집 효율을 증가시키기 위해, Cas 틱내기효소는 dCas9 대신 사용되었다. 얻어진 편집기, 즉, BE3은 세포에 대해 "새로 합성된" 것으로 나타나도록 비변형 DNA 가닥의 틱을 낸다. 따라서, 세포는 염기 편집을 복제하는 주형으로서 U-함유 가닥을 이용하여 DNA를 수선한다.
- [0472] 제4 세대 염기 편집기인 BE4는 더 이른 BE에 의해 더 이른 BE에 의해 발생될 수 있는 원치않는 C->G 또는 C->A 전환을 감소시킨다. 이들 부산물은 염기 절단 수선 동안 유라실 N-글리코실라제(UNG)에 의해 절단으로부터 초래될 가능성이 있다. UNG 저해제인 UGI의 제2 복제물을 첨가하는 것은 염기 편집 산물 순도를 증가시킨다. APOBEC1-Cas9n 및 Cas9n-UGI 링커는 산물 순도를 개선시키기 위해 연장되었고, 이들 3가지 개선은 염기 편집기의 제4 세대를 나타낸다. BE3에 비해서, BE4는 C->G 및 C->A 산물의 2.3배 감소뿐만 아니라 삼염기결실 형성의 2.3배 감소를 제공한다.
- [0473] 포유류 편집을 위해 염기 편집 효율을 개선시키는 것은 편집기가 이를 핵으로 만든다는 것과 이들이 제대로 발현된다는 것을 보장하는 것이다. BE4의 핵 국제화 신호 및 코돈 사용빈도(codon usage)는 BE4max 및 AncBE4max를 생성하도록 개선되었고 편집 효율은 4.2 내지 6배 개선되었다(Koblan et al., *Nat Biotechnol* (2018) 36:843-846).
- [0474] 아데닌 염기 편집기는 아데닌을 이노신으로 전환시켜, A를 G로의 변화를 초래한다(Gaudelli et al., *Nature* (2017) 551:464-471). 아데닌 염기 편집기 상에서의 생성은 알려진 DNA 아데닌 데아미나제가 없기 때문에 추가 단계를 필요로 한다. 이들은 RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터의 하나를 생성하도록 유도 진화(directed evolution)를 사용하였다.
- [0475] 핵 국제화 및 발현을 개선시킴으로써 아데닌 염기 편집기에 의해 개선이 또한 이루어졌다. 2020년에, 가요성 및 특이성을 표적으로 하는 염기 편집기를 개선시킨 ABE7.10으로부터 진화된 추가적인 ABE를 설명하는 2개의 논문이 공개되었다. 이것에서 첫 번째 ABE8e가 생성되었는데, 이는 비표적 활성을 증가시키는 일 없이 ABE7.10으로부터의 TadA보다 대략 590배 더 빨리 편집한다(Richter et al., *Nat Biotechnol* (2020) 38:883-891).
- [0476] 추가적으로, 개시 지점으로서 ABE7.10을 이용하여, Gaudelli는 염기 편집기를 40개의 새로운 ABE8 변이체를 진화시켰다(Gaudelli et al., *Nat Biotechnol* (2020) 38:892-900). ABE7.10에 비해서, ABE8s는 프로토스페이스 위치 A5 내지 A7에서 1.5배 더 많은 편집 및 NGG PAM의 위치 A3 내지 A4 및 A8 내지 A10 위치에서 3.2배 더 많은 편집 및 ABE7.10에 비해 비-NGG PAM 변이체에서 4.2-배 더 높은 편집 효율을 초래하였다. ABE8s는 이전에 표적으로 하는 것이 어려운 부위에서조차 개선된 염기 편집 능력을 가진다. ABE8s는 1차 T 세포에서 98 내지 99% 표적 변형을 달성하여, 세포 요법 적용을 위한 유망한 도구로 만들 수 있다.
- [0477] 일부 실시형태에서, 촉매적으로 비활성인 Cas 엔도뉴클레아제는 dCas9이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 하나 이상의 유라실 글리코실라제 저해제(UGI) 도메인에 융합된 dCas9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기(ABE)에 융합된 dCas9, 예를 들어, RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터 진화된 ABE를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 ABE8e에 융합된 dCas9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 사이티딘 데아미나제 효소(예를 들어, APOBEC 데아미나제, pmCDA1, 활성화-유도 사이티딘 데아미나제(AID))에 융합된 dCas9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 BE4max에 융합된 dCas9를 포함하였다.
- [0478] 일부 실시형태에서, 촉매적으로 비활성인 Cas 엔도뉴클레아제는 Cas9 틱내기효소 또는 Cas9n이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 하나 이상의 유라실 글리코실라제 저해제(UGI) 도메인에 융합된 Cas9 틱내기효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기(ABE)에 융합된 Cas9 틱내기효소, 예를 들어, RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터 진화된 ABE를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 ABE8e에 융합된 Cas9 틱내기효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 사이티딘 데아미나제 효소(예를 들어, APOBEC 데아미나제, pmCDA1, 활성화-유도 사이티딘 데아미나제(AID))에 융합된 Cas9 틱내기효소를

포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 BE4max에 융합된 Cas9 틱내기효소를 포함한다.

- [0479] 염기 편집기의 예는 BE1, BE2, BE3, HF-BE3, BE4, BE4max, AncBE4max, BE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-CE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaBE4, SaBE4-Gam, Sa(KKH)-BE3, Target-AID, Target-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRISPR-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10*, xABE, ABESa, ABE8e, VQR-ABE, VRER-ABE, Sa(KKH)-ABE 및 CRISPR-SKIP을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 염기 편집기의 추가적인 예는, 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용되는 US 공개 제2018/0312825A1호, US 공개 제2018/0312828A1호 및 PCT 공개 WO 2018/165629A1에서 찾을 수 있다.
- [0480] 일부 실시형태에서, 염기 편집기는 표적 부위에서 절단 수선을 저해하고 세포 미스매치 수선을 유도하도록 추가로 변형되었다. 본 명세서에 기재된 임의의 Cas 엔도뉴클레아제는 Cas 엔도뉴클레아제를 분해 및 엑소뉴클레아제 활성으로부터 보호하기 위해 Gam 도메인(박테리오파지 Mu 단백질)에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964]을 참조한다.
- [0481] 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 Cas 엔도뉴클레아제의 클래스 2 V형에 속한다. 클래스 2 V형 Cas 엔도뉴클레아제는 V-A형, V-B형, V-C형 및 V-U형으로서 추가로 범주화될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Stella et al. *Nature Structural & Molecular Biology* (2017)]을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 V-A형 Cas 엔도뉴클레아제, 예컨대, Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 V-B형 Cas 엔도뉴클레아제, 예컨대, C2c1 엔도뉴클레아제이다. 예를 들어, 문헌[Shmakov et al. *Mol Cell* (2015) 60: 385-397]을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 Mad7이다.
- [0482] 대안적으로, 또는 추가로, Cas 엔도뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제 또는 이들의 변이체이다. 당업자에 의해 인식될 바와 같이, Cas 엔도뉴클레아제 Cpf1 뉴클레아제는 또한 Cas12a로서 지칭될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Strohkendl et al. *Mol. Cell* (2018) 71: 1-9]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 프로베텔라 종(*Provetella spp.*) 또는 프란시셀라 종(*Francisella spp.*), 아시다미노코커스 종(*Acidaminococcus sp.*)(AsCpf1), 라크노스피라세아 박테륨(*Lachnospiraceae bacterium*)(LpCpf1) 또는 유박테륨 렉탈레(*Eubacterium rectale*)로부터 유래된 Cpf1 뉴클레아제를 발현시킨다. 일부 실시형태에서, Cpf1 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cpf1 엔도뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 단백질 활성을 변경시키도록 추가로 변형된다.
- [0483] Cpf1의 촉매적으로 비활성인 변이체(Cas12a)는 dCas12a로 지칭될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, Cpf1의 촉매적으로 비활성인 변이체는 염기 편집기를 형성하기 위해 기능 도메인에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 촉매적으로 비활성인 Cas 엔도뉴클레아제는 dCas12a이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 하나 이상의 유라실 글리코실라제 저해제(UGI) 도메인에 융합된 dCas12a를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기(ABE)에 융합된 dCas12a, 예를 들어, RNA 아데닌 테아미나제 TadA로부터 진화된 ABE를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 ABE8e에 융합된 dCas12a를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 사이티딘 테아미나제 효소(예를 들어, APOBEC 테아미나제, pmCDA1, 활성화-유도 사이티딘 테아미나제(AID))에 융합된 dCas12a를 포함한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 BE4max에 융합된 dCas12a를 포함한다.
- [0484] 대안적으로, 또는 추가로, Cas 엔도뉴클레아제는 Cas14 엔도뉴클레아제 또는 이의 변이체일 수 있다. Cas9 엔도뉴클레아제와 대조적으로, Cas14 엔도뉴클레아제는 고세균으로부터 유래되고, 크기가 더 작아지는 경향이 있다(예를 들어, 400 내지 700개의 아미노산). 엔도뉴클레아제는 PAM 서열을 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 문헌[Harrington et al. *Science* (2018)]을 참조한다.
- [0485] 본 명세서에 기재된 임의의 Cas 엔도뉴클레아제는 목적하는 시간에 Cas 엔도뉴클레아제의 발현 및/또는 활성 수준을 조절하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 세포 주기의 특정 기(들) 동안에 Cas 엔도뉴클레아제의 발현 및/또는 활성 수준을 증가시키는 것이 유리할 수 있다. 상동성-관련 수선 수준은 세포 주기의 G1기 동안에 감소되며, 따라서, S기, G2기 및/또는 M기 동안에 Cas 엔도뉴클레아제의 발현 및/또는 활성 수준 증가가 Cas 엔도뉴클레아제 편집 후에 상동 직접 수선을 증가시킬 수 있다는 것이 입증되었다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제의 발현 및/또는 활성 수준은 세포 주기의 S기, G2기 및/또는 M기 동안에 증가된다. 일례로서, Cas 엔도뉴클레아제는 인간 게놈의 N-말단 영역에 융합된다. 예를 들어, 문헌[Gutschner et al. *Cell Rep.* (2016) 14(6): 1555-1566]을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제의 발현 및/또는 활성 수준은 G1기 동안에 감소된다. 일례로서, G1 기 동안 감소된 활성을 갖도록, Cas 엔도뉴클레아제가 변형된다. 예를 들어, 문헌[Lomova et al. *Stem Cells* (2018)]을 참조한다.

- [0486] 대안적으로, 또는 추가로, 본 명세서에 기재된 임의의 Cas 엔도뉴클레아제는 후성적 변형체(예를 들어, 염색질-변형 효소, 예를 들어, DNA 메틸라제, 히스톤 데아세틸라제)에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Kungulovski et al. *Trends Genet.* (2016) 32(2):101-113]을 참조한다. 후성적 변형자에 융합된 Cas 엔도뉴클레아제는 "후성효과기(epieffector)"로서 지칭될 수 있고, 시간 제약적 및/또는 일시적 엔도뉴클레아제 활성을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 염색질-변형 효소에 융합된 dCas9이다.
- [0487] 추가적으로 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 CRISPR의 프라임 편집 방법에서 사용될 수 있다. CRISPR-기반 프라임 편집기 시스템은 M-MLV 역전사효소(RT)에 융합된 Cas9 틱내기효소를 포함할 수 있다. 프라임 편집기 시스템은 또한 프라임 편집 가이드 RNA(pegRNA)를 사용한다. 프라임 편집은 CRISPR-기반 염기 편집기보다 더 많은 염기 치환을 가능하게 하고, 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있되, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내이고, 뉴클레오타이드 치환은 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다.
- [0488] 추가 실시형태에서, 상동 직접 수선은 본 명세서에 기재된 유전자 조작된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 생성하기 위해 사용되되, 뉴클레오타이드 치환은 스플라이스 요소를 암호화하는 서열 내이고, 뉴클레오타이드 치환은 상기 유전자에 의해 암호화된 전사체의 대안의 스플라이싱을 초래한다.
- [0489] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 조혈 세포에서 계통-특이적 세포-표면 항원을 저해하는 조성물 및 방법을 제공하되, 가이드 RNA 서열은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 조혈 세포에서 하나 이상의 계통-특이적 세포-표면 항원을 저해하는 조성물 및 방법을 제공하되, 가이드 RNA 서열은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화한다.
- [0490] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 조혈 세포에서 계통-특이적 세포-표면 항원을 변경시키는 조성물 및 방법을 제공하되, 가이드 RNA 서열은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 이용하여 조혈 세포에서 하나 이상의 계통-특이적 세포-표면 항원을 변경시키는 조성물 및 방법을 제공하되, 가이드 RNA 서열은 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화한다.
- [0491] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 CD33이고, gRNA는 CD33을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 CD33의 엑손 2에 축적하는 서열에 혼성화한다(도 4). CD33을 표적으로 하는 gRNA의 예는 표 4에 제공되지만, CD33의 관련 있는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 추가적인 gRNA가 개발되고 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0492] 일부 예에서, 본 개시내용에서 사용하기 위한 gRNA는 표 4의 임의의 예시적인 가이드 RNA 서열과 적어도 90%(예를 들어, 적어도 93%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 스페이스 서열을 포함할 수 있다.
- [0493] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원은 EMR2이고, gRNA는 EMR2를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 EMR2를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 엑손 13에 축적하는 서열에 혼성화한다(도 9B). EMR2를 표적으로 하는 gRNA의 예는 아래에 제공되지만, EMR2의 관련 있는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 추가적인 gRNA가 개발되고 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.
- [0494] 일부 예에서, 본 개시내용에서 사용하기 위한 gRNA는 서열번호 4 및 46 내지 47 중 어느 것에 대해 적어도 90%(예를 들어, 적어도 93%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%) 동일한 스페이스 서열을 포함할 수 있다.

표 4

염기 편집 CD33 및 EMR2 를 위한 예시적 가이드

계통-특이적 항원	염기 편집기	스플라이스 요소	gRNA	서열번호
CD33	BE4max	ESE	Sg207 GGGCcccTGTGGGGAAACGA GGG	1
CD33	BE4max	SA	Sg208 AGGGCcccTGTGGGGAAACG AGG	2
CD33	ABE8e	SA	sgSA CCCCaCaGGGGCCCTGGCTA TGG	3
EMR2	ABE	SD	sgRNA-EMR-SDex13 AGCACTCACACGGTGGGAGA AGG	4
EMR2	ABE		sgRNA-EMR2-SDex18 ATCTTACCTGTGTTCGGA GGG	46
EMR2	ABE		sgRNA-EMR2-SDex19 GTGGTACCTGCTGGCTGAGG AGG	47

[0495]

[0496]

추가적으로, 본 개시내용은 제1 계통-특이적 세포-표면 항원 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원, 즉, 제1 계통 특이적 항원, 제2 계통 특이적 항원, 제3 계통 특이적 항원, 제4 계통 특이적 항원 등의 조합된 저해를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0497]

추가적으로, 본 개시내용은 제1 계통-특이적 세포-표면 항원 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원, 즉, 제1 계통 특이적 항원, 제2 계통 특이적 항원, 제3 계통 특이적 항원, 제4 계통 특이적 항원 등의 조합된 변형을 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0498]

일부 실시형태에서, 제1 계통 특이적 항원은 CD33이다. 일부 실시형태에서, 제2 계통 특이적 항원은 EMR2이다.

[0499]

두 핵산의 "동일성 백분율"은 문헌[Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:5873-77]에서와 같이 변형된 문헌[Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87:2264-68]의 알고리즘을 이용하여 결정된다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* (1990) 215:403-10]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(버전 2.0)에 혼입된다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 본 발명의 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해 NBLAST 프로그램, 점수=100, 단어 길이=12에 의해 수행될 수 있다. 두 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, Gapped BLAST가 문헌[Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* (1997) 25(17):3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용할 때, 각 프로그램의 디폴트 파라미터(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)가 사용될 수 있다.

[0500]

또한 세포를 제공하는 단계 및 게놈 편집을 위해 세포에 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 성분을 도입하는 단계를 수반하는 계통-특이적 세포-표면 항원에서 결핍 또는 변경된 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화하거나 혼성화하는 것으로 예측된 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 핵산이 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, gRNA는 벡터 상의 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 세포에 도입된다. 일부 실시형태에

서, CRISPR-기반 염기 편집기는 세포에 CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 핵산으로서 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 gRNA 및 뉴클레오타이드 서열은 동일한 핵산(예를 들어, 동일한 벡터) 상에서 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 단백질 형태로 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 및 gRNA는 시험관내에서 미리 형성되고, 복합체로서 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, 복합체(예를 들어, 리보핵단백질 복합체)는 전기천공법을 이용하여 도입된다.

[0501] 또한 세포를 제공하는 단계 및 게놈 편집을 위한 하나 초과의 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 세포 성분을, 즉, 게놈 편집을 위한 CRISPR-기반 편집기 시스템에 계통-특이적 세포-표면 항원, 및 게놈 편집을 위한 CRISPR-기반 편집기 시스템에 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 도입하는 단계(예를 들어, 제1 및 제2 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템)를 수반하는, 하나 초과의 계통-특이적 세포-표면 항원에서 결핍되거나 변경된 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 하나 초과의 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 성분은 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부에 혼성화하거나 혼성화하는 것으로 예측된 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 핵산이 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, gRNA는 벡터 상의 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 세포에 CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 핵산으로서 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 gRNA 및 뉴클레오타이드 서열은 동일한 핵산(예를 들어, 동일한 벡터) 상에서 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기는 단백질 형태로 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, CRISPR-기반 염기 편집기 및 gRNA는 시험관내에서 미리 형성되고, 복합체로서 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, 복합체(예를 들어, 리보핵단백질 복합체)는 전기천공법을 이용하여 도입된다.

[0502] 일부 실시 형태에서, 제1 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 후속적 기반 염기 편집기 시스템과 상이한 방법에 의해 세포에 도입된다. 일부 실시 형태에서, 모든 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템은 동일한 방법을 이용하여 세포에 도입된다.

[0503] 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 하나 이상의 성분을 암호화할 수 있는 조작된, 비-천연 유래 벡터 및 벡터 시스템을 추가로 제공하되, 벡터는 (i) 계통 특이적 항원 서열에 혼성화되는 (CRISPR)-Cas 시스템 가이드 RNA 및 (ii) CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0504] 본 개시내용의 벡터는 포유류 발현 벡터를 이용하여 포유류 세포에서 하나 이상의 서열의 발현을 유도할 수 있다. 포유류 발현 벡터의 예는 pCDM8(Seed, *Nature* (1987) 329: 840) 및 pMT2PC(Kaufman, et al., *EMBO J.* (1987) 6: 187)를 포함한다. 포유류 세포에서 사용될 때, 발현 벡터의 대조군 기능은 전형적으로 하나 이상의 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 거대세포 바이러스, 유인원 바이러스 40 및 본 명세서에 개시되고 당업계 공지된 다른 것으로부터 유래된다. 원핵 세포와 진핵 세포 둘 다에 대한 다른 적합한 발현 시스템에 대해, 예를 들어, 문헌[Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]을 참조한다.

[0505] 본 개시내용의 벡터는 특정 세포 유형에서 핵산 발현을 우선적으로 지시할 수 있다(예를 들어, 핵산을 발현시키기 위해 조직-특이적 조절 요소가 사용된다). 이러한 조절 요소는 조직 특이적 또는 세포 특이적일 수 있는 프로모터를 포함한다. 용어 "조직 특이적"은 프로모터에 적용되는 경우에, 상이한 유형의 조직에서 관심의 동일한 뉴클레오타이드 서열 발현의 상대적 부재 하에 특정 유형의 조직(예를 들어, 시드(seed))에 대해 관심의 뉴클레오타이드 서열의 선택적 발현을 지시할 수 있는 프로모터를 지칭한다. 용어 "세포 유형 특이적"은 프로모터에 적용되는 경우에, 동일 조직 내의 상이한 유형의 세포에서 관심의 동일한 뉴클레오타이드 서열 발현의 상대적 부재 하에 특정 유형의 세포에서 관심의 뉴클레오타이드 서열의 선택적 발현을 지시할 수 있는 프로모터를 지칭한다. 용어 "세포 유형 특이적"은 프로모터에 적용되는 경우에 또한 단일 조직 내의 관심의 뉴클레오타이드 서열의 선택적 발현을 촉진시킬 수 있는 프로모터를 의미한다. 프로모터의 세포 유형 특이성은 당업계에 잘 공지된 방법, 예를 들어, 면역조직화학적 염색을 이용하여 평가될 수 있다.

[0506] 통상적인 바이러스 및 비바이러스 기반 유전자 전달 방법은 포유류 세포 또는 표적 조직에서 CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 핵산을 도입하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방법은 배양물에서 또는 숙주 유기체에서 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 성분을 암호화하는 핵산을 세포에 투여하기 위해 사용될 수 있다.

[0507] 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, RNA(예를 들어, 본 명세서에 기재된 벡터의 전사체), 네이키드 핵산, 및 전달 비히클과 복합체화된 핵산을 포함한다. 일 실시 형태에서, 사용되는 비-바이러스 벡터 전달 시

시스템은 사전 형성된 리보핵단백질 복합체(예를 들어, 표적화 gRNA와 복합체로 CRISPR-기반 염기 편집기 단백질을 포함하는 복합체)이다. 이어서, 사전 형성된 리보핵단백질 복합체는 전기천공법, 유전자 총법 또는 다른 물리적 전달 방법을 통해 세포에 도입될 수 있다. 일 실시형태에서, 전기천공법은 사전 형성된 리보핵단백질 복합체를 세포에 도입하기 위해 사용된다. 예를 들어, 실시예 1을 참조한다.

[0508] 바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 및 RNA 바이러스를 포함하며, 이는 세포에 전달 후 에피솜 또는 통합된 게놈 중 하나를 갖는다. 바이러스 벡터는 환자에 (생체내에서) 직접적으로 투여될 수 있거나, 이들은 변형된 세포기 환자에 투여될 수 있는 경우에 시험관내 또는 생체외에서 세포를 조작하는 데 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용은 유전자 전달을 위해 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 및 단순포진 바이러스 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 바이러스 기반 시스템을 이용한다. 더 나아가, 본 개시내용은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 숙주 게놈에 통합될 수 있는 벡터를 제공한다. 바람직하게는, 본 개시내용의 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 발현을 위해 사용되는 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0509] 일 실시형태에서, 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기를 암호화하는 하나 이상의 벡터를 진행 세포에 도입하는 것을 제공한다. 세포는 암세포일 수 있다. 대안적으로, 세포는 조혈 세포, 예컨대, 조혈모세포이다. 줄기 세포의 예는 다능성, 다분화능 및 단분화능 줄기 세포를 포함한다. 다능성 줄기 세포의 예는 배아 줄기 세포, 배아 생식세포, 배아 암종 세포 및 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용은 CRISPR-기반 염기 편집기를 조혈모세포에 도입하는 단계를 제공한다.

