(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0126707
(43) 공개일자 2023년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7020742
(22) 출원일자(국제) 2021년12월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/065813
(87) 국제공개번호 WO 2022/147347
국제공개일자 2022년07월07일
(30) 우선권주장
63/132,852 2020년12월31일 미국(US)

(71) 출원인
보르 바이오파마 인크.
미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 케임브리지 파크 드라이브 100 스위트 400
(72) 발명자
팩, 엘리자베스
미국 02140 매사추세츠 케임브리지 케임브리지파크 드라이브 100 스위트 400
팔라, 알레잔드라
미국 02140 매사추세츠 케임브리지 케임브리지파크 드라이브 100 스위트 400
차크라보티, 티르타
미국 02140 매사추세츠 케임브리지 케임브리지파크 드라이브 100 스위트 400
(74) 대리인
양영준, 이상남

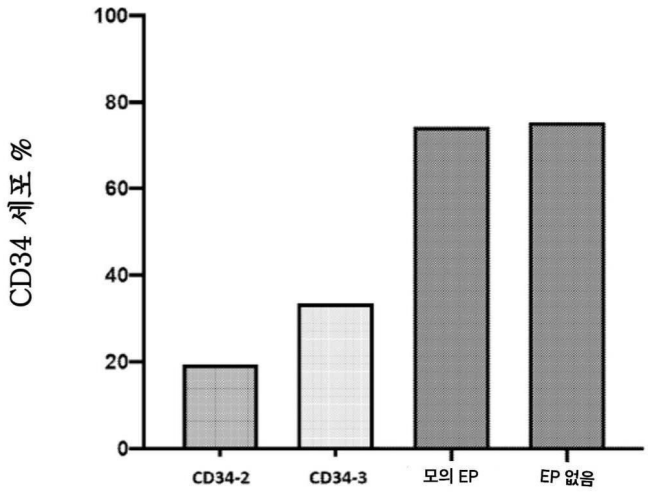
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **CD34 유전자 변형을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

CD34를 표적으로 하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA로서, 예를 들어 세포를 변형시키는 데 사용될 수 있는 gRNA가 본원에 제공된다. 또한, CD34 유전자에 변형(*예:* 삽입 또는 결실)을 갖는 유전적으로 조작된 세포의 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 이러한 유전적으로 조작된 세포를 대상체에게, 에컨대 조혈 악성 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/321 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD34를 암호화하는 변형된 유전자를 포함하는 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 2

제1항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 인델 돌연변이를 포함하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 엑손을 건너뛰도록 변형되는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자의 엑손 1, 엑손 2, 또는 엑손 3은 유전적으로 조작되는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 서열번호 11 내지 15 중 어느 하나에 의해 제공된 것과 같은 표적화 도메인을 포함하는 gRNA에 결합될 때, RNA 가이드 뉴클레아제에 의해 절단된 부위의 바로 근위에서의 삽입 또는 결실을 포함하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 이벤트에 의해 생성된 삽입 또는 결실을 포함하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 상동성-지시 복구(HDR) 이벤트에 의해 생성된 삽입 또는 결실을 포함하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, CD34의 발현은 CD34를 암호화하는 변형된 유전자를 보유하지 않는 야생형 대응 세포에 비해 감소되거나 제거되는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 9

제8항에 있어서, CD34의 발현은 CD34를 암호화하는 변형된 유전자를 보유하지 않는 야생형 대응 세포에서의 CD34의 발현 수준과 비교하여 25% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만, 0.01% 미만, 또는 0.001% 미만인, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 항-CD34 결합 도메인을 포함하는 제제에 대한 결합이 감소하거나 결합하지 않는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 유전적으로 조작되지 않은 조혈 세포의 집단과 비교하여 정상적으로 분화하는 능력을 보유하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 그의 후손에서 CD34의 기능 상실을 초래하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 계통 특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 변형된 유전자를 추가로 포함하는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 14

제13항에 있어서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 CD33, CD123, CLL-1, CD19, CD30, CD5, CD6, CD7, CD38, 또는 BCMA인, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적으로 하는 결합 도메인을 포함하는 제제에 대한 결합이 감소하거나 결합하지 않는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

청구항 16

1 내지 제15항 중 어느 한 항의 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, CD34를 표적으로 하는 적어도 하나의 제제의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하되, 상기 제제는 CD34에 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 제제는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 항체-약물 접합체 또는 면역 이펙터 세포인, 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 CD34를 발현하는 세포와 관련된 질환을 갖는, 방법.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 악성 세포 상에서 CD34의 발현과 관련이 있거나 이를 특징으로 하는 악성 종양을 가지고, 임의로 악성 세포는 암 줄기 세포인, 방법.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 조혈 악성 종양을 갖는, 방법.