[0510] 본 개시내용의 벡터는 대상체에서 진행 세포에 전달된다. CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 통한 진행 세포의 변형은 세포 배양물에서 일어날 수 있으며, 상기 방법은 변형 전에 대상체로부터 진행 세포를 단리시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 상기 진행 세포 및/또는 이로부터 유래된 세포를 대상체에게 복귀시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0511] **병용 요법**

[0512] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제는 계통-특이적 세포-표면 항원 또는 이의 에피토프가 결핍된 조혈 세포, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템 및 gRNA를 이용하여 생산된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포와 병용하여 대상체에게 투여될 수 있되, 예를 들어, gRNA는 서열번호 1; 서열번호 2; 또는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0513] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, EMR2)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제는 계통-특이적 세포-표면 항원 또는 이의 에피토프가 결핍된 조혈 세포, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템 및 gRNA를 이용하여 생산된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포와 병용하여 대상체에게 투여될 수 있되, 예를 들어, gRNA는 서열번호 4; 서열번호 46; 및 서열번호 47의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0514] 또한 본 명세서에 기재된 바와 같이, 계통-특이적 세포-표면 항원(예를 들어, CD33)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제 및 적어도 하나의 추가적인 계통-특이적 세포-표면 항원에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제는 계통-특이적 세포-표면 항원 또는 이의 에피토프가 결핍된 조혈 세포, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템 및 gRNA를 이용하여 생산된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포와 병용하여 대상체에게 투여될 수 있되, 예를 들어, gRNA는

[0515] (서열번호 1);

[0516] (서열번호 2); 또는

[0517] (서열번호 3); 및

[0518] (서열번호 4);

[0519] (서열번호 46); 또는

[0520] (서열번호 47)의 뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0521] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "대상체", "개체" 및 "환자"는 상호 호환적으로 사용되고, 척추동물, 바람직하게는 인간과 같은 포유류를 지칭한다. 포유류는 인간 영장류, 비-인간 영장류 또는 무린, 소, 말, 개 또는 고양이

이 종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자이다.

- [0522] 일부 실시형태에서, 제제 및/또는 조혈 세포는 또한 본 개시내용의 범주 내에 있는 약제학적 조성물을 형성하기 위해 약제학적으로 허용 가능한 담체와 혼합될 수 있다.
- [0523] 본 명세서에 기재된 방법을 수행하기 위해, 유효량의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들) 및 유효량의 조혈 세포는 치료를 필요로 하는 대상체에게 공동 투여될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 용어 "치료적 유효량"과 상호 호환적으로 사용될 수 있으며, 치료를 필요로 하는 대상체에 투여 시 목적하는 활성을 초래하는 데 충분한 해당 제제의 양, 세포 집단 또는 약제학적 조성물(예를 들어, 제제 및/또는 조혈 세포를 포함하는 조성물)을 지칭한다. 본 개시내용의 문맥 내에서, 용어 "유효량"은 본 개시내용의 방법에 의해 치료되는 장애의 징후를 지연시키거나, 진행을 저지하거나, 적어도 하나의 증상을 완화 또는 경감하기에 충분한 화합물, 세포 집단, 또는 약제학적 조성물의 양을 지칭한다. 활성 성분의 조합물이 투여될 때, 유효량의 조합물이 개별적으로 투여되는 경우에 효과적인 각 성분의 양을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다는 것을 주목한다.
- [0524] 유효량은, 당업자가 인식할 바와 같이 의료 종사자의 지식 및 기술 내에서 치료 중인 특정 병태, 병태의 중증도, 연령, 신체 상태, 크기, 성별 및 체중을 비롯한 개개 환자 파라미터, 치료의 지속기간, 병행 요법의 특성(존재하는 경우), 구체적 투여 경로 등의 인자에 따라 다르다. 일부 실시형태에서, 유효량은 증상을 경감, 완화, 호전, 개선, 감소시키거나, 대상체에서 임의의 질환 또는 장애의 진행을 지연시킨다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자이다.
- [0525] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 키메라 수용체를 발현시키는 조혈 세포 및/또는 면역 세포는 대상체에 대해 자가일 수 있고, 즉, 세포는 치료를 필요로 하는 대상체로부터 얻어지거나, 세포-표면 계통-특이적 항원의 발현을 위해 또는 키메라 수용체 작제물의 발현을 위해 결핍되거나 변경되도록 유전자 조작되고, 이어서, 동일한 대상체에게 투여된다. 대상체에 대한 자가 세포의 투여는 비-자가 세포의 투여에 비해 숙주 세포의 감소된 거부를 초래할 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포는 동종이계 세포이며, 즉, 세포는 제1 대상체로부터 얻으며, 세포-표면 계통-특이적 항원의 발현을 위해 또는 키메라 수용체 작제물을 위해 결핍 또는 변경되도록 유전자 조작되고, 제1 대상체와 상이하지만 동일한 종인 제2 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 동종이계 면역 세포는 인간 공여자로부터 유래될 수 있고, 공여자와 상이한 인간 수용자에게 투여될 수 있다.
- [0526] 일부 실시형태에서, 임의의 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포는 적어도 20%, 예를 들어, 50%, 80%, 100%, 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배 이상만큼 표적 세포(예를 들어, 암 세포) 수를 감소시키는 데 효과적인 양으로 대상체에게 투여된다.
- [0527] 포유류(예를 들어, 인간)에게 투여되는 세포, 즉, 면역 세포 또는 조혈 세포의 전형적인 양은, 예를 들어, 1백만개 내지 1천억개의 세포 범위일 수 있지만; 그러나 이 예시적인 범위 미만 또는 초과 양이 또한 본 개시내용의 범주 이내이다. 예를 들어, 세포의 1일 용량은 약 1백만개 내지 약 5백억개의 세포(예를 들어, 약 5백만개의 세포, 약 2천 5백만개의 세포, 약 5억개의 세포, 약 10억개의 세포, 약 5십억개의 세포, 약 2백억개의 세포, 약 3백억개의 세포, 약 4백억개의 세포 또는 앞서 언급한 값 중 어느 둘에 의해 정해지는 범위), 바람직하게는 약 1천만개 내지 약 1천억개의 세포(예를 들어, 약 2천만개의 세포, 약 3천만개의 세포, 약 4천만개의 세포, 약 6천만개의 세포, 약 7천만개의 세포, 약 8천만개의 세포, 약 9천만개의 세포, 약 1백억개의 세포, 약 2백 5십억개의 세포, 약 5백억개의 세포, 약 7백 5십억개의 세포, 약 9백억개의 세포 또는 앞서 언급한 값 중 어느 둘에 의해 정해지는 범위), 더 바람직하게는 약 1억개의 세포 내지 약 5백억개의 세포(예를 들어, 약 1억 2천만개의 세포, 약 2억 5천만개의 세포, 약 3억 5천만개의 세포, 약 4억 5천만개의 세포, 약 6억 5천만개의 세포, 약 8억개의 세포, 약 9억개의 세포, 약 3십억개의 세포, 약 3백억개의 세포, 약 4백 5십억개의 세포 또는 앞서 언급한 값 중 어느 둘에 의해 정해지는 범위)일 수 있다.
- [0528] 일 실시형태에서, 키메라 수용체(예를 들어, 키메라 수용체를 암호화하는 핵산)는 면역 세포에 도입되고, 대상체(예를 들어, 인간 환자)는 초기 투여 또는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포의 용량을 받는다. 제제(예를 들어, 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포)의 1회 이상의 후속 투여는 앞의 투여 후 15일, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2일의 간격으로 환자에게 제공될 수 있다. 제제의 1회 초과 용량은 주당, 예를 들어, 2, 3, 4회 이상의 제제의 투여로 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체는 주당 1회 초과 용량의 제제(예를 들어, 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포), 다음에 제제의 투여 없이 1주, 최종적으로, 그 다음에 1회 이상의 추가 용량의 제제(예를 들어, 주당 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포의 1회 초과 투여)를 받

을 수 있다. 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 이상 동안 주당 3회의 투여로 격일로 투여될 수 있다.

[0529] 본 명세서에 열거된 임의의 질환 병태에 관한 한 본 개시내용과 관련하여, 용어 "치료하다", "치료" 등은 이러한 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 경감 또는 완화시키거나, 또는 이러한 병태의 진행을 늦추거나 반전시키는 것을 의미한다. 본 개시내용의 의미 내에서, 용어 "치료하다"는 또한 발병(즉, 질환의 임상적 징후 전의 기간)을 저지, 지연시키고/시키거나 질환이 발생 또는 악화될 위험을 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 암과 관련하여 용어 "치료하다"는 환자의 종양 부담을 제거 또는 감소시키거나, 전이를 예방, 지연 또는 저해하는 것을 의미할 수 있다.

[0530] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편 및 계통-특이적 세포-표면 항원(들)이 결핍 또는 변경된 조혈 세포의 집단을 포함하는 제제(들). 따라서, 이러한 치료 방법에서, 제제(들)은 제제(들)에 의해 표적화되는 세포 유형의 계통-특이적 세포-표면 항원(들) 재증식을 발현시키는 표적 세포를 인식(결합)한다. 일부 실시형태에서, 환자의 치료는 다음의 단계를 수반할 수 있다: (1) 치료적 유효량의 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 표적으로 하는 제제를 환자에게 투여하는 단계; 및 (2) 자가 또는 동종이계 중 하나인 조혈모세포를 환자에게 주입 또는 재주입하는 단계, 여기서, 조혈 세포는 계통 특이적 질환-연관 항원(들)의 감소 또는 변경된 발현을 갖는다. 일부 실시형태에서, 환자의 치료는 다음의 단계: (1) 치료적 유효량의 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포를 환자에게 투여하는 단계로서, 면역 세포는 계통-특이적 세포-표면, 질환-연관 항원(들)에 결합하는 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 단계; 및 (2) 자가 또는 동종이계 중 하나인 조혈 세포(예를 들어, 조혈모세포)를 환자에게 주입 또는 재주입하는 단계를 수반할 수 있으며, 여기서, 조혈 세포는 계통 특이적 질환-연관 항원(들)의 감소 또는 변경된 발현을 갖는다.

[0531] 세포-표면 계통-특이적 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들) 및 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에서 결핍 또는 변경된 조혈 세포의 집단을 이용하는 치료 방법의 효능은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있고, 당업자에게 분명할 것이다. 예를 들어, 치료 효능은 대상체의 생존, 대상체 또는 이의 조직 또는 샘플에서의 암 부담에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 요법의 효능은 세포의 특정 집단 또는 계통에 속하는 세포 수를 정량화함으로써 평가된다. 일부 실시형태에서, 요법의 효능은 세포-표면 계통-특이적 항원을 제시하는 세포 수를 정량화함으로써 평가된다.

[0532] 일부 실시형태에서, 세포-표면 계통-특이적 항원에 결합하는 항원-결합 단편 및 조혈 세포의 집단을 포함하는 제제는 병행하여 투여된다.

[0533] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들)(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포)는 조혈 세포의 투여 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들)(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포)는 조혈 세포의 투여 전 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 이상에 투여된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들)(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포)는 조혈 세포의 투여 전에 대상체에게 여러 번 투여된다.

[0534] 일부 실시형태에서, 조혈 세포는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들)(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포) 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포의 집단은 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 제제(들)의 투여 전 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 이상에 투여된다.

[0535] 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원 및 조혈 세포의 집단을 표적으로 하는 제제(들)는 실질적으로 동시에 투여된다. 일부 실시형태에서, 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 표적으로 하는 제제가 투여되고, 환자는 일정 기간 동안 평가되며, 이후에 조혈 세포의 집단이 투여된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포의 집단이 투여되고, 환자는 일정 기간 동안 평가되며, 이후에 계통-특이적 세포-표면 항원(들)을 표적으로 하는 제제가 투여된다.

[0536] 또한 제제 및/또는 조혈 세포의 집단의 다회 투여(예를 들어, 용량)는 본 개시내용의 범주 이내이다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포의 제제 및/또는 집단은 대상체에게 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포의 제제

및/또는 집단은 대상체에게 1회 이상(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5회 이상) 투여된다. 일부 실시형태에서, 조혈 세포의 제제 및/또는 집단은 규칙적 간격으로, 예를 들어, 6개월마다 대상체에게 투여된다.

[0537] 일부 실시형태에서, 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 대상체이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 조혈 악성종양은 조혈 세포(예를 들어, 선조 세포 및 줄기 세포를 포함하는 혈액 세포)를 수반하는 악성 이상을 지칭한다. 조혈 악성종양의 예는 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병 또는 다발성 골수종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프모양 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병 또는 만성 림프모구 백혈병 및 만성 림프모양 백혈병을 포함한다.

[0538] 일부 실시형태에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML)이다. AML은 중요한 분화 및 성장-조절 경로를 붕괴시키는 계속해서 획득되는 중요한 유전적 변화를 갖는 형질전환 세포로부터 유래된 이종성, 클론, 신생물 질환으로서 특성구명된다. (Dohner et al., *NEJM*, (2015) 373:1136). CD33 당단백질은 대다수의 골수모양 백혈병 세포뿐만 아니라 정상 골수모양 및 단핵구 전구체 상에서 발현되고, AML 요법에 대한 매력적인 표적인 것으로 간주되었다(Laszlo et al., *Blood Rev.* (2014) 28(4):143-53). 항 CD33 단클론성 항체-기반 요법을 이용하는 임상 시험은 표준 화학요법과 조합될 때 AML 환자 서브세트에서 개선된 생존을 나타냈지만, 이들 효과는 또한 안전성 및 효능 우려를 수반하였다.

[0539] AML 세포를 표적으로 하는 것을 목적으로 하는 다른 노력은 AML에서 CD33을 선택적으로 표적으로 하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키는 T 세포의 생성을 수반하였다. 문헌[Buckley et al., *Curr. Hematol. Malig. Rep.* (2015) 2:65]. 그러나, 데이터는 제한적이며, 이 접근이 환자를 치료하는 데 얼마나 효과적인지(모든 표적 세포가 제거되는지의 여부)에 관해 불확실성이 있다. 추가적으로, 골수모양 계통 세포가 생명에 필수불가결하기 때문에, 골수모양 계통 세포의 서브세트를 고갈시키는 것은 환자의 생존에 대해 해로운 효과를 가질 수 있었다. 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, AML 치료와 연관된 이러한 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

[0540] 대안적으로 또는 추가로, 본 명세서에 기재된 방법은 폐암; 귀, 코 및 인후암; 결장암; 흑색종; 췌장암; 전립선암; 유방암; 난소암; 기저세포 암종; 담도암; 방광암; 뼈암; 자궁경부암; 용모암; 결장 및 직장암; 결합조직암; 소화계통의 암; 자궁내막암; 식도암; 눈암; 두경부암; 위암; 상피내 신생물; 신장암; 후두암; 간암; 섬유종, 신경아세포종; 구강암(예를 들어, 입술, 혀, 구강 및 인두); 망막아세포종; 횡문근육종; 신세포암; 호흡계의 암; 육종; 피부암; 위암; 고환암; 갑상선암; 자궁암; 비뇨기 계통의 암뿐만 아니라 기타 암종 및 육종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 비조혈 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0541] 암종은 상피 유래의 암이다. 본 개시내용의 방법에 의한 치료가 의도되는 암종은 샘파리 세포 암종, 엽상 암종, 폐포 선암종(또한 샘낭암종, 샘근상피종, 사상형 암종 및 원주종으로도 불림), 샘암종, 선암종, 부신피질 암종, 폐포암, 폐포상피암(세기관지성 암종, 폐포 세포 종양 및 폐샘종증으로도 불림), 기저 세포 암종, 기저세포암종(기저세포암, 또는 기저세포종양 및 모상암으로도 불림), 기저세포모양 암종, 바다편평세포 암종, 유방 암종, 세기관지폐포암, 세기관지성 암종, 기관지유래 암종, 대뇌모양 암종, 담관세포암종(담관종 및 담관암종으로도 불림), 용모암종, 콜로이드질 암종, 면포암종, 자궁체부암종, 사상형 암종, 흉부 갑옷 암종, 피각 암종, 원통형 암종, 원주세포 암종, 관암종, 듀럼 암종, 배아 암종, 뇌양 암종, 안구상 암종, 표피모양암종, 상피 아데노이드 암종, 케양 암종, 섬유성 암종, 젤라틴모양 암종, 젤라틴양 암종, 거대세포암종, 거상세포, 샘암종, 과립막 세포암, 털바탕질 암종, 혈액모양 암종, 간세포 암종(간세포암, 악성 간세포암 및 간암종으로도 불림), 휘르틀레 세포 암종, 유리질 암종, 고신장형 암종, 유아 배아 암종, 제자리암종, 표피내모반 암종, 상피내 암종, 크롬페처 암종, 쿨치스키(Kulchitzky)-세포 암종, 렌티큘러 암종, 수정체양 암종, 지방종성 암종, 림프상피종 암종, 유방염 암종, 수질 암종, 속질 암종, 모반 암종, 멜라닌 암종, 점액성 암종, 비성암종, 점액세포암종, 점막표피모양암종, 점액질 암종, 점액 암종, 점액종, 비인두암종, 니그럼 암종, 귀리세포 암종, 골화성 암종, 유골암종, 난소암종, 유두상 암종, 간문맥 암종, 침습전 암종, 전립선 암종, 신장의 신세포 암종(신장의 선암종 및 신장형 암종으로도 불림), 예비세포 암종, 육종성 암종, 시나이더 암종, 경성암종, 음낭암종, 반지세포암종, 단순암, 소세포 암종, 슬라노이드 암종, 구형 세포 암종, 방추상 세포 암종, 해면체 암종, 편평 암종, 편평 세포 암종, 스트링 암종, 혈관확장 암종, 모세혈관확장상 암종, 이혜세포 암종, 결절 암종, 결절성 암종, 사마귀모양 암종, 용모상암종을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용의 방법은 유방, 자궁경부, 난소, 전립선, 폐, 결장 및 직장, 췌장, 위 또는 신장의 암을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용된다.

[0542] 육종은 뼈 및 연조직에서 생기는 중간엽 신생물이다. 상이한 유형의 육종이 인식되고, 이들은 하기를 포함한다: 지방육종(점액성 지방육종 및 다형성 지방육종을 포함), 평활근육종, 횡문근육종, 악성 말초신경집 종양(악성 신경초종, 신경섬유종증, 또는 신경성 육종으로도 불림), 유잉 종양(뼈의 유잉 육종, 연부조직(즉, 비-뼈) 유잉

육종, 및 원시 신경외배엽 종양[PNET]을 포함), 활액 육종, 맥관육종, 혈관육종, 림프관육종, 카포시 육종, 혈관내피종, 섬유육종, 테스모이드 종양(공격성 섬유종증으로도 불림), 용기피부섬유육종(DFSP), 악성 섬유 조직구종(MFH), 주피세포종, 악성 중간엽종, 포상 연부육종, 상피모양 육종, 투명세포 육종, 결합조직성 소세포 종양, 위장관 기질 종양 (GIST)(GI 기질 육종으로도 알려짐), 골육종(골원성 육종으로도 알려짐)-골격 및 연부조직 및 연골육종.

[0543] 일부 실시형태에서, 치료될 암은 난치성 암일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "난치성 암"은 처방된 표준 치료에 대해 내성이 있는 암이다. 이들 암은 초기에 치료에 반응성인 것으로 나타날 수 있거나(이후에 재발됨), 또는 이들은 치료에 완전히 비반응성일 수 있다. 보통의 표준 요법은 암 유형 및 대상체에서의 진행 정도에 따라 다를 것이다. 이는 화학요법, 또는 수술 또는 방사선, 또는 이들의 조합일 수 있다. 당업자는 이러한 표준 치료를 인식한다. 따라서 난치성 암에 대해 본 개시내용에 따라 치료 중인 대상체는 이미 이들의 암에 대한 다른 치료에 노출된 적이 있을 수 있다. 대안적으로, 암이 난치성일 가능성이 있다면(예를 들어, 암세포 분석 또는 대상체의 병력을 고려하여), 대상체는 다른 치료에 아직 노출된 적이 없을 수 있다. 난치성 암의 예는 백혈병, 흑색종, 콩팥세포암종, 결장암, 간(간장)암, 췌장암, 비호지킨 림프종 및 폐암을 포함하지만, 이들은 제한되지 않는다.

[0544] 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현시키는 임의의 면역 세포는 약제학적 조성물로서 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제 중 투여될 수 있다.

[0545] 본 개시내용의 조성물 및/또는 세포와 관련하여 사용될 때 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 생리적으로 용인 가능하고 포유류(예를 들어, 인간)에 투여될 때 뜻밖의 반응을 전형적으로 생성하지 않는 이러한 조성물의 분자 독립체 및 기타 성분을 지칭한다. 바람직하게는, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 포유류, 더 구체적으로는 인간에서 사용하기 위한 다른 일반적으로 인식되는 약전에 열거된 것을 의미한다. "허용 가능한"은 담체가 조성물의 활성 성분(예를 들어, 핵산, 백터, 세포 또는 치료적 항체)에 적합하고 조성물(들)이 투여된 대상체에 부정적으로 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 본 방법에서 사용될 임의의 약제학적 조성물 및/또는 세포는 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정제를 포함할 수 있다.

[0546] 완충제를 포함하는 약제학적으로 허용 가능한 담체는 당업계에 잘 공지되어 있으며, 인산염, 시트르산염 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제; 저분자량 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 아미노산; 소수성 중합체; 단당류; 이당류; 및 기타 탄수화물; 금속 착물; 및/또는 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover]을 참조한다.

[0547] **치료적 용도를 위한 키트**

[0548] 또한 세포-표면 계통-특이적 항원(들)에서 걸췌된 조혈 세포 집단과 병용하여 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적으로 하는 제제의 사용을 위한 키트가 본 개시내용의 범주 이내이다. 이러한 키트는 계통-특이적 세포-표면 항원(들)에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 임의의 제제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포) 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제1 약제학적 조성물, 및 하나 이상의 세포-표면 계통-특이적 항원(들)에서 걸췌된 조혈 세포 집단을 포함하는 임의의 제제(예를 들어, 조혈모세포) 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다.

[0549] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키트는 서열번호 1 내지 3의 서열을 갖는 gRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키트는 서열번호 4, 및 46 내지 47의 서열을 갖는 gRNA를 포함한다. 추가 실시형태에서, 키트는 서열번호 1 내지 4 및 46 내지 47 중 어느 것의 서열을 갖는 gRNA를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 DNA-변형 효소에 융합된 촉매적으로 손상된 Cas 단백질, 즉, 사이토신 또는 아데노신 데아미나제(염기 편집기)에 융합된 Cas9 틸대기효소를 포함하는, CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0550] 일부 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 포함된 지침은 대상체에서 의도된 활성을 달성하기 위한 제1 및 제2 약제학적 조성물의 투여의 설명을 포함할 수 있다. 키트는 대상체가 치료를 필요로 하는지의 여부에 기반하여 치료에 적합한 대상체를 선택하는 것의 설명을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지침은 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1 및 제2 약제학적 조성물을

투여하는 것의 설명을 포함한다.

[0551] 세포-표면 계통-특이적 항원을 표적으로 하는 체제 및 본 명세서에 기재된 제1 및 제2 약제학적 조성물의 사용에 관한 지침은 일반적으로 의도되는 치료를 위한 투약량, 투약 스케줄 및 투여 경로와 같은 정보를 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 패키지(예를 들어, 다회 용량 패키지) 또는 하위-단위 용량일 수 있다. 본 개시내용의 키트에서 공급된 지침은 전형적으로는 라벨 또는 패키지 삽입물 상에 기재된 지침이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 약제학적 조성물이 대상체에서의 질환 또는 장애를 치료하고/하거나 발병을 지연시키고/시키거나, 완화시킨다는 것을 나타낸다.

[0552] 본 명세서에 제공된 키트는 적합한 패키징에 있다. 적합한 패키징은 바이알, 보틀, 단지, 가요성 패키징 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 특정 장치, 예컨대, 흡입기, 비강 투여 장치 또는 주입 장치와 조합하여 사용하기 위한 패키지가 또한 상정된다. 키트는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백(bag) 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있다). 용기는 또한 멸균 접근 포트를 가질 수 있다. 약제학적 조성물 중 적어도 1종의 활성제는 본 명세서에 기재된 바와 같은 키메라 수용체 변이체이다.

[0553] 키트는 선택적으로 완충제 및 설명 정보와 같은 추가적인 성분을 제공할 수 있다. 정상적으로는, 키트는 용기, 및 용기 상에 또는 용기와 결합된 라벨 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 기재한 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0554] **일반적 기법**

[0555] 본 개시내용의 실행은, 달리 표시되지 않는 한, 당업자의 기술 이내인 분자 생물학(재조합 기법을 포함), 미생물, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기법을 사용할 것이다. 이러한 기법은 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed. 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practice approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»; Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986»; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986»; 및 B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.)]과 같은 문헌에서 완전하게 설명된다.

[0556] 추가적인 정교화 없이, 당업자는 상기 설명에 기반하여 본 개시내용을 가장 완전한 정도로 이용할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 다음의 구체적 실시형태는 단지 예시적인 것으로 해석되어야 하며, 어떠한 방식으로든 개시내용의 나머지를 제한하지 않는다. 본 명세서에 인용된 모든 간행물은 본 명세서에 언급된 목적 또는 대상을 참조로 하여 인용된다.

[0557] **실시예**

[0558] **실시예 1: 염기 편집기에 의한 HSC/HSPC의 효율적인 편집**

[0559] **물질 및 방법**

[0560] 인간 제대혈 CD34+ 줄기 세포를 1% 페니실린 스트렙토마이신, 및 다음의 인간 사이토카인 100ng/ml TPO, 100ng/ml SCF, 100ng/ml IL6 및 100ng/ml FLT3L 및 UM171 0.35nM(Xcessbio, 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재)을

함유하는 StemSpan SFEM II(STEMCELL Technologies Inc)에서 유지하였다. 모든 인간 사이토카인을 Biologend (미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재)로부터 구입하였다.

- [0561] ABE 단백질과 sgRNA를 P3 완충제(Lonza, Amaxa P3 Primary Cell 4D-Nucleofector 키트)에서 혼합하고, 10분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 PBS로 세척하고, P3 완충제에서 재현탁시키고, Cas9/sgRNA RNP 복합체와 혼합하고, 이어서, 4D-Nucleofector로 전기천공하였다. 전기천공법 후에, 분석 또는 주사까지 세포를 37°C에서 배양시켰다.
- [0562] ABE8e 단백질에 의한 HSC/HSPC 편집
- [0563] 1백만개의 HSC/HSPC를 Lonza 4D 뉴클레오펙터 및 프로그램 DZ100을 이용하여 11ugr ABE8e 단백질 +1.5ugr sgRNA(화학적으로 변형됨(서열번호 3))로 뉴클레오펙션시켰다.
- [0564] BE4max 단백질에 의한 HSC/HSPC 편집
- [0565] 500 000개의 HSC/HSPC를 Lonza 4D 뉴클레오펙터 및 프로그램 DZ100을 이용하여 8ugr BE4max 단백질 +1.5ugr sgRNA(화학적으로 변형됨(서열번호 1 또는 2))로 뉴클레오펙션시켰다.
- [0566] 전기천공법 후에, 분석까지 세포를 37°C에서 배양시켰다.
- [0567] 편집 결과 및 비표적 평가:
- [0568] CRISPResso2에 의한 HTS 분석
- [0569] 프로토스페이서 sgRNA 208 또는 sgRNA SA 주변의 350 bp 영역을 둘러싸는 프라이머를 설계하였다. 각각의 프라이머를 적절한 ILLUMINA 어댑터로 현수하였다. 이어서, 250 내지 300bp 단일-단부 Illumina 서열분석을 생성하기 위해 ILLUMINA 정방향 및 역방향 지표 프라이머를 이용하여 생성된 PCR 산물을 재증폭시켰다. 이어서, CRISPResso2를 사용하여 참조 앰플리콘에 대한 각 판독을 정렬시키고, 프로토스페이서를 둘러싸는 창에서 해당 참조에 대한 삽입결실 또는 염기 변화를 확인하였다. 이들을 소프트웨어에 의해 정량화한다. 문헌[Clement et al. *Nature Biotechnology* (2019) 37:224-26; Huang et al. *Nature Protocols* (2021) 16(2): 1089-1128]을 참조한다.
- [0570] PCR
- [0571] cDNA EcoDry 믹스(Takara)에 대한 RNA를 이용하여 세포로부터의 100ng의 총 RNA에서 cDNA를 제조하였다. CD33^Δ 2(엑손 접합부 1 내지 3에 걸쳐 있음), CD33^{FL}(엑손 접합부 2 내지 3 또는 엑손 2에 걸쳐 있음), 또는 (엑손 1, 5 및 7에서) 모든 아이소폼에 공통에 특이적인 프라이머를 이용하여 30주기의 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 분리시켰고, Sanger 서열분석에 의해 분석하였다.
- [0572] 유세포분석
- [0573] 엑손 2에 위치한 에피토프를 인식하는 다음의 항-CD33 항체 클론, M53 및 P67.6을 이용하여 전기천공법 7일 후에 인간 CD34⁺ 줄기 세포를 분석하였다.
- [0574] 통계학
- [0575] Graphpad Prism 9.1.1을 이용하여 모든 통계학을 수행하였다. 연속 변수의 경우, 독립표본 양측 t-검정을 수행하였다. p 값이 0.05 미만일 때 평균 간의 차이를 유의미한 것으로 간주하였고, 그 외에는 유의미하지 않았다 (ns; p>0.05).
- [0576] 결과
- [0577] BE 또는 ABE 염기 편집기를 이용하여 엑손 2 스킵을 유도하도록 3개의 sgRNA를 설계하였다(도 4). CD33 mRNA 전장(CD33^{FL})은 7 엑손을 포함하고, 엑손 2는 Ig-유사 V-형 도메인을 암호화한다. CD33^{Δ2}는 변경된 엑손 스플라이싱 인핸서(ESE) 부위를 초래하는 C>T를 변화시키는 공통 다형성(rs12459419, A14VSNP))으로 인해 엑손 2를 건너한다.
- [0578] mRNA 및 리보핵단백질(RNP) 기반 전달 시스템을 시험하여 1차 세포에서의 효율을 확인하였다. CD34세포를 이들 gRNA 및 염기 편집기(BE) 또는 아데닌 염기 편집기(ABE) 단백질 각각으로 전기천공시켰다. 구체적으로, CD34 세포를 ABE8e 및 서열번호 3을 갖는 sgRNA 또는 BE4max 및 서열번호 1을 갖는 sgRNA, 또는 BE4max 및 서열번호 2

를 갖는 sgRNA로 전기천공하였다(표 4).

- [0579] Sanger 서열분석에 의해 나타나는 바와 같이, BE 및 ABE는 표적화된 뉴클레오타이드에서 C>T 또는 A>G 전환 중 하나를 도입하였다(도 5A).
- [0580] 또한 PCR 및 Illumina MiSeq를 이용하여 편집 세포를 분석하였다. 이들 결과는 각각의 표적화된 염기가 의도된 돌연변이를 획득하였다는 것을 나타냈다. 서열번호 3 및 ABE8e에 의해 편집된 세포는 4% 야생형 판독만을 나타냈다. 서열번호 1 또는 2 및 BE4max에 의해 편집된 세포는 약 9 내지 12%의 야생형 판독을 나타냈다(도 5B). CD33의 엑손 2에 위치한 에피토프를 인식하는 두 항체에 의한 편집 세포의 유세포 분석으로 편집 세포에서 CD33 엑손 2의 부재를 확인했다(도 5C).
- [0581] CD33^{Δ2}(엑손 접합부 1 내지 3에 걸쳐 있음), CD33FL(엑손 접합부 2 내지 3 또는 엑손 2에 걸쳐 있음) 또는 모든 아이소폼에 공통(엑손 3에서, 엑손 접합부 3 내지 5 또는 4 내지 5에 걸쳐 있음)에 특이적인 프라이머로 cDNA 및 PCR을 이용하여 편집 결과에 대해 편집 세포를 추가로 분석하였다. 결과는 엑손 2 스킵의 편집이 다른 엑손에 영향을 미치는 일 없이 ESE 또는 SA를 유도했다는 것을 나타냈다(도 5D).
- [0582] **실시예 2: CD33^{Δ2} 세포는 정상적인 식세포 능력을 나타내고, 시험관내 GO에 내성이 있다**
- [0583] 실시예 1에 기재된 바와 같은 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포를 추가로 분석하였다.
- [0584] **식세포작용**
- [0585] 시험관내 분화된 CD34⁺CD33^{WT} 및 CD33^{Δ2} 단핵구가 시험관내 이콜라이 생물입자를 식세포작용하는 능력을 시험하였다. 시험관내 분화된 WT 또는 CD33^{Δ2} 단핵구가, 이콜라이 생물입자 내재화에 의해 측정하는 바와 같이, 비슷한 식세포작용 능력을 나타낸다. 도 6A를 참조한다.
- [0586] **GO 세포독성**
- [0587] 추가적으로, CD34⁺CD33^{Δ2}는 시험관내 GO 세포독성에 내성이 있었다. 세포를 48시간 동안 GO와 함께 인큐베이션 시키고, 생존도 염료로서 Sytox Blue 또는 7AAD를 이용하여 FACS에 의해 분석했다. CD34⁺CD33^{Δ2}는 동형 접합적 rs12459419(TT) A14V SNP를 갖는 공여자보다는 GO 세포독성에 대해 동일한 내성을 나타낸다(도 6B).
- [0588] **실시예 3: CD34+CD33 Δ2는 장기간 다중계통을 생착시킬 수 있고, 생체내 CD33-표적화된 면역요법(GO)에 내성이 있다**
- [0589] **물질 및 방법**
- [0590] **생체내 실험**
- [0591] 본 접근은 CAR-T 표적화 CD33 항원 및 ADC 전달(GO)에 대한 플랫폼으로서 CD33 유전자-편집 줄기 세포(CD34⁺CD33^{Δ2})의 이식을 수반할 수 있기 때문에, CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 생착하고 골수발생 및 림프생성에 기여하는 능력을 시험하는 것은 중요하다.
- [0592] NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG) 또는 NOD.Cg-Prkdc^{scid} I12rg^{tm1Wjl} Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)IEav/M1oySzJ(NSG-SGM3) 마우스(The Jackson Laboratory, 미국 메인주 바하버 소재)를 준치사(sublethal)(100 cGy) 전신 방사선 조사(total-body irradiation: TBI)로 조건화시켰다. CD34+WT 또는 CD34⁺CD33^{Δ2} HSPC(실시예 1에 기재된 바와 같이 ABE8e 및 서열번호 3을 이용하여 세포를 편집함)를 꼬리 정맥 주사를 통해 준치사 방사선 조사된 마우스에 주사하였다.
- [0593] 시간에 다른 조혈 계통의 생착 및 재증식(도 7A)을 Biolegend(미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재) 또는 BD Biosciences(미국 캘리포니아주 새너제이 소재)로부터의 결과로 생긴 항체; Ter119-PeCy5, Ly5-BV711, H2kd-BV711, hCD45-BV510, hCD3-Pacific Blue, hCD123-BV605, hCD33-APC, hCD14-APC/Cy7, hCD10-BUV395, hCD19-BV650, CD34-BV421, CD90-PeCy7, hCD38-BUV661 및 hCD45RA-BUV737을 이용하여 말초 혈액(PB), 비장, 및 전체 골수(BM)의 분석에 의해 평가했다. 프로피듐 요오드화물(Propidium Iodide)을 이용하여 사멸 세포를 제외하였다. CD34⁺ 주사 유도된 인간 세포를 Ter119-, Ly5-/H2kd- 인간 CD45+ 상에서 게이팅하였다.

- [0594] CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 생체내 GO에 내성이 있다는 것을 나타내기 위해, 이식 후 12주 마우스의 PB를 CD33⁺CD14⁺ 세포 또는 CD33^{Δ2}CD14⁺ 세포의 존재에 대해 분석하였다. 이어서, 마우스에 2.5ugr GO를 주사하고, 채혈하고 나서, 자루에 넣어서, 처리 1주 후에 인간화된 마우스의 PB 및 골수에서 골수성 세포의 존재를 평가하였다. GO 처리 전에, CD34⁺WT 또는 CD34⁺CD33^{Δ2} 이식 마우스는 PB에서 CD14⁺ 세포의 동일한 빈도를 나타냈다(도 7D, 상단 FACS 플롯). GO 주사 1주 후에, CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 생체내 마우스의 PB 및 BM에서 CD33⁻CD14⁺ 세포가 검출되었지만, CD33⁺ 및 CD14⁺ 세포는 CD34⁺WT 생체내 마우스의 PB 및 BM에서 사라졌다.
- [0595] 이식 16주 후에, 마우스의 골수로부터의 게놈 DNA로부터 CD33 좌위를 증폭시켰다. HTS에 의해 앰플리콘을 서열 분석하고, A7 위치에서 A에서 G로의 편집을 정량화하였다.
- [0596] 컬럼비아 대학교 실험동물윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee of Columbia University)에 의해 승인된 프로토콜 하에서 모든 실험을 수행하였다.
- [0597] **결과**
- [0598] 이식 16주 후에 골수와 비장은 둘 다 인간 CD45 내에서 인간 CD45+ 세포 및 선조세포 골수모양(CD123) 및 림프모양(CD10)뿐만 아니라 성숙 골수모양(CD14) 및 림프모양(CD19) 및 T 세포(CD3)의 존재를 나타냈다(도 7B). 모든 세포는 CD33-음성으로 남아있었다(도 7A).
- [0599] CD33-CD14+는 GO 처리 후 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포가 생체내 마우스의 말초 혈액 및 골수에서 검출되었지만, CD33+ 세포는 검출 가능하지 않아서, CD14⁺CD34^{WT} 생체내 마우스의 근절을 야기한다. 따라서, CD33^{WT} 세포는 GO에 민감하게 남아있지만, CD34⁺CD33^{Δ2} 세포는 민감하지 않았다. 도 7B 및 도 7C.
- [0600] 생체내 WT(비편집) 또는 편집 세포에서의 표적 부위(A7)에서 표적 상 편집을 이식 후 16주에 골수 샘플로부터 분석하였다. 이식 16주 후에, 마우스의 골수로부터의 게놈 DNA로부터 CD33 좌위를 증폭시켰다. 도 7D.
- [0601] **실시예 4: 비표적 평가**
- [0602] **물질 및 방법**
- [0603] **CIRCLEseq**
- [0604] 염기 편집 비표적 부위를 확인하기 위해, QIAGEN Gentra PureGene 키트(카탈로그 번호 158445)를 이용하여 개인 정보가 제거된 인간 공여자로부터의 CD34+ 풍부 세포 집단으로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 앞서 기재한 바와 같이 CIRCLE-seq를 수행하였다(Tsai et al, *Nature Methods* (2017) 14:607-14). 간략히 말해서, 정제된 게놈 DNA를 Covaris S2 기기를 이용하여 평균 길이 300bp로 전단하였다. 단편화된 DNA의 말단을 수선하고, A-테일링 하고 나서, KAPA HTP 라이브러리 제조 키트인 PCR Free(KAPA Biosystems)를 이용하여 유라실-함유 줄기-루프 어댑터에 결합시켰다. 어댑터 결합된 DNA를 람다 엑소뉴클레아제(NEB) 및 이콜라이 엑소뉴클레아제 I(NEB)로 처리하고, 이어서, USER 효소(NEB) 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제(NEB)로 처리하였다. T4 DNA 결합효소(NEB)를 이용하여 DNA의 분자내 순환을 수행하고, 잔여 선형 DNA를 Plasmid-Safe ATP-의존적 DNase(Lucigen)에 의해 분해하였다. 250ng의 Plasmid-Safe-처리 순환 DNA, 90nM의 Cas9 뉴클레아제(NEB), Cas9 뉴클레아제 완충제(NEB) 및 90nM의 합성 화학적으로 변형된 sgRNA(Synthego)를 이용하여 100μl 용적으로 시험관내 절단 반응을 수행하였다. 절단된 산물은 A-테일링되고, 헤어핀 어댑터(NEB)로 결합하고, USER 효소(NEB)로 처리하고 나서, Kapa HiFi 증합효소(KAPA Biosystems)를 이용하여, 바코드 부착된 보편적 프라이머인 Illumina의 NEBNext Multiplex Oligos(NEB)에 의한 PCR로 증폭시켰다. Illumina MiSeq 기기 상의 150 bp 짝지어진 말단 판독을 이용하여 라이브러리를 서열분석하였다. 디폴트 파라미터를 이용하여 오픈 소스 CIRCLE-seq 분석 소프트웨어(<https://github.com/tsailabSJ/circleseq>)를 이용하여 CIRCLE-seq 데이터 분석을 수행하였다. 정렬을 위해 인간 게놈 GRCh37을 사용하였다.
- [0605] 비표적 편집을 평가하기 위해, 이식 16주 후에 골수로부터의 생체내 인간 WT(비편집 세포) 또는 편집 세포에서 CIRCLE-seq에 의해 지명된 19개의 상위 비-표적 부위를 서열분석하였다.
- [0606] 각각의 비표적 부위에 대해, 가이드 RNA에 대한 정렬된 비표적 결합 부위 및 Illumina 서열분석을 위한 현수된 어댑터를 포함하는 250 내지 300bp 산물을 생성하도록 프라이머를 설계하였다. 각 샘플에 바코드를 부착하기 위해 2차 PCR 후에, 산물을 풀링하고, 300 주기 v2 Illumina MiSeq 키트를 이용하여 서열분석하였다. HTS에 의해

앰플리콘을 서열분석하고, A7 위치에서 A에서-G로의 편집을 정량화하였다.

[0607] 얻어진 fastq 파일에서 편집 결과를 분석하기 위해, 참조 앰플리콘에 대한 각 판독을 정렬하고 삽입결실 또는 염기 변화를 정량화하기 위해 CRISPResso2를 사용하였다.

[0608] 실시예 1에 기재한 바와 같이 ABE8e 및 서열번호 3을 이용하여 편집한 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포를 추가로 분석하였다.

[0609] **결과**

[0610] CIRCLE-seq를 이용하여, 19개의 상위 비표적 좌위를 확인하였다. 도 8A.

[0611] 상기 기재한 바와 같이, 인간 WT(비편집) 또는 편집 세포를 생착시킴에 있어서 19개의 확인된 상위 비표적 좌위에서 A7 표적화된 뉴클레오타이드에서의 A7 위치 편집에서 A에서 G로의 편집을 평가하기 위해 서열분석을 수행하였다. 도 8B에 나타낸 바와 같이, 대부분의 표적에 대해, A7 편집은 WT 및 편집 세포에서와 비슷하였다.

[0612] 도 8C에 나타낸 바와 같이, 표적에 대한 삽입결실 백분율은 또한 WT와 편집 세포 둘 다에 대해 유사하였다.

[0613] **실시예 5: 다중복합 염기 편집**

[0614] 2개의 sgRNA를 설계하였다. 하나는 ABE 편집기(서열번호 3)를 이용하여 CD33에서 엑손 스킵을 유도하기 위한 것이다. 두 번째는 ABE 편집기(서열번호 4)를 이용하여 EMR2에서 엑손 13의 스킵을 유도하기 위한 것이다. 도 4A 및 도 9A.

[0615] 5ugr AB8e +1.5ugr sgRNA(화학적으로 변형)를 이용하여 2개의 RNP(하나는 각각의 표적화된 유전자에 대한 것임)를 별개로 제조하였다. 인큐베이션 후에, RNP를 500,000개의 HSC/HSPC와 공동 혼합하고, Lonza 4D 뉴클레오펙터 및 프로그램 DZ100을 이용하여 뉴클레오펙션시켰다.

[0616] 뉴클레오타이드 전환의 도입을 위해 편집 세포를 분석하였다. Sanger 서열분석에 의해 나타낸 바와 같이, ABE 염기 편집기는 좌위 둘 다에서 A>G 전환을 도입하였고, 이에 의해 CD33 좌위에서 SA 및 EMR2 좌위에서 SD를 편집하였다(도 9B). 편집 세포의 유세포분석은 편집이 편집 세포에서 CD33 및 EMR2 항체 결합을 제거한다는 것을 확인하였다(도 9C).

[0617] **실시예 6: 급성 골수성 백혈병(AML)에서 세포-표면 계통-특이적 CD33의 표적화**

[0618] 본 실시예는 AML에서 CD33 항원의 표적화를 포괄한다. 실시예의 구체적 단계를 표 5에 약술한다.

표 5

실험 설계의 개요

- I. 자가 CD33 표적 (CAR) T-세포 요법
 - 1. 항-CD33 CAR 작제물의 생성
 - 2. 환자로부터의 CD8⁺T 세포의 단리
 - 3. 항 CD33 CAR T 세포의 제조
 - 4. 환자에 CD33 CAR T 세포의 재주입
- II. CD34⁺CD33^{Δ2} 세포를 이용하는 자가 조혈모세포 이식
 - 1. 조혈모세포의 단리
 - 2. CD33을 표적으로 하는 CRISPR 염기 편집 플라스미드
 - 3. CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 통한 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포의 생성
 - 4. 환자에 CD34⁺CD33^{Δ2} 세포의 재주입

III. 독소(면역독소)에 CD33 항체가 부착된 환자의 지속 치료

[0619]

[0620] I. CD33-표적화된 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포 요법

[0621] A. 항-CD33 CAR 작제물의 생성

[0622] 본 명세서에 기재된 CD33을 표적으로 하는 키메라 항원 수용체는 5'에서 3' 순서로 다음의 성분으로 이루어질 수 있다: pHIV-Zsgreen 렌티바이러스 골격 (www.addgene.org/18121/), 펩타이드 신호, CD33 scFv, 힌지, CD28 분자의 막관통 영역, CD28의 세포내 도메인 및 TCR- ζ 분자의 신호전달 도메인.

[0623] 처음에, 펩타이드 신호, 항-CD33 경쇄(서열번호 8), 가요성 링커 및 항-CD33 중쇄(서열번호 6)를 최적의 Kozak 서열을 갖는 pHIV-Zsgreen의 EcoRI 부위에 클로닝한다.

[0624] 경쇄-링커-중쇄-힌지-CD28/ICOS-CD3 ζ 의 기본 구조를 갖는 CD33에 결합하는 예시적인 키메라 수용체의 핵산 서열을 아래에 제공한다.

[0625] 부분 1: 경쇄-링커-중쇄(서열번호 33): Kozak 개시 부위를 볼드체로 나타낸다. 펩타이드 신호 L1을 이탤릭체로 나타낸다. 항-CD33 경쇄 및 중쇄를 볼드체 및 이탤릭체로 나타내고, 링커로 분리한다.

```

gggtcgtgagcggccgctgaactgGCCACCAATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGGG
GCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGTGAGATCGTGCTGACCCAGAGC
CCCGGCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCAAGAGGGTGACCATGAGCTGCAAGAG
CAGCCAGAGCGTGTTCCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCA
GCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGG
AGAGCGGGCTGCCGACAGGTTACCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAC
TTCACCCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGC
CACCAGTACCTGAGCAGCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAA
GAGGGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCAGCGGCGAGGGCAGCAC
CAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCCGCGAGGTGGTGAAGCCCCGGC
GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTAC
ATCCACTGGATCAAGCAGACCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGAT
CTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAAGTTCAGGGCAAGGCCAC
CCTGACCGCCGACAAGAGCAGCACCACCGCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGA
CCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTAC
TTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCGTGACCGTGAGCAGC
    
```

[0626] .

[0627] 부분 2: 힌지-CD28/ICOS -CD3 ζ NotI 제한 효소 인식 부위를 대문자로 나타낸다. 번역 중단 부위는 볼드체이다. BamHI 제한 절단 부위를 밑줄로 나타낸다.