청구항 22

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 자가면역 질환을 갖는, 방법.

청구항 23

표적화 도메인을 포함하는 gRNA로서, 표적화 도메인은 서열번호 11 내지 15로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, gRNA.

청구항 24

제23항에 있어서, gRNA는 제1 상보성 도메인, 연결 도메인, 상기 제1 상보성 도메인에 상보적인 제2 상보성 도메인, 및 근위 도메인을 포함하는, gRNA.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, gRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)인, gRNA.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, gRNA는 화학적으로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, gRNA.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, gRNA는 2'O-메틸 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, gRNA.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, gRNA는 포스포로티오에이트를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, gRNA.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, gRNA는 티오PACE 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함하는, gRNA.

청구항 30

유전적으로 조작된 세포를 생산하는 방법으로서,

a. 세포를 제공하는 단계, 및

b. 세포를 (i) 제23항 내지 제29항 중 어느 한 항의 gRNA 및 (ii) gRNA에 결합하는 RNA 가이드 뉴클레아제와 접촉시켜, (i)의 gRNA가 (ii)의 RNA 가이드 뉴클레아제와 리보핵산 단백질 (RNP) 복합체를 형성하고/하거나 유지하고; RNP 복합체가 세포의 게놈 내 표적 도메인에 결합하는 데 적합한 조건하에, RNP 복합체를 형성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, RNA 가이드 뉴클레아제는 CRISPR/Cas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제인, 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 spCas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 saCas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제인, 방법.

청구항 36

제30항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 접촉시키는 단계는 (i) 및 (ii)를 미리 형성된 리보핵산 단백질 (RNP) 복합체의 형태로 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제30항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 접촉시키는 단계는 (i) 및/또는 (ii)를 (i)의 gRNA 및/또는 (ii)

의 RNA 가이드 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 형태로 세포 내에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, (i)의 gRNA 및/또는 (ii)의 RNA 가이드 뉴클레아제를 암호화하는 핵산은 RNA, 바람직하게는 mRNA 또는 mRNA 유사체인, 방법.

청구항 39

제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 리보핵산 단백질 복합체는 전기천공을 통해 세포 내로 도입되는, 방법.

청구항 40

제30항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 조혈 세포인, 방법.

청구항 41

제30항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 조혈 줄기 세포인, 방법.

청구항 42

제30항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 조혈 전구 세포인, 방법.

청구항 43

제30항 내지 제39항에 있어서, 세포는 면역 이펙터 세포인, 방법.

청구항 44

제30항 내지 제39항 또는 제43항에 있어서, 세포는 림프구인, 방법.

청구항 45

제30항 내지 제39항, 제43항, 또는 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 T-림프구인, 방법.

청구항 46

유전적으로 조작된 세포로서, 세포는 제30항 내지 제45항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되거나 수득될 수 있는, 유전적으로 조작된 세포.

청구항 47

제1항 내지 제15항 또는 제46항 중 어느 한 항의 유전적으로 조작된 세포를 포함하는 세포 집단.

청구항 48

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손, 제46항의 유전적으로 조작된 세포, 또는 제47항의 세포 집단을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 49

유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포로서, CD34를 암호화하는 유전자에서의 변형을 포함하되, 자연 발생 CD34 단백질을 발현하지 않고, CD34를 발현하는 자연 발생 조혈 줄기 세포와 기능적으로 구별할 수 없는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 50

제49항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 하나 이상의 조혈 줄기 세포 마커를 발현하는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD49c, CD71, CD90, CD117, CD135, CD201, CD228, CD243, CD292, CDw293, CD309, CD318, CD325, 및 CD349 중 하나 이상을 발현하는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 그의 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 항-CD34 항체에 의해 인식되는 CD34 에피토프를 그의 세포 표면 상에서 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 54

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 그의 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 55

제49항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 그의 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않고 CD49c, CD71, CD90, 및 CD201 중 하나 이상을 발현하는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 56

제49항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 그의 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않고 CD49c, CD90, 및 CD201 중 하나 이상을 발현하는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 57

제49항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 분화된 조혈 세포(lin-)의 계통 특이적 표면 마커 특성을 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 58

제49항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, 또는 CD235a, 또는 이들의 임의의 조합을 발현하지 않는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 59

제49항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 인간 수용자에게 장기간 생착될 수 있는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 60

제49항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 생착 후 인간 수용자에서 조혈계를 재구성할 수 있는, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포.