[0628] CD28 공자극 도메인(서열번호 34)

```

GCGGCCGCAAattgaagttatgtatcctcctctactagacaatgagaagagcaatgaaccattatccatgtgaaggga
aacacctftgccaagtccectatttcccggaacttctaagcccttttgggtgctggtggtggtggtgagtcctgctctatagct
tgctagtaacagtggccttattttctgggtgaggagtaagaggcaggctcctgcacagtactacatgaacatgactcccc
gcccggggggcccAcccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgagcctatcgctccagagtgaagttc
agcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggag
facgatgttttgacaagagacgtggccgggacccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaagccctgt
acaatgaactgcagaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaagggcagcgcgggaggggcaaggggc
acgatggcctttaccagggctcagtacagccaccaaggacacctacagcccttcacatgcagggcctgccccctgcTAA
cgccccctctcctccccccccctaa
    
```

[0629] .

[0630] ICOS 공자극 도메인(서열번호 35)

GCGGCCGCActatcaatTTTTgatcctcctcctTTTaaagtaactcttacagggatattgcatattatgaatcacaactTTgtt
 gccagctgaagTctgtttaccataggatgtgcagccttTgttagctgcattTgggatgcatactattTgttgcttacaaaaa
 gaagtattcatccagtgtgcacgacctaacggtgaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaatctagactcacag
 atgtgacctaaagTgaagTtcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagcaggccagaccagctctataacgagctc
 aatctaggacgaagagagggagTactgatTttggacaagagacTggccgggacctgagatgggggaaagccgagaagg
 aagaacctcaggaaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcggaggcttacagTgagattgggatgaaaggcga
 gcgcccggaggggcaaggggcagcatggcctTtaccagggTctcagTtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgc
 agggcctgccccctgcTAAcgccccctcctccccccccctaa

[0631]

[0632] 융합(혼성체) CD28 및 ICOS 공자극 도메인(서열번호 36)

GCGGCCGCAattgaagTtatgtatcctcctctacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaaggga
 aacacctTgtccaagTcccctattTcccggaccttctaagcccctTttggTgctgtgtgtgtgtgtgTgagTcctggcttctatagct
 TgctagtaacagTggcctTtattTttctggTgaggagtaagagagcaggctcctgcacagTgactacatgttcatgagagcagt
 gaacacagccaaaaatctagactcacagatgtgacctaaagTgaagTtcagcaggagcgcagacgcccccgctaccagc
 agggccagaaccagctctataacgagctcaatctagacgaagagaggagTactgatTttggacaagagacTggccgggac
 cctgagatgggggaaagccgagaaggagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaagataagatggcggag
 gcctacagTgagattggatgaaaggcagcgcgggagggcaaggggcagcatggcctTtaccagggTctcagTtacagcca
 ccaaggacacctacgacgcccctcacatgcagggcctgccccctgcTAAcgccccctcctccccccccctaa

[0633]

[0634] 다음 단계에서, TCR- ζ 의 힌지 영역, CD28 도메인(서열번호 15) 및 세포질 성분을 pHIV-Zsgreen의 NotI 및 BamHI 부위에 클로닝한다(이미 랩타이드 신호 및 CD33 scFv를 함유함). 대안적으로, CD28 도메인을 ICOS 도메인(서열번호 16)으로 치환할 수 있다.

[0635] CD28 및 ICOS 도메인에 추가로, CD28 및 ICOS 세포내 신호전달 도메인의 단편을 포함하는 융합 도메인을 조작하고(서열번호 17) 추가적인 키메라 수용체를 생성하기 위해 사용하였다. 키메라 수용체가 항원-결합 단편을 포함하는 이러한 입체배치, 항-CD33 경쇄 가변 영역, 링커, 항-CD33 중쇄 가변 영역, CD28/ICOS 혼성체 영역(CD28의 TM 영역을 포함) 및 TCR- ζ 분자의 신호전달 도메인.

[0636] 키메라 수용체를 생성하기 위해 사용될 수 있는 성분의 예시적인 아미노산 서열을 본 명세서에 제공하고, 예컨대, CD28 도메인(서열번호 10), ICOS 도메인(서열번호 11), CD28/ICOS 혼성체 도메인(서열번호 13) 및 TCR- ζ 를 본 명세서에 제공한다. 대안적으로, 키메라 수용체를 마찬가지로 생성할 수 있다(부문 B.)

[0637] **B. 항-CD33 CAR 작제물의 생성을 위한 대안의 방법**

[0638] 예시적 키메라 수용체의 개략도를 도 10, 패널 A 내지 D에 제시한다. 세포의 CD8 힌지 영역, 막관통 및 세포질 신호전달 도메인에 연결된 CD33 항원을 인식하는 세포의 인간화 scFv, 및 CD3 ζ -신호전달 쇄를 이용하여 키메라 수용체를 생성할 것이다(도 10, 패널 B). 인간화된 scFv를 이용함으로써 항-CD33 키메라 수용체를 암호화하는 DNA를 생성할 것이다(Essand et al., *J Intern Med.* (2013) 273(2):166). 대안은 CD28 또는 CD28/OX1 또는 CD28/4-1-B-B 혼성체 대신에 OX-1 또는 41-BB를 함유하는 CAR T 세포를 포함한다(도 10, 패널 C 및 D).

[0639] 항-CD33 scFv 서열을 생성하기 위해, 위에 기재한 항-CD33 항체의 가변 영역의 중쇄 및 경쇄의 암호화 영역(서열번호 6 및 8)을 특정 프라이머로 증폭시키고, 세포에서 발현을 위해 pHIV-Zsgreen 벡터에 클로닝시켰다. 표적 항원에 대한 scFv(단일쇄 가변 단편)의 결합 강도를 평가하기 위해, scFv를 Hek293T 세포에서 발현시킨다. 이런 목적을 위해, 벡터(암호화 영역을 포함하는 pHIV-Zsgreen)를 이콜라이 Top10F 박테리아 및 준비한 플라스미드에 형질전환시킨다. Hek293T 세포에 형질감염에 의해 scFv 항체를 암호화하는 얻어진 발현 벡터를 도입한다. 5일 동안 형질감염 세포를 배양시킨 후에, 상청액을 제거하고, 항체를 정제한다.

[0640] 당업계에서 공지된 프로토콜에 의한 프레임워크 치환을 이용하여 얻어진 항체를 인간화할 수 있다. 예를 들어, 주형 항체로부터 유래된 단편 라이브러리를 암호화하는 합성 CDR이 기능적으로 발현된 항체로부터의 생식계열 서열로 제한된 인간 프레임워크 풀로부터의 단편을 암호화하는 인간 프레임워크 영역에 결합된 경우에 한 가지 이

러한 프로토콜이 BioAtla(샌디에이고 소재)에 의해 제공된다는 것을 참조한다 (bioatla.com/applications/express-humanization/).

[0641] 항원 결합 친화도를 개선시키기 위해 친화도 성숙을 수행할 수 있다. 당업계에서 공지된 일반적 기법, 예컨대, 파지 디스플레이를 이용하여 이를 수행할 수 있다(Schier R., *J. Mol. Biol.* (1996), 263:551). 예를 들어 Biacore 분석을 이용하여, 변이체를 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화도)에 대해 선별할 수 있다. 변형을 위한 양호한 후보인 초가변 영역 잔기를 확인하기 위해, 알려진 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의미하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 추가적으로, 항체의 친화도를 개선시키기 위해 기재된 조합 라이브러리를 또한 사용할 수 있다(Rajpal et al., *PNAS* (2005) 102(24): 8466). 대안적으로, BioAtla는 항체의 빠르고 효율적인 친화도 성숙을 위한 플랫폼을 개발하였고, 이는 또한 항체 최적화 목적을 위해 이용할 수 있다(bioatla.com/applications/functional-maturation/).

[0642] **C. CAR 작제물의 조립체**

[0643] 다음에, 항-CD33 scFv는 세포의 CD8 힌지 영역, 막관통 및 세포질 CD28 신호전달 도메인 및 CD3 ζ -신호전달 쇠에 연결된다. 간략히 말해서, 항-CD33 scFv 서열에 특이적인 프라이머를 상기 기재한 바와 같이 scFv를 증폭시키는 데 사용한다. 완전 인간 CD8 암호화 서열을 지니는 플라스미드(pUN1-CD8). (www.invivogen.com/puno-cd8a)를 사용하여 CD8 힌지 및 막관통 도메인(아미노산 135 내지 205)을 증폭시킬 것이다. 완전한 인간 CD3 ζ 암호화 서열을 지니는 Invivogen 플라스미드 pORF9-hCD247a (http://www.invivogen.com/PDF/pORF9-hCD247a_10E26v06.pdf)로부터 CD3 ζ 단편을 증폭시킨다. 최종적으로, Trizol 방법에 의해 활성화된 T 세포로부터 수집한 RNA를 이용하여 생성된 cDNA로부터 CD28(CD28의 TM 및 신호전달 도메인에 대응하는 아미노산 153 내지 220)을 증폭시킨다. 스플라이스 중복 연장(SOE) PCR을 이용하여 항-CD33-scFv-CD8-힌지+TM-CD28-CD3 ζ 를 함유하는 단편을 조립한다. 얻어진 PCR 단편을 pELPS 렌티바이러스 벡터에 클로닝시킨다. pELPS는 제3 세대 렌티바이러스 벡터 pRRL-SIN-CMV-eGFP-WPRE의 유도체이며, 이때 CMV 프로모터를 EF-1 α 프로모터로 대체하고, HIV의 중심 폴리펩틴관을 프로모터의 5'에 삽입하였다(Milone et al., *Mol Ther.* (2009) (8): 1453, Porter et al., *NEJM* (2011) (8):725). 모든 작제물을 서열분석에 의해 입증한다.

[0644] 대안적으로, CD28 도메인 대신에 ICOS, CD27, 41BB 또는 OX-40 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 생성하고, T-세포에 도입하고 나서, CD33 양성 세포를 근절시키는 능력에 대해 시험할 것이다(도 10, 패널 C). "제3 세대" 키메라 수용체의 생성을 또한 고려하며(도 10, 패널 D), 이는 다중 신호전달 도메인, 예컨대, CD3 ζ -CD28-41BB 또는 CD3 ζ -CD28-OX40을 조합하여, 효력을 추가로 증가시킨다(Sadelain et al., *Cancer Discov.*(2013) 4:388).

[0645] **D. 항-CD33 CAR T 세포 제조**

[0646] 면역자기 분리(Miltenyi Biotec)에 의해 환자의 말초 혈액으로부터 1차 인간 CD8⁺ T 세포를 분리시킨다. T 세포를 완전 배지(10% 열 비활성화된 FBS, 100U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신 황산염, 10mM HEPES로 보충한 RPMI 1640)에서 배양시키고, 앞서 기재한 바와 같이 항-CD3 및 항-CD28 mAb-코팅 비드(Invitrogen)로 자극하였다(Levine et al., *J. Immunol.* (1997) 159(12):5921).

[0647] 표적 세포를 형질도입하고 항-CD33 키메라 수용체를 포함할 수 있는 바이러스 벡터를 생성하기 위해 패키징 세포주를 사용한다. 렌티바이러스 입자를 생성하기 위해, 본 실시예의 부분 (1)에서 생성된 CAR을 불멸 정상 태아 신장 293T 패키징 세포에 형질감염시킨다. 10% FBS, 100U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함하는 고글루코스 DMEM과 함께 세포를 배양시킨다. 형질감염 후 48 내지 72시간에, 상청액을 수집하고, FBS 없이 DMEM에서 재조합 렌티바이러스를 농축시켰다. 다음에, 폴리브렌의 존재 하에 대략 5 내지 10의 감염 다중도(MOI)에서 1차 CD8⁺ T 세포를 형질도입한다. 인간 재조합 IL-2(R&D Systems)를 격일로 첨가한다(50 IU/ml). 자극 후 대략 14일 동안 T 세포를 배양시킨다. ZsGreen 리porter 유전자(Clontech, 캘리포니아주 마운틴뷰 소재)의 발현에 의해 인간 1차 T 세포의 형질도입 효율을 평가한다.

[0648] **E. 환자에 CAR T 세포의 주입**

[0649] 환자에 항-CD33 CAR T 세포의 *i.v.* 주입 전에, 세포를 인산염 완충 식염수로 세척하고, 농축시킨다. 제형화 전에 세척 및 농축 단계를 위해, 밀폐 및 멸균된 시스템을 제공하는 Haemonetics CellSaver(Haemonetics Corporation, 매사추세츠주 브레인트리 소재)와 같은 세포 처리기를 사용한다. 인간 혈청 알부민을 보충한 100 ml의 멸균 정상 식염수로 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키는 최종 T 세포를 제형화할 것이다. 최종적으로, 환자에 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 1 내지 10 \times 10⁷개의 T 세포/kg를 주입한다(Maude et al., *NEJM* (2014)

371(16):1507). 주입한 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키는 T 세포의 수는 암 환자의 상태, 환자의 연령, 사전 치료 등과 같은 수많은 인자에 따라 다를 것이다.

[0650] 더 나아가, 또한 AML 환자에서 CD33을 표적으로 하는 키메라 수용체에 추가로 EMR2를 표적으로 하는 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포가 본 명세서에 상정된다. 이는 두 상이한 접근에 의해 달성될 수 있다: 1) 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포 및 항-EMR2 키메라 수용체를 발현시키는 면역 세포를 별개로 생성하고, 면역 세포 유형을 둘 다 갖는 환자에 별개로 주입하는 것; 또는 2) CD33과 EMR2를 둘 다 동시에 표적으로 하는 면역 세포를 생성하는 것(Kakarla et al., *Cancer* (2014) 2:151).

[0651] **II. CD34⁺CD33^{Δ2} 세포를 이용하는 자가 조혈모세포 이식(HSCT)**

[0652] 환자로부터의 줄기 세포 분리, 조건화 요법뿐만 아니라 줄기 세포의 환자 주입에 관한 프로토콜은 환자의 연령, 병태, 치료 이력 및 치료가 수행된 시설에 따라 크게 다르다는 것이 이해된다. 따라서, 아래에 기재하는 프로토콜은 단지 예시적이며, 당업자는 일상적인 최적화를 실시한다.

[0653] **A. 항-CD33 CAR T 세포의 입양 전달 후 말초 혈액 줄기 세포(PBSC) 동원을 이용하는 조혈모세포의 분리**

[0654] 1일당 과립구 집락-자극 인자(G-CSF) 10mg/kg의 i.v. 투여에 의해 AML 환자를 자극할 것이다. 면역자기 비드 및 면역자기 풍부화 장치를 이용하여 CD34⁺ 세포 양성 선별을 수행할 것이다. Fenwall CS 3000+ 세포 분리기를 이용하여 최소 2×10⁶개의 CD34⁺ 세포/체중(kg)이 수집될 것으로 예상된다(Park et al., *Bone Marrow Transplantation* (2003) 32:889).

[0655] **B. 환자의 조건화 요법**

[0656] 에토포사이드(VP-16) + 사이클로포스파마이드(CY) + 전신방사선조사(TBI)를 이용하여 자가 말초 혈액 줄기 세포 이식물(PBSCT)에 대한 조건화 요법을 수행할 것이다. 간략히 말해서, 요법은 단일 용량으로서 26시간에 걸쳐 1.8g/m²의 에토포사이드(VP-16)로 i.v. 지속적 주입(c.i.v.) 다음에, 3일 동안 2시간에 걸쳐 i.v.로 1일당 60 mg/kg의 사이클로포스파마이드(CY) 다음에 다음 3일 동안 1일당 300 cGy로 전신방사선조사(TBI)로 이루어질 것이다.

[0657] 용량을 계산하기 위해, 이상적인 체중 또는 실제 체중 중에 어느 쪽이든 적은 것을 사용할 것이다. 앞서 언급한 바와 같이, 정확한 조건화 요법을 결정할 때 암 환자의 상태, 환자의 연령, 사전 치료뿐만 아니라 절차를 수행한 시설의 유형과 같은 인자를 고려할 것이다.

[0658] **C. CD33를 표적으로 하는 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템의 플라스미드 작제**

[0659] 아데노신 염기 편집기(예를 들어, ABE8e)에 융합된 Cas 틱내기효소를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 얻고, CD33를 표적으로 하는 gRNA(예를 들어, 서열번호 3)를 벡터에 클로닝시킨다. CD33 gRNA 올리고뉴클레오타이드를 Integrated DNA Technologies(IDT)로부터 얻고, 37°C에서 30분 동안 폴리뉴클레오타이드 키나제(Fermentas)를 이용하여 인산화시키고, 95°C까지 5분 동안 가열함으로써 어닐링시키고, 25°C까지 1.5°C/분으로 냉각시켰다. T7 결찰효소를 사용하여 올리고를 어닐링시키고, 이후에, 어닐링된 올리고를 25°C에서 5분 동안 겔 정제 벡터(Qiagen)에 결찰시킬 것이다. 이어서, 얻어진 플라스미드를 내독소-프리 미디-분취 키트(endotoxin-free midi-prep kit)(Qiagen)를 이용하여 증폭시킬 수 있다(Sanjana et al., *Nat Methods* (2014)(8):783).

[0660] 대안적으로, 두 벡터 시스템은 앞서 기재한 프로토콜을 사용할 수 있다(gRNA 및 Cas는 별개의 벡터로부터 발현됨)(Mandal et al., *Cell Stem Cell* (2014) 15(5):643). 본 명세서에서, Mandal 등은 비-바이러스 벡터로부터 발현된 CRISPR-Cas 시스템을 이용하여 인간 조혈모세포에서 유전자의 효율적인 제거를 달성하였다.

[0661] 또한 대안적으로, 리보핵단백질(RNP) 기반 전달 시스템을 이용하여 단백질 형태로 아데노신 염기 편집기(예를 들어, ABE8e) 및 gRNA에 융합된 Cas 틱내기효소를 세포에 전달한다.

[0662] CD33 고갈 조혈모세포 HSC를 환자에 주입하는 것에 추가로, 프로토콜은 실시예 5의 방법을 이용하여 CD34⁺CD33^Δ EMR^{Δ13} 고갈 HSC를 주입하였다.

[0663] **D. CD34⁺CD33^{Δ2} 또는 CD34⁺CD33^{Δ2} EMR^{Δ13-} 세포를 생성하기 위한 CD34⁺ 세포 HSC의 형질감염**

[0664] 세포 배양물 등급 줄기 세포 인자(SCF) 300ng/ml, FLT3-L 300ng/ml, 트롬보포이에틴(TPO) 100ng/ml 및 IL-3

60ng/ml의 존재 하에 무혈청 CellGro SCGM 배지 중 1×10^6 개의 세포/ml로 (단계 4로부터의) 새로 단리된 말초 혈액-유래 CD34⁺ 세포를 파종할 것이다. 사전 자극의 24시간 후에, Amaxa 인간 CD34 세포 Nucleofector 키트(U-008)(#VPA-1003)(Mandal et al., Cell Stem Cell (2014) 15(5):643)를 이용하여 또는 리보핵단백질(RNP) 기반 전달 시스템을 이용하여 Cas9 및 CD33 gRNA를 포함하는 LentiCRISPR v2로 CD34⁺ HSC를 형질감염시킬 것이다. 형질감염 24 내지 48시간 후에, 1.2μg/ml 퓨로마이신으로 CD34⁺CD33^{Δ2} 또는 CD34⁺CD33^{Δ2} EMR^{Δ13} 세포를 선택한다. 퓨로마이신 선택 후에, 세포를 퓨로마이신이 없는 배지에서 며칠 동안 유지할 것이다.

[0665] **E. 환자에 대한 CD34⁺ CD33^{Δ2} 세포의 재주입**

[0666] 필터 없이 표준 혈액 투여를 이용하여 Hickman 카테터를 통해 CRISPR-기반 염기 편집기 시스템으로 생체외에서 형질감염된 CD34⁺ 세포(CD34⁺CD33^{Δ2} 또는 CD34⁺CD33^{Δ2} EMR^{Δ13} 세포)를 즉시 재주입한다(Hacein-Bey Abina et al. JAMA (2015) 313(15):1550).

[0667] 일반적으로, 순환 아세포의 재현 및 혈구감소증에 대해 상기 약속한 치료 프로토콜을 받은 환자를 모니터링할 것이다. 추가적으로, 특정 환자에서 AML의 근본 메커니즘에 따라서, 유익한 분자 또는 세포유전 마커의 재출현, 또는 유익한 유세포 분석 패턴에 대해 시험함으로써 치료의 성공을 모니터링할 것이다. 예를 들어, (염색체 22 상의) BCR 및 (염색체 9 상의) ABL에 대해 프로브로 형광동소교잡법(fluorescent *in situ* hybridization: FISH))을 이용하여 Philadelphia 염색체-양성 AML에서 BCR-ABL 신호의 재출현을 검출할 것이다.

[0668] CRISPR-기반 염기 편집기 시스템을 통한 CD33 고갈의 성공을 평가하기 위해, 말초 혈액 CD34⁺ 세포를 (이식 후) 환자로부터 단리시키고, 예를 들어, 유세포분석, 웨스턴 블롯팅 또는 면역조직화학을 이용하여 CD33 발현에 대해 평가할 것이다.

[0669] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 실시예에 기재한 HSCT는 자가 또는 동종이계 중 하나일 수 있고, 접근 둘 다 적합하며, 본 개시내용에 기재된 방법에 포함될 수 있다.

[0670] **III. 선택적 단계: 독소에 CD33 항체가 부착된 환자의 지속 치료**

[0671] **A. CD33 면역독소 겐투주맙 오조가미신(GO)에 의한 환자의 치료**

[0672] 2주만큼 분리된 2회 용량으로 2시간 정맥내 주사로서 환자를 9mg/m²의 항-CD33 항체 겐투주맙 오조가미신(GO)으로 처리할 것이다(Larson et al., Cancer (2005) 104(7):1442-52). GO는 세포정지제인 칼리케아마이신에 접합된 CD33에 대한 인간화된 단클론성 항체를 포함한다(도 11).

[0673] 대안적으로, 항-CD33 항체를 상이한 독소에 접합시킬 수 있고, 예컨대, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소 A(PE), 또는 리신 독소 A 쉐(RTA)를 생성할 수 있다(Wayne et al., Blood (2014) 123(16): 2470). 유사하게, 항-EMR2 항체를 독소에 부착시킬 수 있고, 치료 요법에 포함할 수 있다.

[0674] **실시예 7: 항-CD33 키메라 수용체를 발현시키는 T 세포 및 NK 세포주는 CD33을 발현시키는 표적 세포의 세포사를 유도한다**

[0675] **CD33에 대한 키메라 수용체의 결합**

[0676] 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 CD33에 결합하는 키메라 수용체(예를 들어, CART1, CART2, CART3)를 생성하고, pHIV-Zsgreen �터(Addgene; 매사추세츠주 케임브리지 소재)에 삽입하였다. 키메라 수용체를 포함하는 벡터를 사용하여 렌티바이러스 입자를 생성하고, 이를 사용하여 상이한 세포 유형, 예를 들어 T 세포주(예를 들어, 293 T 세포) 및 NK 세포주(예를 들어, NK92 세포)를 형질도입하였다. 웨스턴 블롯팅(도 12, 패널 A) 및 유세포분석(도 12, 패널 B)에 의해 키메라 수용체의 발현을 검출하였다.

[0677] 키메라 수용체를 발현시키는 세포를 형광-활성화 세포 분류(FACS)에 의해 선택하고, CD33에 결합하는 이들의 능력에 대해 평가하였다. 간략히 말해서, 키메라 수용체를 발현시키는 293T 세포의 용해물을 CD33 또는 CD33-알로 피코사이아닌(APC) 접합체와 공동 인큐베이션시켰다. 샘플에 단백질 전기영동법을 실시하고, Ponceau 단백질 염색으로 염색하거나(도 13, 패널 A) 또는 막에 전달하고, 항-CD3ζ 1차 항체로 프로빙하였다(도 13, 패널 B). 두 경우 모두, 키메라 수용체와 이들의 표적인 CD33 사이에 결합된다.

[0678] 프로브로서 CD33을 이용하여 유세포분석에 의해 CD33에 대한 결합에 대해 키메라 수용체를 발현시키는 K562 세

포를 평가하였다(도 13, 패널 C). 빈 백터 대조군을 포함하는 세포와 비교할 때 키메라 수용체(CART1, CART2 또는 CART3)의 발현 및 CD33 결합에 대해 양성인 세포 수의 증가가 있었고, 키메라 수용체가 CD33에 결합한다는 것을 나타낸다.

[0679] 키메라 수용체를 발현시키는 세포에 의해 유도되는 세포독성

[0680] 키메라 수용체를 발현시키는 NK-92 세포를 세포 표면 상에서 CD33을 제시하는 표적 세포의 세포독성을 유도하는 능력에 대해 기능적으로 특성규명하였다(예를 들어, K562는 CD33+인 인간 만성 골수성 백혈병 세포주임). 세포독성 분석을 수행하기 위해, 효과기 세포(면역 세포, 예컨대, NK-92 세포)를 키메라 수용체를 암호화하는 렌티바이러스 입자로 감염시키고, 확장하였다. 감염 7일 후에, 키메라 수용체 암호화 벡터(예를 들어, GFP+ 또는 Red+)에 의해 또한 암호화된 형광 마커를 선택함으로써 FACS 분석에 의해 키메라 수용체를 발현시키는 세포를 선택하였다. 키메라 수용체를 발현시키는 선택 세포를 1주 동안 확장시켰다. 감염 14일 후에, 표적 세포(표적 세포-표면 계통-특이적 항원인 CD33을 발현시키는 세포)를 카복시플루오레세인 석신이미딜 에스터(CFSE)로 염색하는 것 및 표적 세포와 키메라 수용체를 발현시키는 세포를 둘 다 계수하는 것을 수반하는 세포독성 분석을 수행하였다. 상이한 비의 표적 세포 및 키메라 수용체를 발현시키는 세포를 4.5시간 동안 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서 공동인큐베이션시켰고, 이후에 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)를 염색 비-생존 세포에 첨가하였다. 생존 및 비생존 표적 세포의 집단을 열거하기 위해 유세포분석을 수행하였다. 도 14, 패널 A 및 B에 나타낸 바와 같이, 키메라 수용체 CART1, CART2 또는 CART3을 발현시키는 NK92 세포는 평가한 세포비 각각에서 실질적인 양의 표적 K562 세포의 세포사를 유도하였다.

[0681] K562 세포의 세포사가 CD33에 대한 키메라 수용체의 특이적 표적화에 따른다는 것을 결정하기 위해, CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 CD33에서 결합되도록 K562를 유전자 조작하였다. 간략히 말해서, 인간 코돈-최적화된 Cas9 엔도뉴클레아제 및 CD33의 IgC 도메인의 일부를 표적으로 하는 gRNA를 K562 세포에서 발현시켜, CD33-결핍 K562 세포의 집단을 생성하였다. 세포를 확장시키고, 키메라 수용체를 발현시키는 NK92 세포와 함께 공동 인큐베이션시키고, 상기 기재한 바와 같이 세포독성 분석을 수행하였다. 도 15 패널 A에 나타낸 바와 같이, 풀링된 CD33-결핍 K562 세포는 세포사의 보통의 감소를 나타냈고, 키메라 수용체를 발현시키는 NK92 세포와 함께 공동 인큐베이션시켰다. 그러나, 세포독성 분석을 수행하기 위해 CD33-결핍 K562 세포의 단일 클론을 단리, 확장 및 사용하였을 때, 세포독성의 더 유의미한 감소가 관찰되었다(도 15, 패널 B).

[0682] 1차 T 세포에서의 키메라 수용체의 발현

[0683] CD4+, CD8+ 또는 CD4+/CD8+ 세포를 양성으로 선택함으로써 FACS에 의해 공여자로부터 얻은 PMBC에서 1차 T 세포 집단을 단리시켜, 고도로 순수한 집단을 생성하였다(도 16, 패널 A 및 B). 1차 T 세포(CD4+, CD8+ 또는 CD4+/CD8+ 세포)의 집단 각각을 키메라 수용체(예를 들어, CART1 및 CART8)를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고, 위에서 기재한 바와 같이 키메라 수용체를 발현시키는 얻어진 1차 T 세포를 사용하여 세포독성 분석을 수행하였다. 키메라 수용체를 발현시키는 CD4+ T 세포의 집단과 K562(1000개의 표적 K562 세포)의 공동 인큐베이션은 K562 세포의 세포독성을 초래하지 않았다(도 17, 패널 A). 대조적으로, 키메라 수용체를 발현시키는 CD8+ 또는 CD4+/CD8+ 세포 및 1000개의 표적 K562 세포 중 하나를 이용하는 세포독성 분석에서, CD8+ 또는 CD4+/CD8+ 세포는 K562 세포의 세포사를 낮은 세포비로 유도할 수 있었다(도 17, 패널 B).

[0684] 기타 실시형태

[0685] 본 명세서에 개시된 모든 특징은 임의의 조합으로 합쳐질 수 있다. 본 명세서에 개시된 각각의 특징은 동일하거나, 동등하거나 또는 유사한 목적의 작용을 하는 대안의 특징으로 대체될 수 있다. 따라서, 달리 분명하게 언급되지 않는 한, 개시된 각각의 특징은 단지 일반적인 일련의 동등한 또는 유사한 특징의 예이다.

[0686] 상기 설명으로부터, 당업자는 본 개시내용의 필수 특징을 용이하게 확인할 수 있고, 이의 사상과 범주로부터 벗어나는 일 없이, 다양한 용법 및 조건에 이를 적용하기 위해 본 개시내용의 다양한 변화 및 변형을 만들 수 있다. 따라서, 기타 실시형태도 청구범위 내이다.

[0687] 균등문

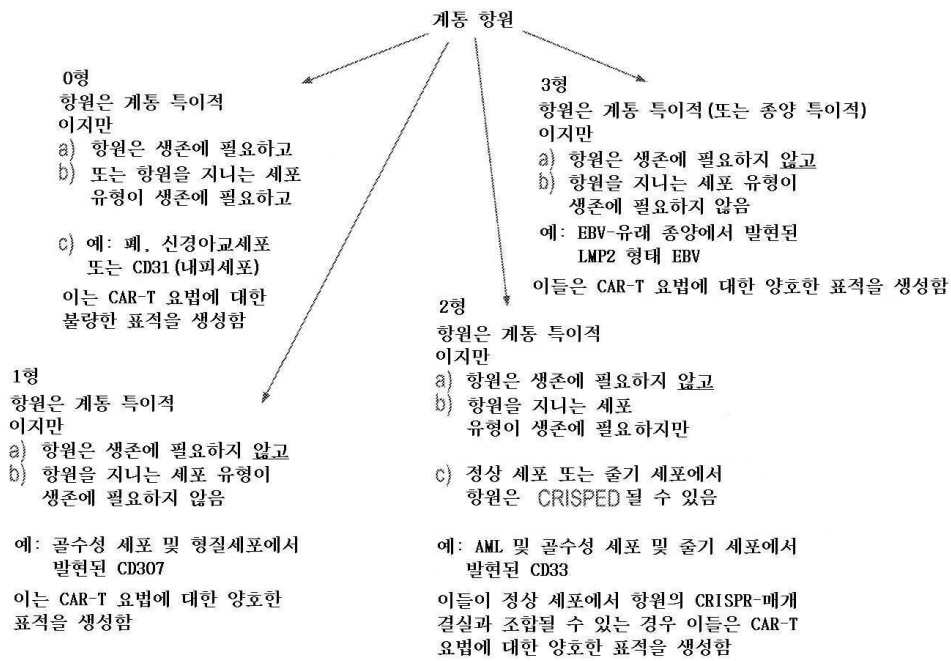
[0688] 몇몇 본 발명의 실시형태를 본 명세서에 기재하고 예시하였지만, 당업자는 본 명세서에 기재된 기능을 수행하고/하거나 결과 및/또는 이점 중 하나 이상을 얻고/얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 생각할 것이며, 이러한 변화 및/또는 변형 각각은 본 명세서에 기재된 본 발명의 실시형태의 범주 이내인 것으로 여겨진다. 더 일반적으로, 당업자는 본 명세서에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질 및 입체배치가 예시적인 것으로 의도된다는 것과 실제 파라미터, 치수, 물질 및/또는 입체배치가 본 교시가 사용되는 특정 출원 또는 출원들에

따라 다를 것임을 용이하게 인식할 것이다. 당업자는 단지 일상적인 실험을 이용하여, 본 명세서에 기재된 구체적인 본 발명의 실시형태에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 앞서 언급한 실시형태는 단지 예로서 제시된다는 것과 첨부하는 청구범위 및 이에 대한 균등물 내에서, 본 발명의 실시형태가 구체적으로 기재되고 특허청구되는 것과 다르게 실행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 본 개시내용의 본 발명의 실시형태는 본 명세서에 기재된 각각의 개개 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 이러한 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법이 상호간에 일치되지 않는 경우에, 둘 이상의 이러한 특징, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은 본 개시내용의 본 발명의 범주 이내에 포함된다.

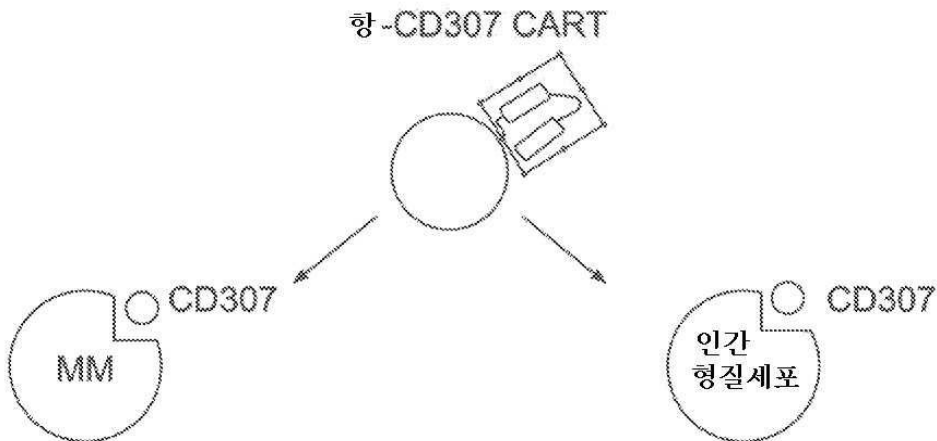
- [0689] 본 명세서에 정의되고 사용되는 바와 같은 모든 정의는 사전 정의, 참조에 의해 원용되는 문헌의 정의 및/또는 정의되는 용어의 보통의 의미로 조절하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0690] 본 명세서에 개시된 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 각각이 인용하는 대상 물질에 대해 참조로 원용되며, 일부 경우에 문헌 전문을 포함할 수 있다.
- [0691] 본 명세서 및 청구범위에서 사용되는 바와 같은 단수의 물품은, 반대로 분명하게 표시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0692] 본 명세서 및 청구범위에서 본 명세서에 사용되는 바와 같은 어구 "및/또는"은 이렇게 결합된 요소, 즉, 일부 경우에 결합하여 존재하고 다른 경우에 분리적으로 존재하는 요소 중 "하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"과 함께 열거되는 다중 요소는 동일한 방식으로, 즉, 이렇게 결합된 요소 중 "하나 이상"으로 해석되어야 한다. 다른 요소는, 구체적으로 확인된 해당 요소와 관련되든 관련되지 않든, 선택적으로 "및/또는"이라는 절에 의해 구체적으로 확인되는 요소가 아닌 요소로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적 예로서, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용될 때 "A 및/또는 B"에 대한 언급은, 일 실시형태에서, A 단독(선택적으로 B가 아닌 요소를 포함함); 다른 실시형태에서, B 단독(선택적으로 A가 아닌 요소를 포함); 또 다른 실시형태에서 A와 B 둘 다(선택적으로 다른 요소를 포함) 등을 지칭할 수 있다.
- [0693] 본 명세서 및 청구범위에서 사용되는 바와 같은 "또는"은 상기 정의한 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리시킬 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것, 즉, 다수의 요소 또는 요소의 목록, 및 선택적으로 추가적인 열거되지 않은 항목 중 적어도 하나의 포함뿐만 아니라 하나 초과를 포함하는 것으로 해석될 것이다. 반대로 분명히 표시되는 용어, 예컨대 "중 하나만" 또는 "중 정확히 하나" 또는, 청구범위에서 사용될 때, "로 이루어진"만이 다수의 요소 또는 요소의 목록 중 정확히 하나의 포함을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "또는"은 "중 하나", "의 하나", "중 단지 하나" 또는 "중 정확히 하나"와 같은 배타적 용어가 선행될 때 배타적 대안(즉, "둘 중 하나 또는 다른 하나이지만 둘 다는 아닌")을 나타내는 것으로만 해석될 것이다. 청구범위에서 사용될 때 "~로 본질적으로 이루어진"은 특허법 분야에서 사용되는 보통의 의미를 가질 것이다.
- [0694] 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 본 명세서 및 청구범위에 사용되는 바와 같은 어구 "적어도 하나"는 요소 목록의 요소 중 어느 하나 이상으로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하지만, 반드시 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각 및 모든 요소 중 적어도 하나를 포함하고 요소 목록에서 요소의 임의의 조합을 제외하지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 본 정의는 또한 구체적으로 확인된 해당 요소와 관련되든 관련되지 않든, "적어도 하나"라는 어구가 지칭하는 요소의 목록 내에서 구체적으로 확인되는 요소가 아닌 요소가 선택적으로 존재할 수 있는 것을 허용한다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나"(또는 동등하게는, "A 또는 B 중 적어도 하나" 또는 동등하게는 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는, 일 실시형태에서, B가 존재하지 않고 적어도 하나, 선택적으로 하나 초과를 포함하는 것(선택적으로 B가 아닌 요소를 포함하는 것); 다른 실시형태에서, A가 존재하지 않고 적어도 하나, 선택적으로 하나 초과를 포함하는 것(선택적으로 A가 아닌 요소를 포함하는 것); 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나, 선택적으로 하나 초과를 포함하는 것(선택적으로 다른 요소를 포함하는 것) 등을 지칭할 수 있다.
- [0695] 또한 달리 분명하게 반대로 표시되지 않는 한, 하나 초과를 단계 또는 작용을 포함하는 본 명세서에 청구된 임의의 방법에서, 방법의 단계 또는 작용의 순서는 방법의 단계 또는 작용이 열거된 순서로 반드시 제한되지 않는다는 것이 또한 이해되어야 한다.

도면

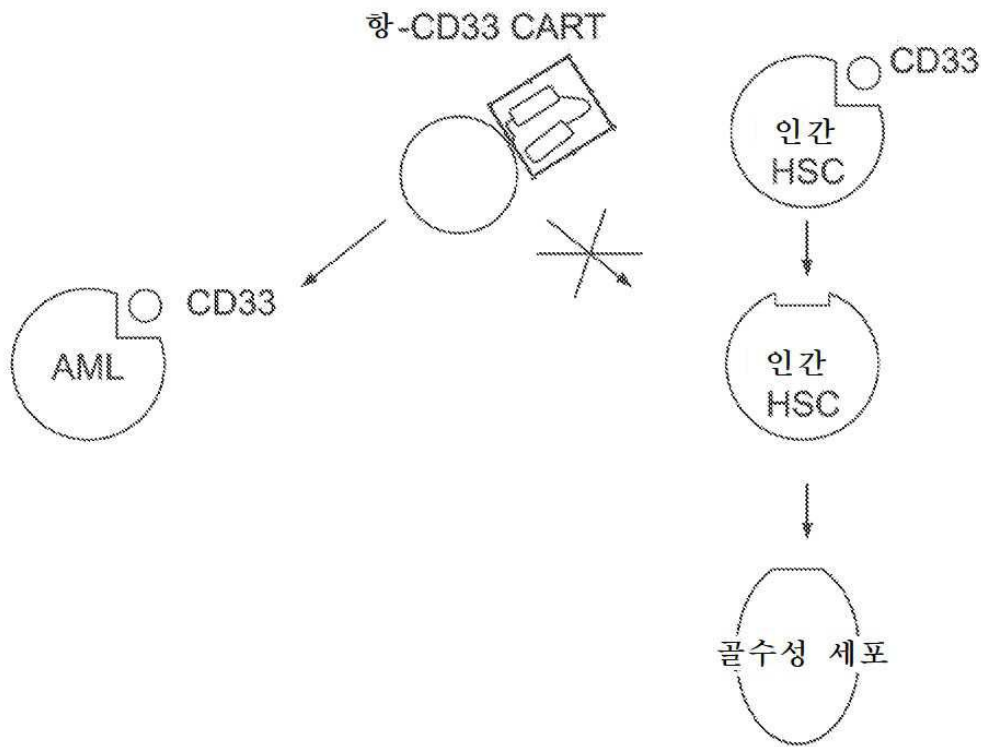
도면1



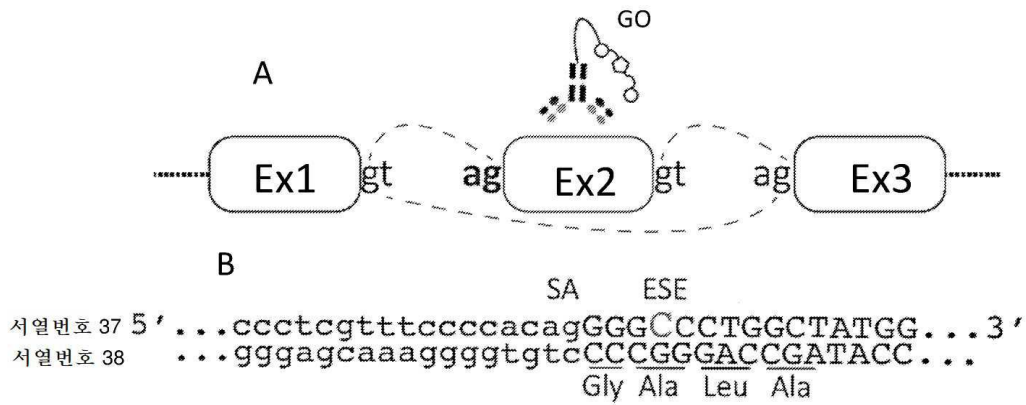
도면2



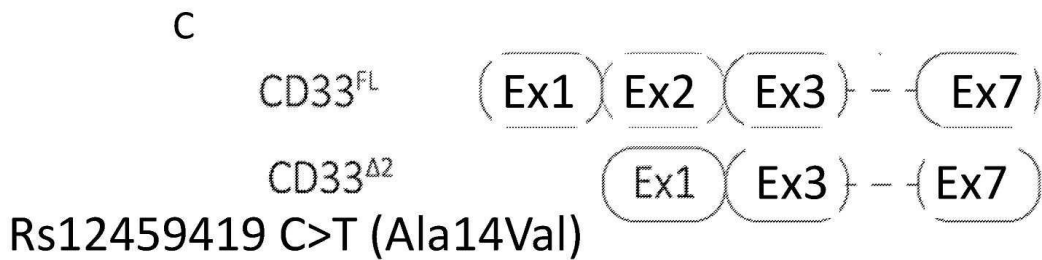
도면3



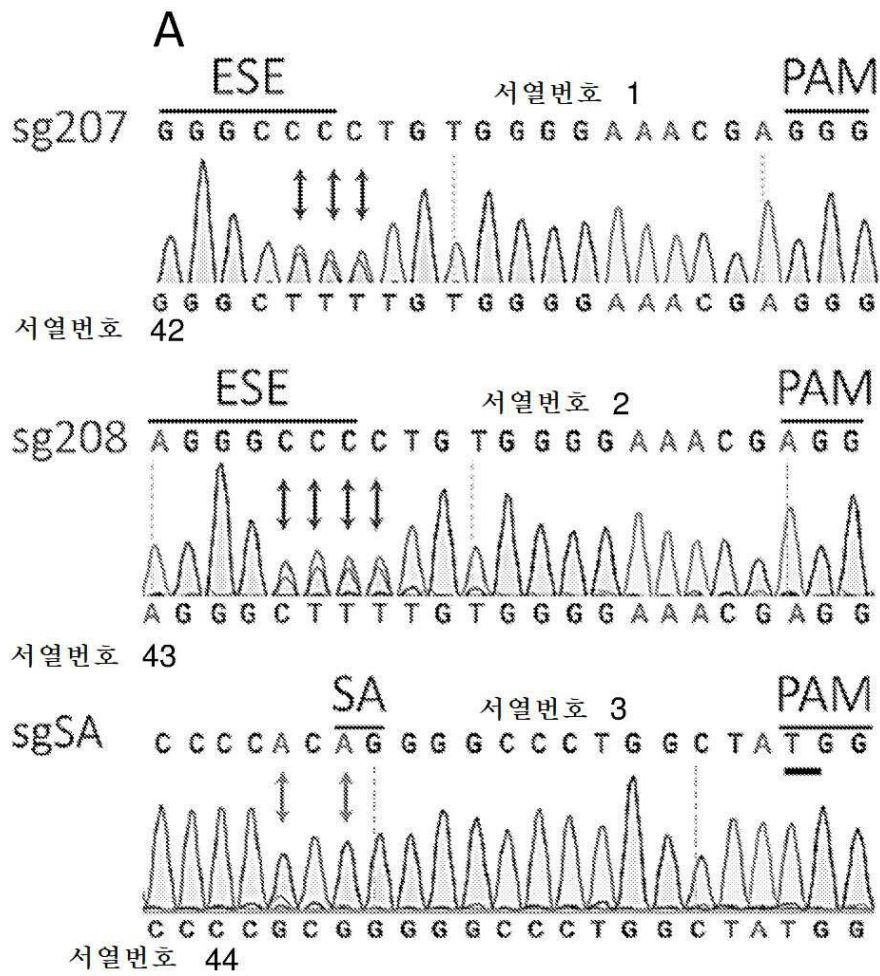
도면4ab



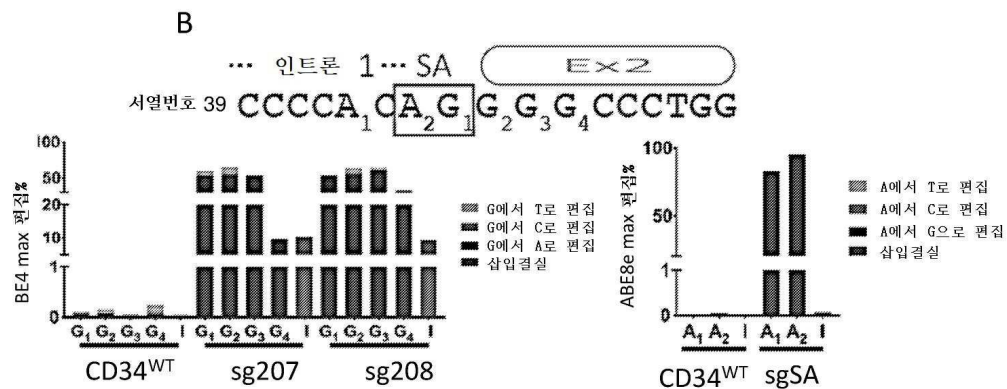
도면4c



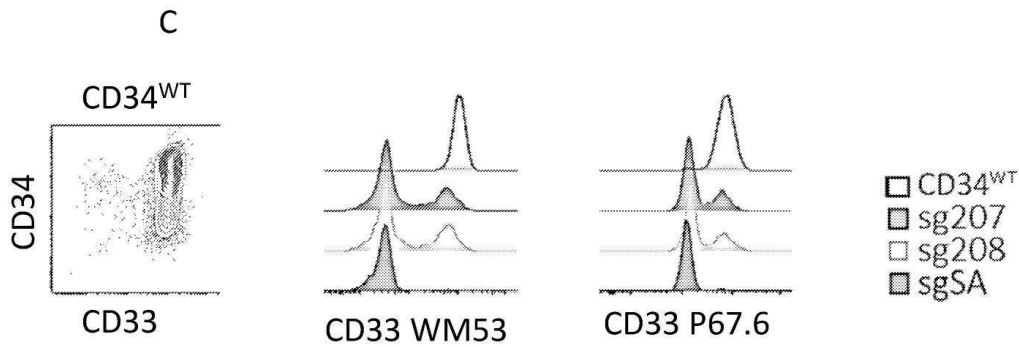
도면5a



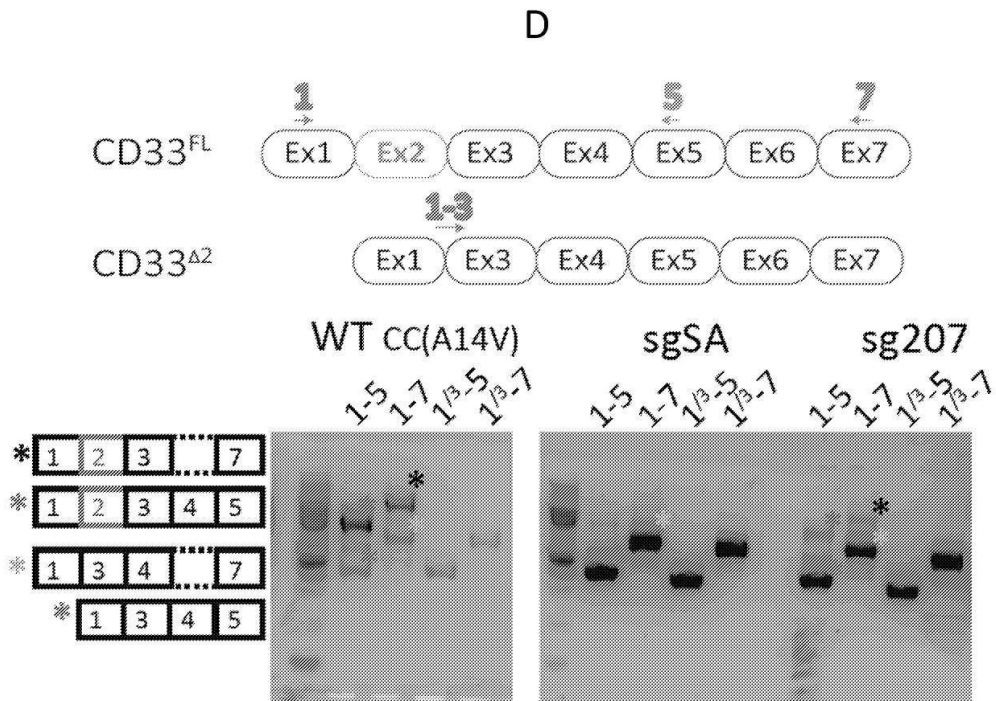
도면5b



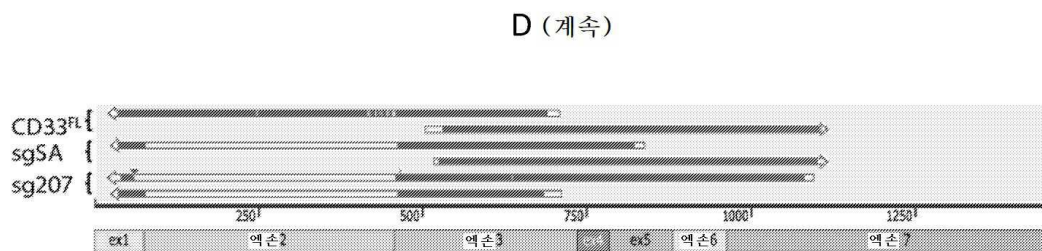
도면5c



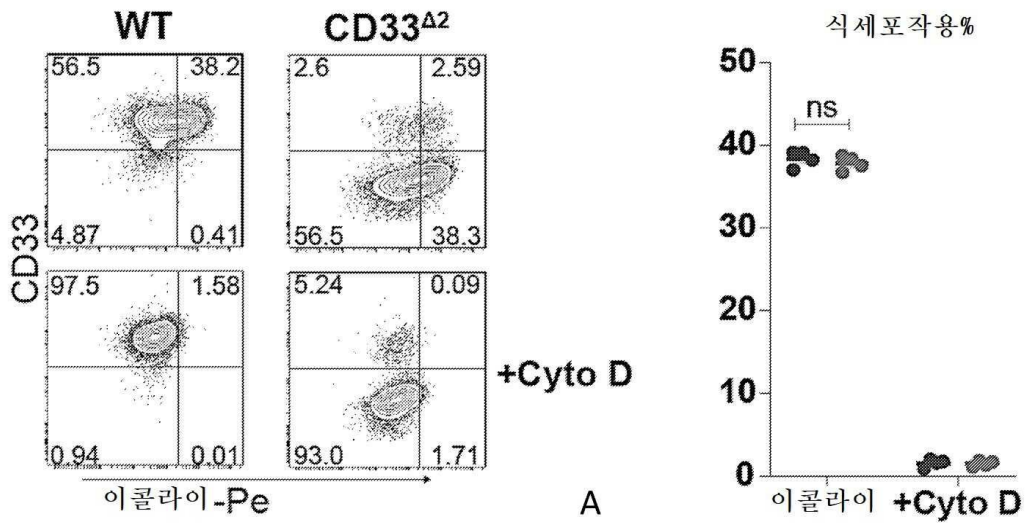
도면5da



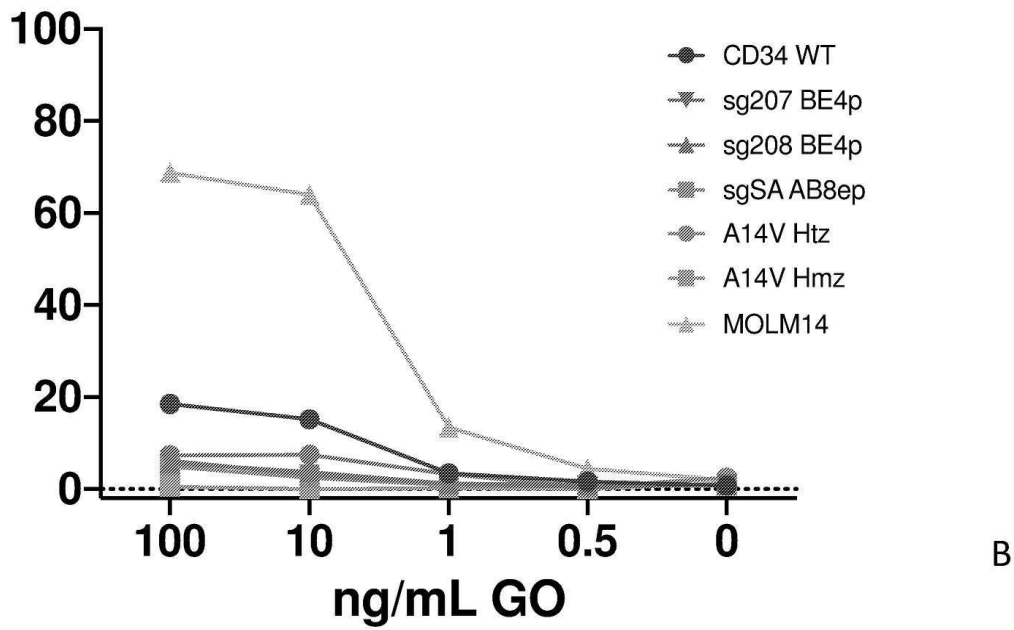
도면5db



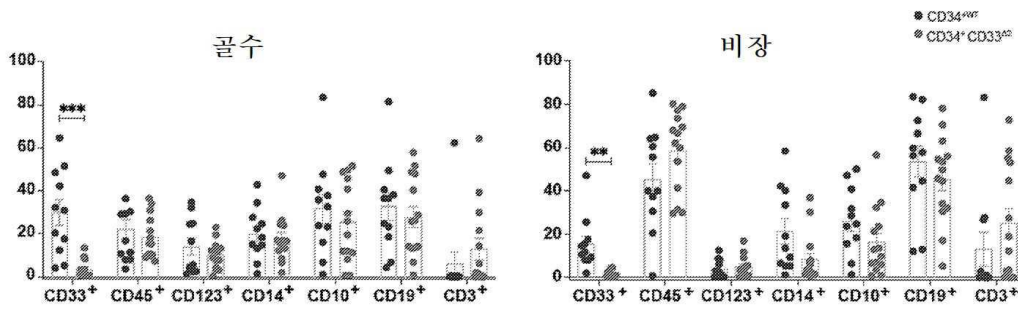
도면6a



도면6b



도면7a



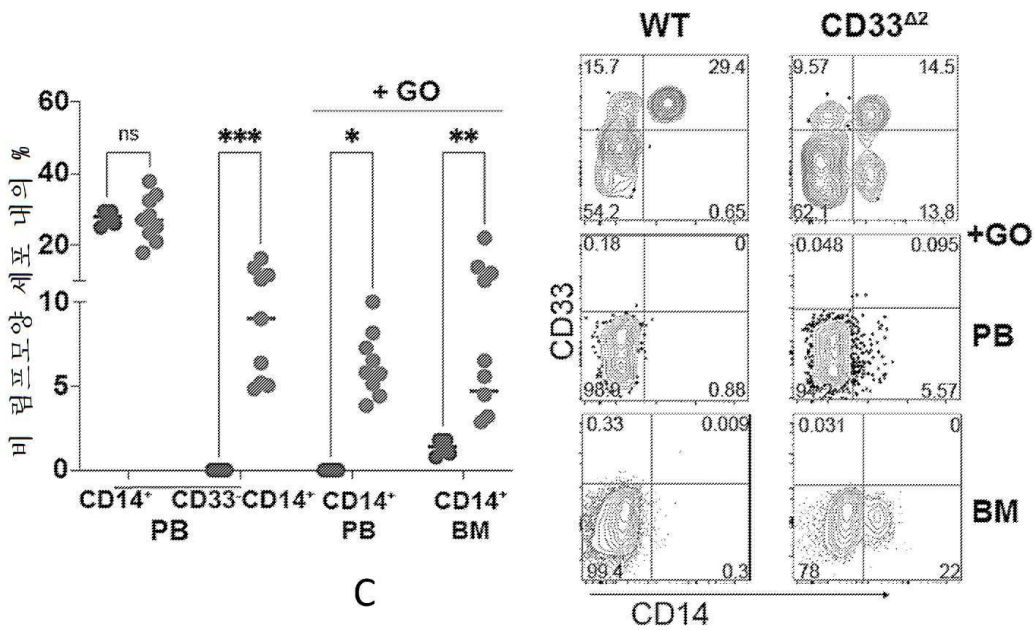
A

도면7b



B

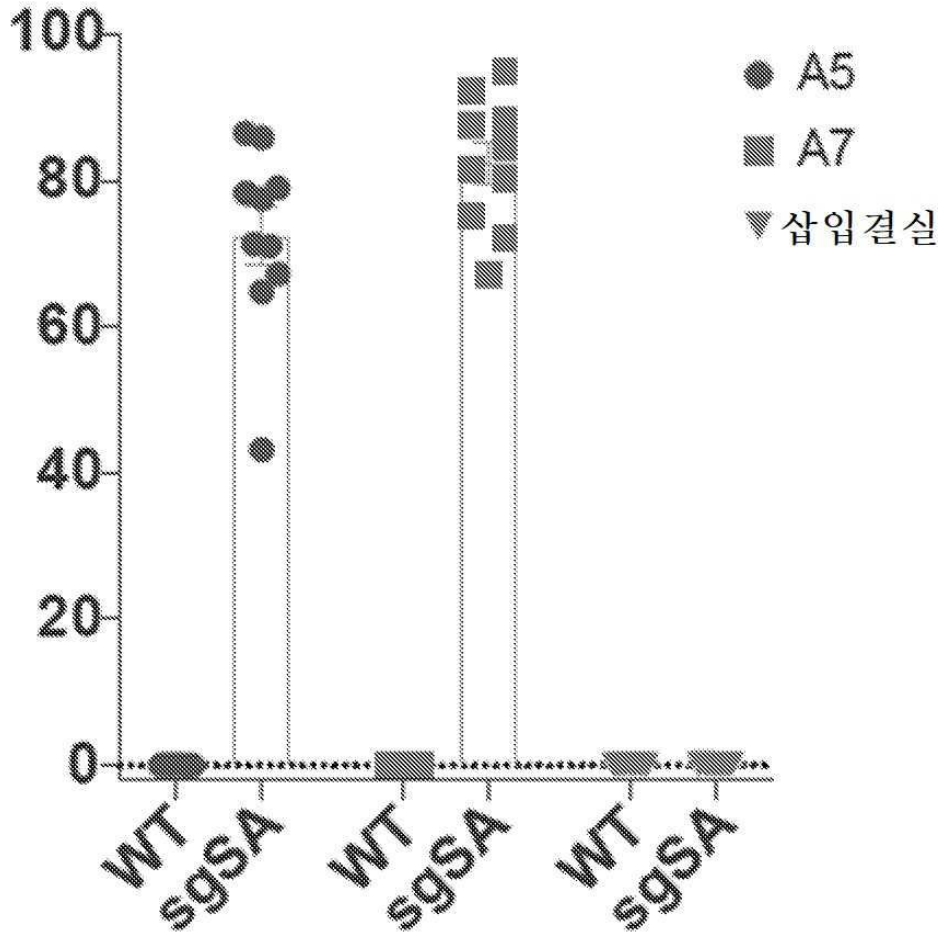
도면7c



C

도면7d

표적 상 편집



D

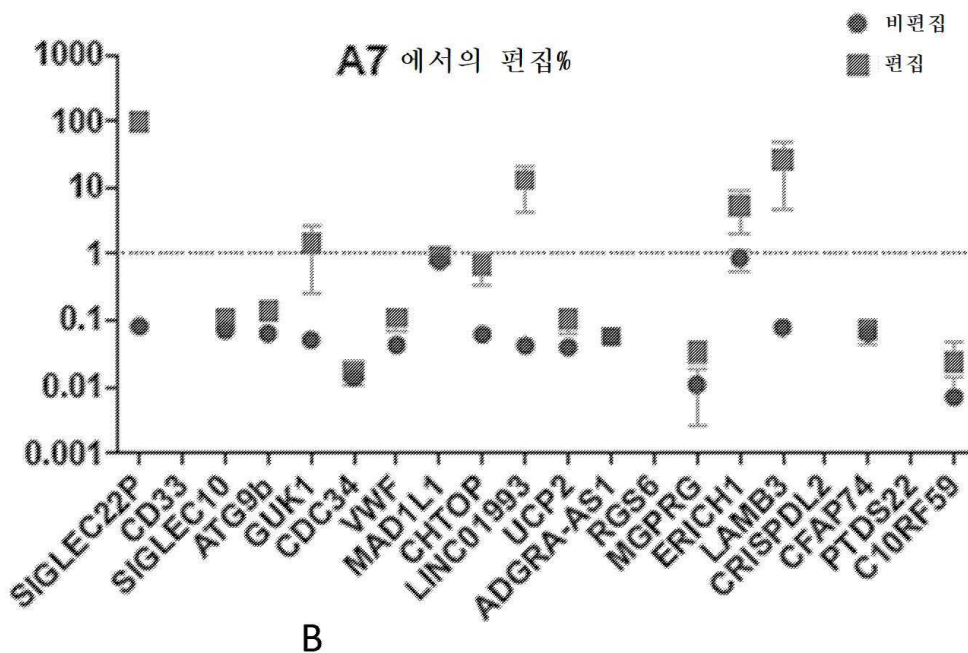
도면8a

CIRCLE-seq 에 의해 확인되는 상위 19개의 비표적 부위

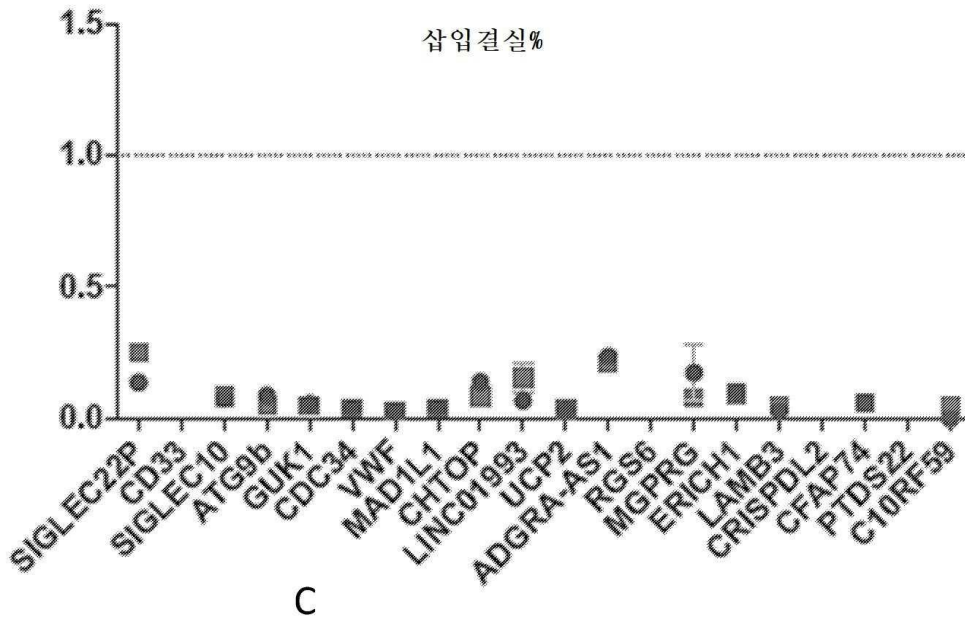
Chr	미스 매치	가장 가까운 유전자	거리	변화
19	0	SIGLEC22P (슈도)	엑손 2	Nc 그러나 SS 가로막힘
19	0	CD33	엑손 2	Nc 그러나 SS 가로막힘
19	2	SIGLEC10	엑손 3	Nc 그러나 SS 가로막힘
7	5	ATG9B	엑손 14	Nc 그러나 SS 가로막힘
1	6	GUK1	GUK 1 까지 2500bp	
19	5	CDC34	CDC34 에서 67bp	
12	4	VWF	인트론 (엑손까지 100bp)	
7	3	MAD1L1	인트론 (엑손까지 14kp)	
1	4	CHTOP	엑손 4	His에서 Val (제1 A의 경우) His에서 Met (제2 A의 경우)
17	3	LINC01993	LINC01993	
11	3	UCP2	엑손 5	Thr에서 Ala (제1 A의 경우) Thr에서 Thr (제2 A의 경우)
10	4	ADGRA1-AS1	38 kb	
14	3	RGS6	인트론 (엑손까지 67kb)	
11	5	MGPRG	25 kb	
8	5	ERICH1	인트론 (엑손까지 36kb)	
1	5	LAMB3	인트론 (엑손까지 1005bp)	
16	5	CRISPLD2	인트론 (엑손까지 75bp)	
1	5	CFAP74	인트론 (엑손까지 817bp)	
11	6	PTDSS2	인트론 (엑손까지 739bp)	
1	5	C10RF59	인트론 (엑손까지 30bp)	

* Nc 비암호화; SS 스플라이스 부위

도면8b



도면8c



도면9a

EMR2 좌위

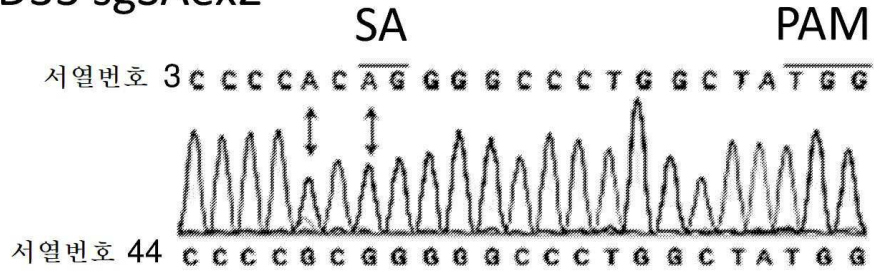


서열번호 40 5' ...TCACCTTCTCCCACCGTgtgagtgctggtgga...3'
 서열번호 41 ...AGTGGAGAGGGTGGCAcactcaccgaccacct...
 PAM

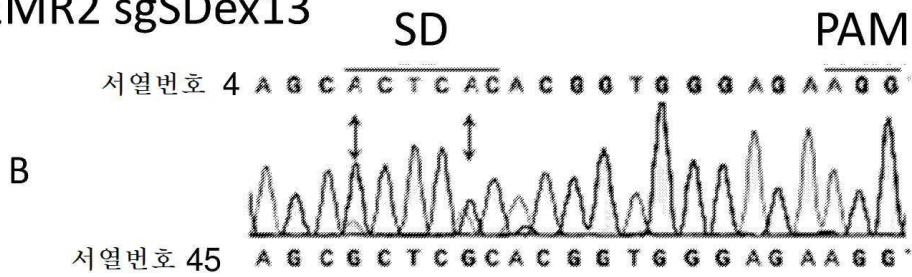
A

도면9b

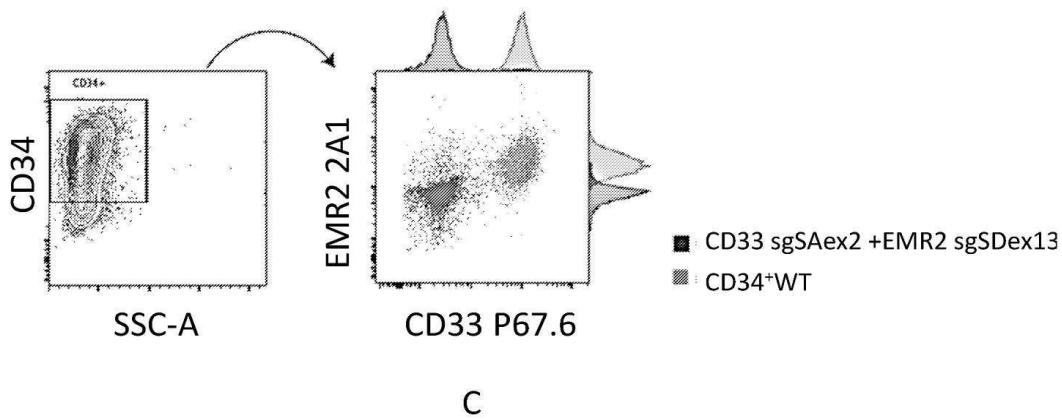
CD33 sgSAex2



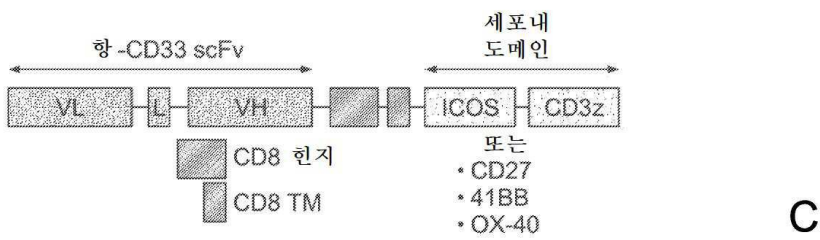
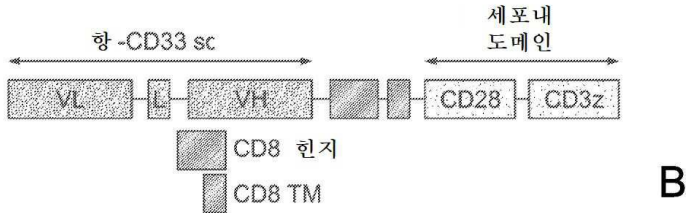
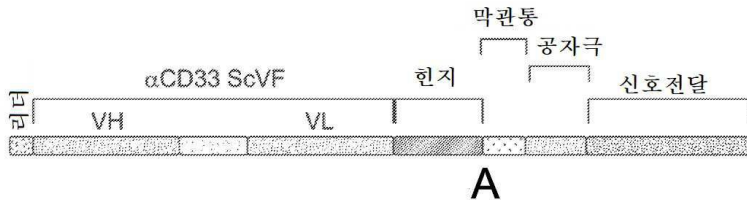
EMR2 sgSDex13



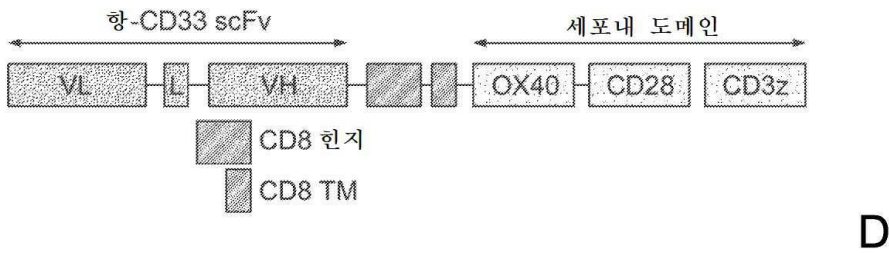
도면9c



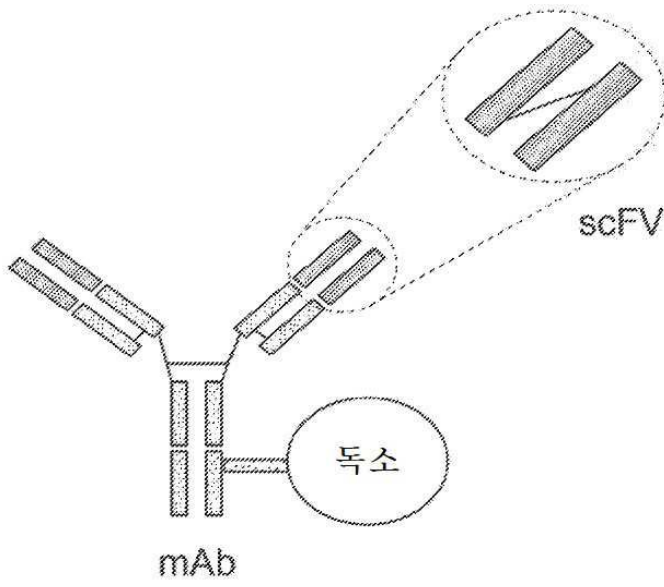
도면10ac



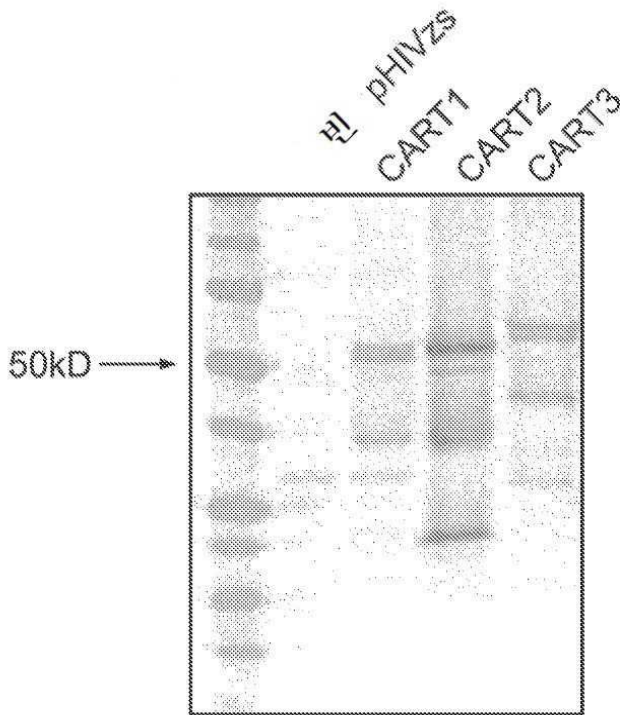
도면10d



도면11



도면12a

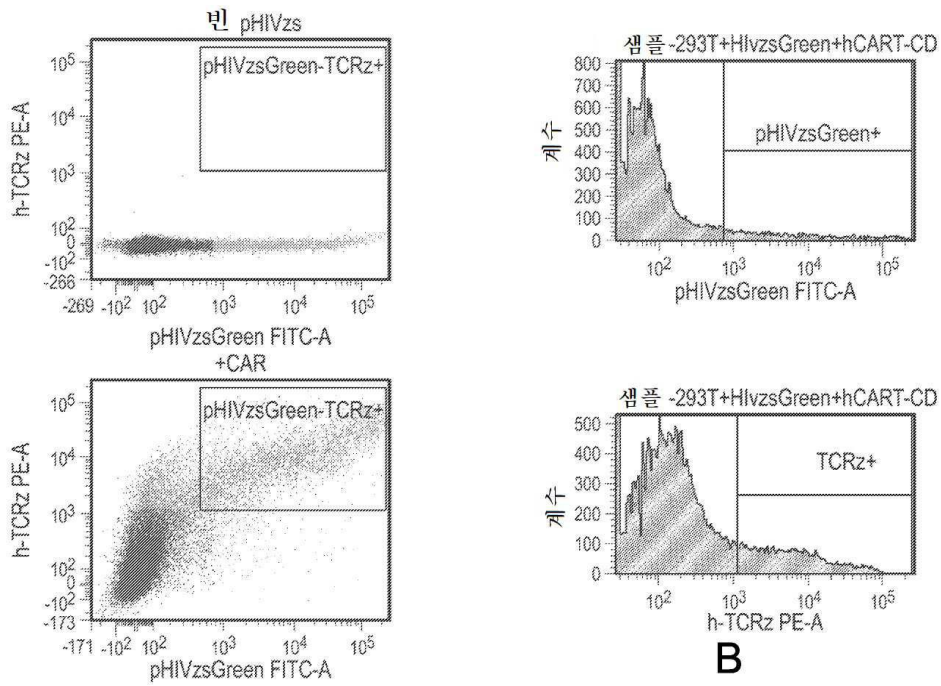


항-CD3TCRz, ab로 염색
에 피토프:C-말단 CD3z

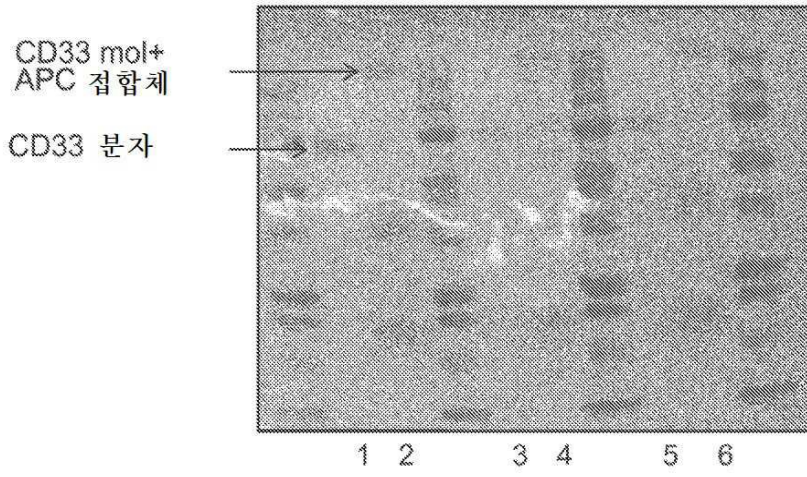
작제물	MW kDa
CART1	55.3AAAA
CART2	56.3
CART3	61

A

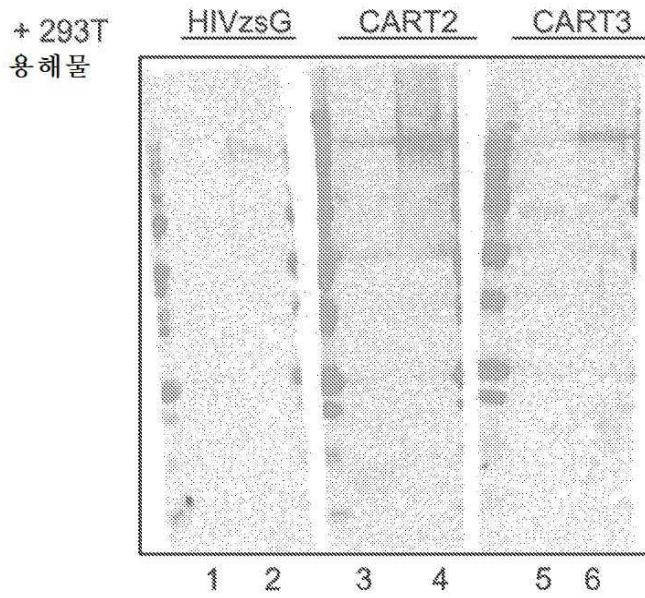
도면 12b



도면 13ab

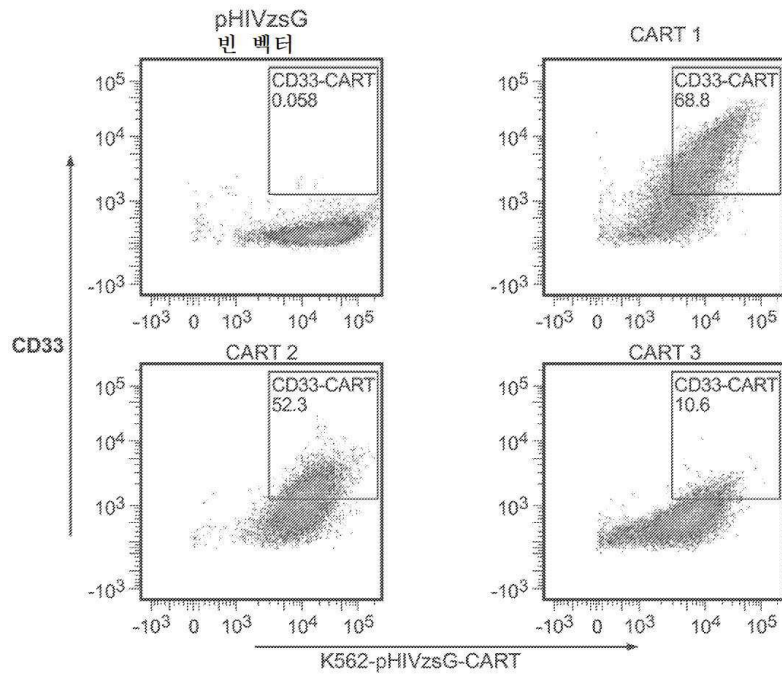


A



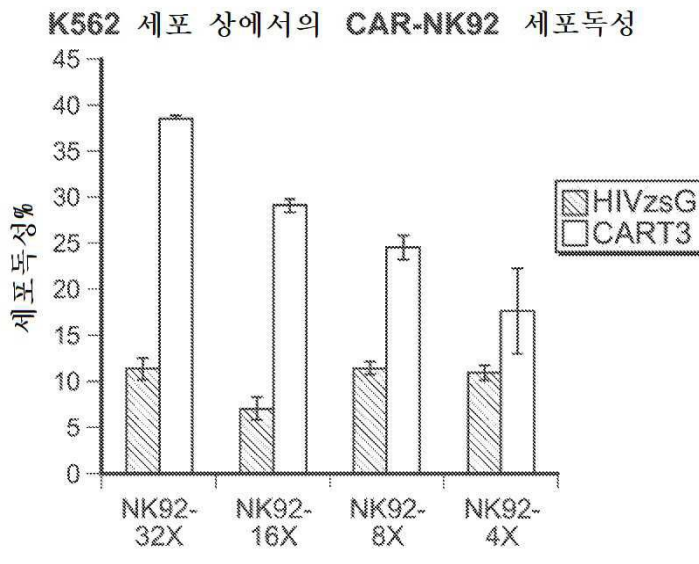
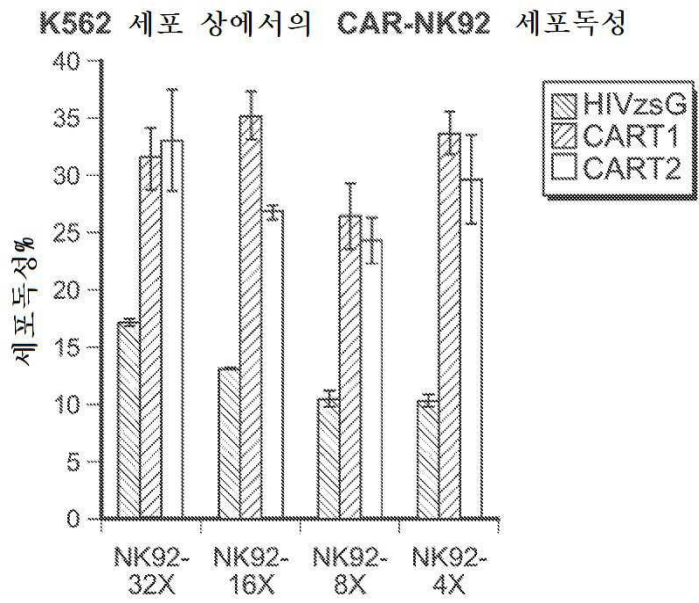
B

도면13c

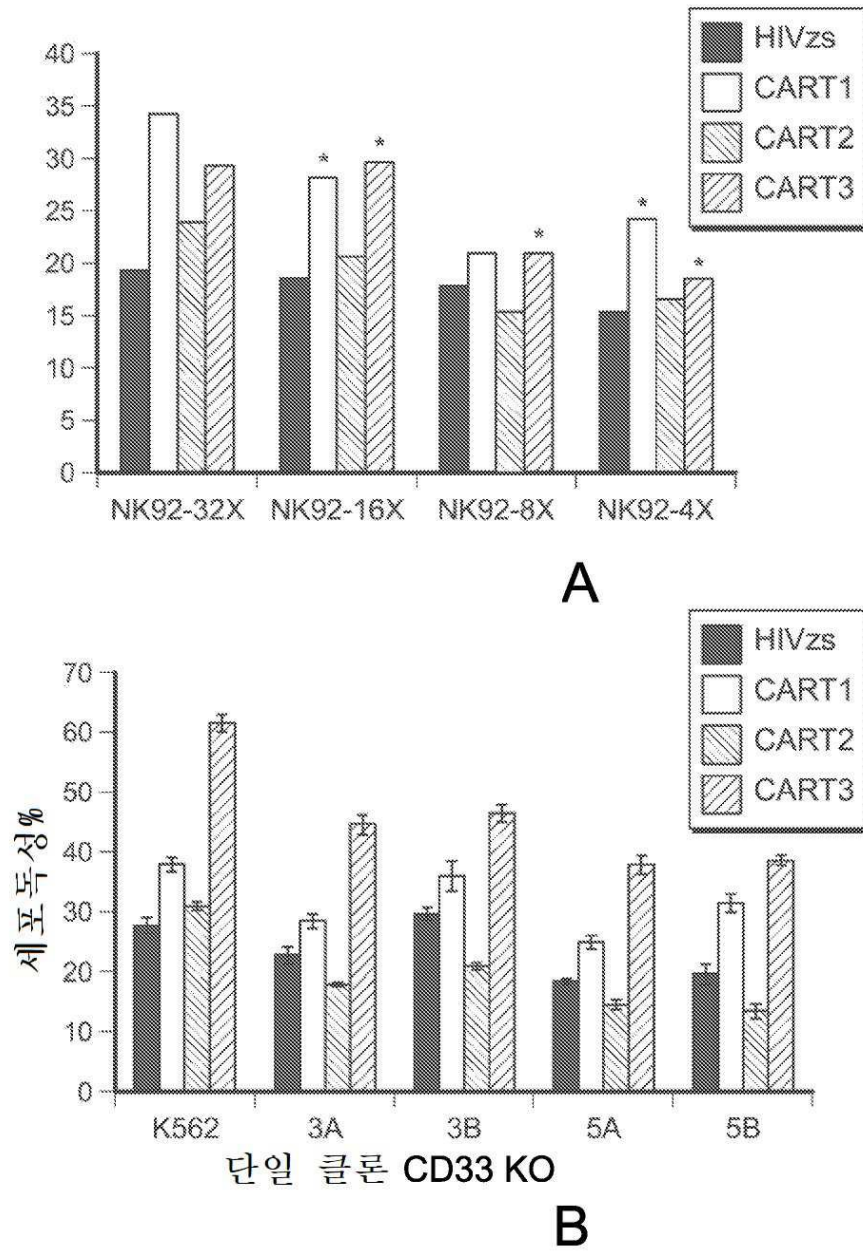


C

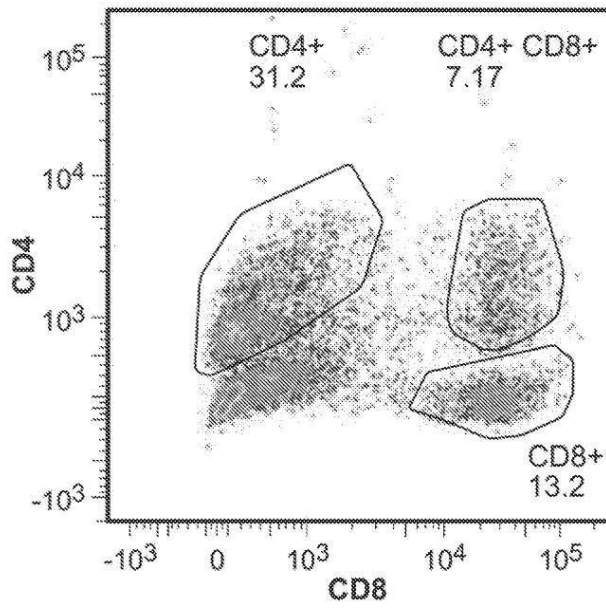
도면14ab



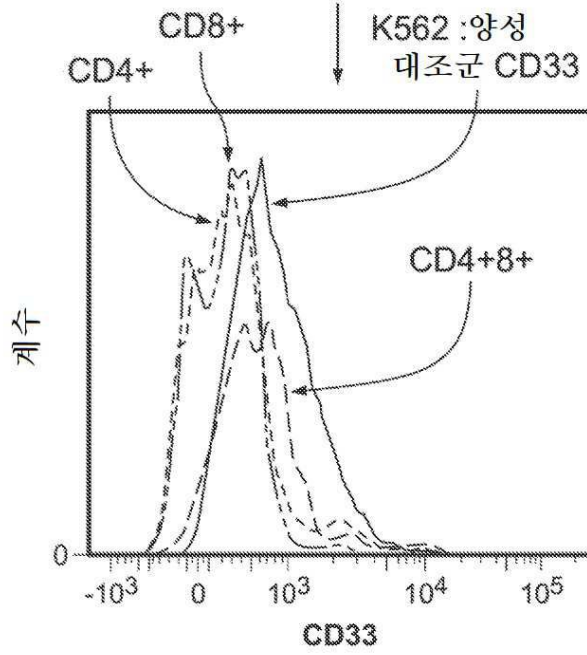
도면15



도면16

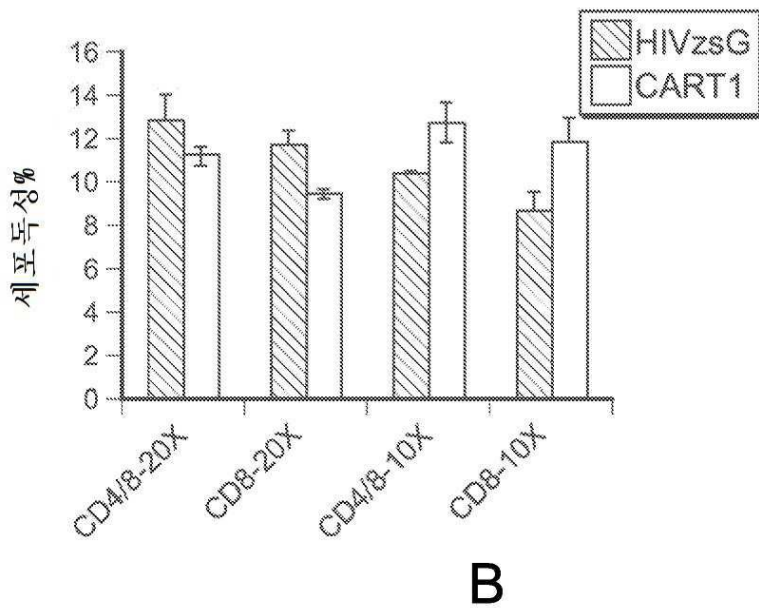
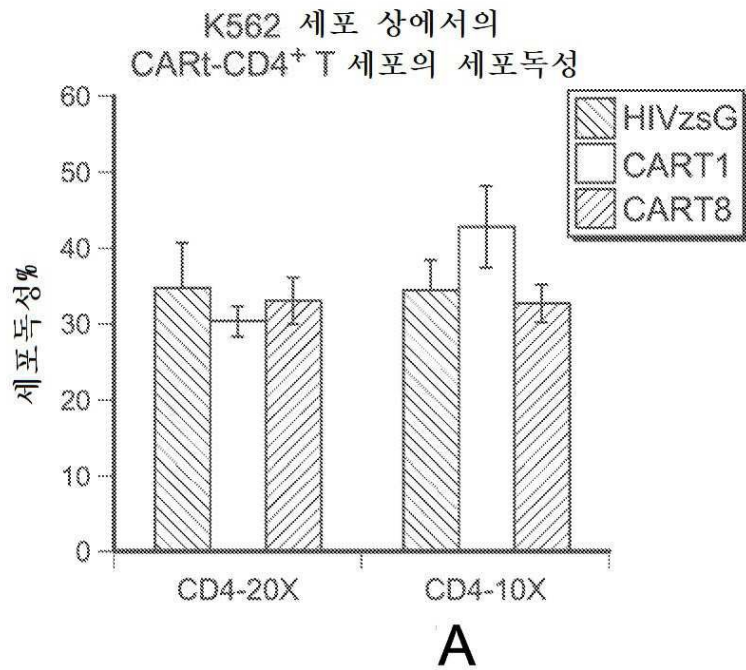


A



B

도면17



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Columbia University in the City of New York

<120> Compositions and Methods for Inhibition of Lineage Specific
Antigens using CRISPR-Based Base Editors

<130> WO/2021/247856

<140> PCT/US2021/035691

<141> 2021-06-03
 <150> US 63/033,966
 <151> 2020-03-06
 <150> US 63/033,970
 <151> 2020-03-06
 <150> US 63/183,791
 <151> 2021-04-05
 <160> 47
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223
 > synthetic oligonucleotide
 <400> 1
 gggcccctgt ggggaaacga ggg 23
 <210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 2
 agggcccctg tgggaaacg agg 23
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic oligonucleotide
 <400> 3
 cccacaggg gccctggcta tgg 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic oligonucleotide

<400> 4

agcactcaca cggtagggaga agg

23

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

 20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 6

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 6

caggtgcagc tgcagcagcc cggcgccgag gtggtgaagc cggcgccag cgtgaagatg

60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactaca tccactggat caagcagacc 120
 cccggccagg gcctggagt ggtgggctg atctaccccg gcaacgacga catcagctac 180
 aaccagaagt tccagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcac caccgcctac 240
 atgcagctga gcagcctgac cagcaggac agcggcgtgt actactgctc caggagggtg 300
 aggctgaggt acttcgact gtggggccag ggcaccaccg tgaccgtgag cagc 354

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 7

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
 20 25 30
 Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

<210> 8

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 8

gagatcgtgc tgaccagag ccccgccagc ctggccgtga gccccggcga gagggtgacc 60
 atgagctgca agagcagcca gagcgtgttc ttcagcagca gccagaagaa ctacctggcc 120
 tggtagaccagc agatccccgg ccagagcccc aggctgctga tctactgggc cagcaccagg 180

gagagcggcg tgcccagacag gttcaccggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240
 atcagcagcg tgcagcccga ggacctggcc atctactact gccaccagta cctgagcagc 300
 aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagagg 339

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 9

Gly Ser Thr Ser Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 1 5 10 15
 Thr Lys Gly

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 10

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

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110
 Arg

<210> 15

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 15

attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60
 catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt ccctatttc ccggaccttc taagcccttt 120
 tgggtgctgg tgggtggtgg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 180
 tttattatct tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac 240
 atgactcccc gccgccccgg gccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc 300
 gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag tcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac 360
 cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 420
 gttttggaca agagacgtgg ccgggacct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 480
 cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 540
 attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 600
 agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggcctgcc ccctcgc 657

<210> 16

<211> 603

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 16

ctatcaattt ttgatcctcc tccttttaaa gtaactctta caggaggata ttgcatatt 60

tatgaatcac aactttgttg ccagctgaag ttctggttac ccataggatg tgcagccttt 120

gttgtagtct gcattttggg atgcatactt atttgttggc ttacaaaaaa gaagtattca 180

tccagtgtgc acgaccctaa cgggtgaatac atgttcatga gagcagtga cacagccaaa 240

aaatctagac tcacagatgt gaccctaaga gtgaagtca gcaggagcgc agacgcccc 300

gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 360

tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tggggggaaa gccgagaagg 420

aagaacctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 480

agtgagattg ggatgaaagg cgagcgcgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 540

ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgccttc acatgcagc cctgccccct 600

cgc 603

<210> 17

<211> 627

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 17

attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60

catgtgaaag gaaaacacct ttgtccaagt ccctatttc ccggaccttc taagcccttt 120

tgggtgctgg tgggtggttg tggagtctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 180

tttattattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgttc 240

atgagagcag tgaacacagc caaaaaatct agactcacag atgtgacct aagagtgaag 300

ttcagcagga gcgacagcgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 360

ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggacct 420

gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 480

aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 540

aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 600

cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc 627

<210> 18

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 18

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro

20 25 30

Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His

100 105 110

Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly

130 135 140

Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr

195 200 205

Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
 210 215 220
 Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala

 225 230 235 240
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile
 260 265 270
 Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr
 275 280 285
 Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

 290 295 300
 Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly
 305 310 315 320
 Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
 325 330 335
 Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Lys Arg Gly
 340 345 350
 Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val

 355 360 365
 Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
 370 375 380
 Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 405 410 415
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg

 420 425 430
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 435 440 445
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu

145 150 155 160
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr

 165 170 175
 Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
 180 185 190
 Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
 195 200 205
 Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
 210 215 220
 Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala

 225 230 235 240
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met
 260 265 270
 Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr
 275 280 285
 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln

 290 295 300
 Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val
 325 330 335
 Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile
 340 345 350
 Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr

 355 360 365
 Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
 370 375 380
 Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys
 385 390 395 400

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 405 410 415
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 420 425 430
 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
 435 440 445
 Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
 450 455 460
 Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
 465 470 475 480
 Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp

485 490 495
 Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505

<210> 20

<211> 552

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 20

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
 1 5 10 15
 Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro
 20 25 30

Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
 35 40 45
 Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
 50 55 60
 Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
 65 70 75 80
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
 340 345 350

Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
 355 360 365

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
 370 375 380

Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg
 385 390 395 400

Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
 405 410 415

Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
 420 425 430

Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 435 440 445

Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 450 455 460

Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 465 470 475 480

Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 485 490 495

Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 500 505 510

Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 515 520 525

Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 530 535 540

His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 545 550

<210> 21

<211> 542

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 21

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro

20 25 30

Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His

100 105 110

Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

115 120 125

Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly

130 135 140

Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly

180 185 190

Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr

195 200 205

Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser

210 215 220

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Leu Gln Glu Ser
 130 135 140

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

Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 165 170 175

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 180 185 190

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 195 200 205

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 210 215 220

Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 245 250 255

Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe
 260 265 270

Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser
 290 295 300

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro
 305 310 315 320

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 325 330 335

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Val Lys Phe Ser
 340 345 350

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 355 360 365

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

Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
 370 375 380
 Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 385 390 395
 <210> 24
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polypeptide
 <400> 24
 Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

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

 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 85 90 95
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 100 105 110
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Ser Thr Ser Gly Ser
 115 120 125
 Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Leu Gln Glu Ser

 130 135 140
 Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
 165 170 175

Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
 180 185 190
 Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
 195 200 205
 Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
 210 215 220
 Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 245 250 255
 Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe
 260 265 270
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
 275 280 285
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser
 290 295 300
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro
 305 310 315 320
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 325 330 335
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 340 345 350
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 355 360 365
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 370 375 380
 Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 385 390 395 400
 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 405 410 415
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu

420 425 430
 Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

435 440 445
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

450 455 460
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

465 470 475 480
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

485 490 495
 Leu Pro Pro Arg

500

<210> 25

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 25

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15
 Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro

20 25 30
 Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe

35 40 45
 Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly

50 55 60
 Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly

65 70 75 80
 Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

85 90 95
 Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His

100 105 110
 Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Met Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Pro Pro Arg

<210> 26

<211> 1568

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 26

ggtgtcgtga gcgcccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60

caccgtggcc ttagcatca gcgagatcgt gctgaccag agccctggct ctctgctgt 120

gtctctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180

ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240

gatctactgg gccagcacca gaaaaagcgg cgtgccccgat agattaccg gcagcggctc 300

tggcaccgac ttcacctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360

ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aatcaagcg 420

gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480

gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540

caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agaccctgg 600

acaggcctg gaatgggtgg gaggatcta ccccgcaac gacgacatca gctacaacca 660

gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccacgc cctacatgca 720

gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780

gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctagcg ccctgagcaa 840

cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac 900

ccctgcccct agacctccta cccagcccc tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag 960

gcccaggct tctagaccag ctgctggcgg agccgtgcac accagaggcc tggatatcta 1020

catctgggcc cactggccg gcacctgtgg cgtgctgctg ctgtctctcg tgatcaccaa 1080

gagaggccgg aagaagctgc tgtacatctt caagcagccc ttcattgcgc ccgtgcagac 1140

caccaggaa gaggacggct gtagctgccg gttccccgag gaagaagaag ggggctgcga 1200

gctgagagtg aagttcagca gaagcggcga cggccctgcc taccagcagg gccagaacca 1260

gctgtacaac gagctgaacc tgggcagacg ggaagagtac gacgtgctgg acaagcggag 1320

aggcagggac cctgagatgg gcggcaagcc cagacggaag aacctcagg aaggcctgta 1380

taacgaactg cagaaagaca agatggcccga ggcctactcc gagatcggaa tgaagggcga 1440

gcggaagaaga ggcaagggcc acgatggact gtaccagggc ctgagcaccg ccaccaagga 1500

cacctatgac gcctgcaca tgcaggcctt gccccccaga tgaattcat cgacgttaac 1560

tattctag 1568

<210> 27

<211> 1586

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 27

ggtgtcgtga gggcgcgtg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60

caccgtggcc ttagcatca gcgagatcgt gctgaccag agccctggct ctctggctgt 120

gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180

ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240

gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300

tggcaccgac ttcacctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360

ctgccaccag tacttgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aatcaagcg 420

gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agaccctgg 600

acagggcctg gaatgggtgg gaggatctca ccccggaac gacgacatca gctacaacca 660
gaagtccag ggcaaggcca cctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctgccc tgagcaacag 840
catcatgtac ttcagccact tcgtgcccgt gtttctgccc gccaaagccta ccacaacccc 900
tgcccctaga cctcctacc cagcccctac aatcgccagc cagcctctgt ctctgaggcc 960
cgaggcttct agaccagctg ctggcggagc cgtgcacacc agaggactgg acaagcctt 1020

ctgggtgctg gtggctgtgg gcggagtgt ggctgttac agcctgctcg tgacagtggc 1080
cttcatcacc ttttgggtgc gcagcaagcg gtctagactg ctgcacagcg actacatgaa 1140
catgaccccc agaaggccag gccccaccg gaagcactat cagccttacg cccctcccag 1200
agacttgcgc gctaccggt ccagagtgaa gttcagcaga agcggccagc cccctgcta 1260
tcagcagggc cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg gccagacggg aagagtacga 1320
cgtgctggac aagagaagag gccgggacc tgagatgggc ggcaagcca gacggaagaa 1380
ccctcaggaa ggctgtata acgaactgca gaaagacaag atggccgagg cctactccga 1440

gatcggcatg aagggcgaac ggcggagagg caaggacac gatggactgt accaggcct 1500
gagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc cctgcacatg caggccctgc ccccagatg 1560
aaattcatcg acgttaacta ttctag 1586

<210> 28
<211> 1715
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polynucleotide
<400> 28

ggtgtcgtga ggcggcctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgtctgg 60
caccgtggcc tgiagcatca gcgagatcgt gctgaccagc agccctggct ctctggctgt 120
gtctctctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180

ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240
gatctactgg gccagacca gagaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300

tggcaccgac ttaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360
 ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aatcaagcg 420
 gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
 gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
 caaggccagc ggctacacct tcaccageta ctacatccac tggatcaagc agaccctgg 600

 acaggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccggcaac gacgacatca getacaacca 660
 gaagtccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
 gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
 gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctagcg ccctgagcaa 840
 cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac 900
 ccctgcccc agacctcta cccagcccc tacaatgcc agccagcctc tgtctctgag 960
 gccccaggct tctagaccag ctgctggcgg agccgtgcac accagaggac tggacaagcc 1020

 cttctgggtg ctggtggtcg tgggaggagt gctggcctgt tacagcctgc tcgtgacagt 1080
 ggccctcate atcttttggg tgcgcagcaa gcggtctaga ctgctgcaca gcgactacat 1140
 gaacatgacc cccagaaggc caggccccac ccggaagcac tatcagcctt acgcccctcc 1200
 cagagacttc gccgcctaca gatccaagag aggccggaag aagctgctgt acatcttcaa 1260
 gcagcccttc atgcccggc tgcagaccac ccaggaagag gacggctgta gctgccggtt 1320
 cccccaggaa gaagaagggg gctgcgagct gagagtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc 1380
 ccctgcctat cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaaacctgg gcagacggga 1440

 agagtacgac gtgctggaca agagaagagg ccgggacctt gagatgggcg gcaagcccag 1500
 acggaagaac cctcaggaag gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc 1560
 ctactccgag atcggaatga agggcgagcg gcggagaggc aaggacacg atggactgta 1620
 ccaggcctg agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc 1680
 cccagatga aattcatga cgttaactat tctag 1715

 <210> 29
 <211> 1436
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polynucleotide
 <400> 29
 ggtgtcgtga gcgcccctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60

caccgtggcc tgcagcatca gcatccagat gaccagacc accagcagcc tgagcgccag 120
cctggcgcat agagtgacca tcagctgcag agccagccag gacatcagca agtacctgaa 180
ctggtatcag cagaaacccg acggcacctg gaagctgctg atctaccaca ccagcagact 240
gcacagcggc gtgccctcta gattttccgg cagcggctcc ggcaccgact acagcctgac 300
catctccaac ctggaacagg aagatategc tacctacttc tgtcagcaag gcaacacct 360
gccttacacc ttcggcggag gcaccaagct ggaatcggc agcacaagcg gctctggcaa 420
gcctggatct ggcgagggt ctaccaaggg cctgcaggaa tctggccctg gactggtggc 480

ccctagccag agcctgtctg tgacctgtac cgtgtccggc gtgtccctgc ctgactatgg 540
cgtgtcctgg atcagacagc cccccagaaa gggcctggaa tggctgggag tgatctgggg 600
cagcgagaca acctactaca acagcgcct gaagtcccg ctgacatca tcaaggacia 660
ctccaagagc caggtgttcc tgaagatgaa cagcctgcag accgacgaca ccgcatcta 720
ctactgcgc aagcactact actacggcgg cagctacgcc atggactact ggggccaggg 780
cacaagcgtg accgtgtctg ccctgagcaa cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc 840
cgtgtttctg cccgccaage ctaccacaac cctgcccct agacctccta cccagcccc 900

tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag gcccagggt tctagaccag ctgctggcgg 960
agccgtgcac accagaggac tggacaagcc ctctctgggtg ctggtggtcg tggcggagt 1020
gtggcctgt tatagcctgc tcgtgacagt ggccttcate atcttttggg tgcgctgaa 1080
gttcagccgc agcgcgatg cccctgccta tcagcaggga cagaaccagc tgtacaacga 1140
gctgaacctg ggcagacggg aagagtacga cgtgctggac aagagaagag gccgggacct 1200
tgagatgggc ggcaagccca gaagaaagaa cccccaggaa ggcctgtata acgaactgca 1260
gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcggcatg aaggcgaac ggcgagagg 1320

caaggccac gatggaactg atcaggcct gagcaccgcc accaaggaca cetatgacgc 1380
cctgcacatg caggctctgc cccctcgtg aaattcatcg acgttaacta ttctag 1436

<210> 30
<211> 1253
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic polynucleotide
<400> 30

ggtgtcgtga gcgccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgiagcatca gcgagatcgt gctgaccag agccctggct ctctggctgt 120
gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180

ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240

gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300

tggcaccgac ttcacctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360

ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aatcaagcg 420

gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480

gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540

caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agaccctgg 600

acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta cccggcaac gacgacatca gctacaacca 660

gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720

gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780

gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctagcg ccctgagcaa 840

cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac 900

ccctgcccct agacctccta cccagcccc tacaatgcc agccagcctc tgtctctgag 960

gccccaggct tctagaccag ctgctggcgg agccgtgcac accagaggac tggacaagcc 1020

cttctgggtg ctggtggtcg tgggcggagt gctggcctgt tacagcctgc tcgtgacagt 1080

ggccttcate atcttttggg tgcgcagcaa gcggtctaga ctgctgcaca gcgactacat 1140

gaacatgacc cccagaagcg caggccccac ccggaagcac tatcagcctt acgcccctcc 1200

cagagacttc gccgcctaca gaagctgaaa ttcacagcag ttaactattc tag 1253

<210> 31

<211> 1559

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 31

ggtgtcgtga gggcgcctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60

caccgtggcc tgcagcatca gcatccagat gaccagacc accagcagcc tgagcgcag 120

cctggcgcat agagtgacca tcagctgcag agccagccag gacatcagca agtacctgaa 180

ctggtatcag cagaaaccgg acggcaccgt gaagctgctg atctaccaca ccagcagact 240

gcacagcggc gtgccctcta gattttccgg cagcggctcc ggcaccgact acagcctgac 300

catctccaac ctggaacagg aagatategc tacctaacttc tgtcagcaag gcaaacacct 360

gccctacacc ttcggcggag gcaccaagct ggaaatcggc agcacaagcg gctctggcaa 420

gcctggatct ggcgaggct ctaccaagg cctgcaggaa tctggccctg gactggtggc 480
 ccctagccag agcctgtctg tgacctgtac cgtgtccggc gtgtccctgc ctgactatgg 540
 cgtgtcctgg atcagacagc cccccagaaa gggcctggaa tggctgggag tgatctgggg 600

cagcgagaca acctactaca acagcgcct gaagtcccgg ctgacatca tcaaggacaa 660
 ctccaagagc caggtgttcc tgaagatgaa cagcctgcag accgacgaca ccgcatcta 720
 ctactgcgcc aagcactact actacggcgg cagctacgcc atggactact ggggccaggg 780
 cacaagcgtg accgtgtctg ccctgagcaa cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc 840
 cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac cctgcccct agacctcta cccagcccc 900
 tacaatgcc agccagcctc tgttctgag gcccgaggct tctagaccag ctgctggcgg 960
 agccgtgcac accagaggac tggacaagcc cttctgggtg ctggtggtcg tggcggagt 1020

gctggcctgt tatagcctgc tcgtgacagt ggccttcac atcttttggg tgccgagcaa 1080
 gcggagccgg ctgtgcact ccgactacat gaacatgacc cccagacggc caggcccccac 1140
 ccggaaacac tatcagcctt acgcccctcc cagagacttc gccgctacc ggtccagagt 1200
 gaagttcage agatccgcc acgcccctgc ctatcagcag ggacagaacc agctgtacaa 1260
 cgagctgaac ctgggcagac gggaagagta cgacgtgctg gacaagagaa gaggccggga 1320
 ccctgagatg ggcggcaagc ccagaagaaa gaacccccag gaaggcctgt ataacgaact 1380
 gcagaaaagc aagatggccg aggcctacag cgagatcggc atgaaggcg aacggcggag 1440

aggcaagggc cacgatggac tgtatcagg cctgagcacc gccaccaagg acacctatga 1500
 cgccctgcac atgcagctc tgccccctcg ctgaaattca tcgacgttaa ctattctag 1559

<210> 32
 <211> 1514
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polynucleotide
 <400> 32

ggtgtcgtga gcggccctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
 caccgtggcc tgtagatca gcgagatcgt gctgaccag agccctggct ctctggctgt 120
 gtctctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagacgtgt tcttcagcag 180
 ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatccc gccagagcc ccagactgct 240

gatctactgg gccagacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300
 tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360

ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aatcaagcg 420
 gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
 gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
 caaggccagc ggctacacct tcaccagctt ctacatccac tggatcaagc agaccctgg 600
 acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccgcaac gacgacatca gctacaacca 660

gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
 gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
 gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtccagca tcgaagtgat 840
 gtacccccct ccctacctgg acaacgagaa gtccaacggc accatcatcc acgtgaaggg 900
 caagcacctg tgccccagcc ctctgtttcc tggccctagc aagcccttct ggggtgctggt 960
 ggtcgtgggc ggagtgtgg cctgttacag cctgctcgtg acagtggcct tcatcatctt 1020
 ttgggtgctg agcaagcggc ctagactgct gcacagcgac tacatgaaca tgacccccag 1080

aaggccagge cccaccgga agcactatca gccttacgcc cctcccagag acttcgccgc 1140
 ctaccggtcc agagtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctatc agcagggcca 1200
 gaaccagctg tacaacgagc tgaacctggg cagacgggaa gactacgacg tgctggacaa 1260
 gcggagagge agggaccctg agatgggcgg caagcccaga cggaagaacc ctgaggaagg 1320
 cctgtataac gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tactccgaga tcggeatgaa 1380
 gggcgagcgg agaagagcca agggccacga tggactgtac caggcctga gcaccgccac 1440
 caaggacacc tatgacgcc tgcacatgca ggcctgccc cccagatgaa attcatcgac 1500

gtaactatt ctag 1514

<210> 33
 <211> 850
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic polynucleotide
 <400> 33

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catggacatg agggtcctg ctgagctcct 60
 ggggtcctg ctgctctggc tctcaggtgc cagatgtgag atcgtgctga cccagagccc 120
 cggcagcctg gccgtgagcc ccggcaagag ggtgacatg agctgcaaga gcagccagag 180
 cgtgttcttc agcagcagcc agaagaacta cctggcctgg taccagcaga tccccggcca 240
 gagccccagg ctgctgatct actgggccag caccagggag agcggcgtgc ccgacaggtt 300

caccggcagc ggcagcggca gcggcaccga cttcacctg accatcagca gcgtgcagcc 360
 cgaggacctg gccatctact actgccacca gtacctgagc agcaggacct tcggccaggg 420
 caccaagctg gagatcaaga ggggcagcac cagcggcagc ggcaagcccg gcagcggcga 480
 gggcagcacc aagggccagg tgcagctgca gcagcccggc gccgaggtgg tgaagcccgg 540
 cgccagcgtg aagatgagct gcaaggccag cggctacacc ttaccagct actacatcca 600
 ctggatcaag cagacccccg gccagggcct ggagtgggtg ggctgatct accccggcaa 660
 cgacgacatc agctacaacc agaagttcca gggcaaggcc accctgaccg cgcacaagag 720

cagcaccacc gcctacatgc agctgagcag cctgaccagc gaggacagcg ccgtgtacta 780
 ctgcgccagg gaggtgaggc tgaggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccaccgtgac 840
 cgtgagcagc 850

<210> 34

<211> 695

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 34

gcggccgcaa ttgaagttat gtatcctcct ccttacctag acaatgagaa gagcaatgga 60
 accattatcc atgtgaaagg gaaacacctt tgcceaagtc ccctatttcc cggaccttct 120
 aagccctttt gggctgctgt ggtggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta 180

acagtggcct ttattatfff ctgggtgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac 240
 tacatgaaca tgactccccg cggccccggg cccaccgca agcattacca gcctatgcc 300
 ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgtcct agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 360
 cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 420
 gagtacgatg ttttggacaa gagactggc cgggacctg agatgggggg aaagccgaga 480
 aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc 540
 tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 600

cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgcc ttacatgca ggcctgccc 660
 cctcgetaac gcccctctcc ctccccccc cctaa 695

<210> 35

<211> 641

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 35

gcggccgcac tatcaatfff tgatcctcct ccttttaag taactcttac aggaggatat 60
 ttgcatatff atgaatcaca actfftgttgc cagctgaagt tctggttacc cataggatgt 120
 gcagcctffg ttgtagtctg cattfftgga tgcatactta tffgttgct tacaaaaag 180
 aagtatfcac ccagtgtgca cgaccctaac ggtgaataca tgttcacgag agcagtgaa 240

 acagccaaaa aatctagact cacagatgtg accctaagag tgaagttcag caggagcgca 300
 gacgccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga 360
 agagaggagt acgatgffff ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag 420
 ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg 480
 gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc 540
 ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccctca catgcaggcc 600
 ctgccccctc gctaacgccc ctctccctcc cccccctca a 641

<210> 36

<211> 665

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polynucleotide

<400> 36

gcggccgcaa ttgaagttat gtatcctcct cttacctag acaatgagaa gagcaatgga 60
 accattatcc atgtgaaagg gaaacacctt tgtccaagtc ccctatttcc cggaccttct 120
 aagccctfff ggggtgctgtt ggtggttggg ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta 180
 acagtgccct ttattatfff ctgggtgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac 240
 tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 300
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggccca gaaccagctc 360

 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg tfftgacaa gagacgtggc 420
 cgggacctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 480
 gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 540
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 600
 tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgtctaac gccctctcc ctccccccc 660
 cctaa 665

<210> 37

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 37
 ccctcgtttc cccacagggg ccttgctat gg 32
 <210> 38
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 gggagcaaag ggtgtcccc gggaccgata cc 32
 <210> 39
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 cccacaggg gccttg 17
 <210> 40
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 tcaccttctc ccaccgtgtg agtgctggtg ga 32

 <210> 41
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 agtgaagag ggtggcacac tcagaccac ct 32
 <210> 42
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 42
 gggcttttct ccccaaacga ggg 23
 <210> 43
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 43
 agggctttgt ggggaaacga gg 22

 <210> 44
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 44
 ccccgcgggg gccctggcta tgg 23
 <210> 45
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 45
 agcgctcgca cggtagggaga agg 23
 <210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 46
 atcttacctt gtgtccgga ggg 23

 <210> 47
 <211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Oligonucleotide

<400> 47

gtggtacctg ctggctgagg agg

23