청구항 61

제1항 내지 제9항 또는 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 CD34 에피토프가 결여되거나 변형된 CD34 에피토프를 갖는, 조혈 세포 또는 이의 후손.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. 119(e) 하에 2020년 12월 31일에 출원된 미국 가출원 제63/132,852호의 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배 경 기 술

[0003] 대상체에게 질환 또는 병태와 관련된 항원을 표적으로 하는 면역요법, 예를 들어, 항암 CAR-T 요법이 투여되는 경우, 상기 요법은 표적화하고자 하는 병리학적 세포를 고갈시킬 뿐만 아니라 표적화된 항원을 발현할 수 있는 비병리학적 세포도 고갈시킬 수 있다. 이러한 "온-타겟(on-target), 오프-질병(off-disease)" 효과가 일부 CAR-T 치료제, 예를 들어 CD19 또는 CD33을 표적으로 하는 치료제에 대해 보고된 적이 있다. 표적 항원이 대상체의 생존에 필요한 세포의 표면에서 발현되거나, 그 고갈이 대상체의 건강에 심각한 해를 끼치는 세포의 표면에서 발현되는 경우, 대상체는 면역요법을 받을 수 없거나, 이러한 요법이 투여되면 중증 부작용을 겪을 수 있다.

발명의 내용

[0004] 본 개시의 양태는 특이적 항원을 표적으로 하는 림프구 이펙터 세포, 예컨대 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포를 포함하는 면역치료를 필요로 하는 대상체에서, 이러한 면역치료 접근법의 유해한 온-타겟 효과, 오프-질병 효과를 해결하는 조성물, 방법, 전략 및 치료 방법을 기술한다. 본 개시는, (예를 들어, CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포와 같은 CD34를 표적으로 하는 림프구 이펙터 세포를 포함하는) 면역치료 접근법을 사용하여 대상체에서 줄기 세포(예를 들어, CD34 발현 조혈 줄기 세포(HSC))의 집단을 감소(예를 들어, 고갈)시키는 조성물, 방법, 전략, 및 치료 방법에 부분적으로 관한 것이다. 일부 양태에서, 이러한 조성물, 방법, 전략, 및 치료 방법은 CD34를 발현하지 않거나, (예: 야생형 세포에 비해) 감소된 수준의 CD34를 발현하거나, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하는 유전적으로 조작된 세포(예: 유전적으로 조작된 줄기 세포, HSC 등)로 세포 집단(예: 조혈 세포, 조혈 줄기 세포(HSC) 등)을 대체 또는 보충한다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, CD34를 발현하지 않거나, (예를 들어, 야생형 세포에 비해) 감소된 수준의 CD34를 발현하거나, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하는 유전적으로 조작된 세포(예: 유전적으로 조작된 줄기 세포, HSC)는 CD34를 표적으로 하는 면역치료 접근법에 의한 사멸을 회피하는 것으로 생각되며, 따라서 표적(예: 악성) 세포 집단을 대체할 수 있는 건강한 세포 집단(예: 줄기 세포 집단)을 이를 필요로 하는 대상체에게 제공한다. 일부 구현예에서, 예를 들어, CD34를 표적으로 하는 림프구 이펙터 세포(예: CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포) 및 CD34를 발현하지 않거나, (예를 들어, 야생형 세포에 비해) 감소된 수준의 CD34를 발현하거나, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하는 유전적으로 조작된 세포(예: 유전적으로 조작된 줄기 세포, HSC)를 포함하는 면역치료학적 접근법은, 이를 필요로 하는 대상체에게 병용 요법으로 투여된다.

[0005] 따라서, 본 개시의 양태는 CD34를 암호화하는 변형된 유전자를 포함하는 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손을 제공한다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 인델(INDEL) 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 엑손을 건너뛰도록 변형된다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자의 엑손 1, 엑손 2, 또는 엑손 3은 유전적으로 조작된다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는, 서열번호 11 내지 15 중 어느 하나에 의해 제공된 것과 같은 표적화 도메인을 포함하는 gRNA에 결합될 때, RNA 가이드 뉴클레아제에 의해 절단된 부위의 바로 근위에서 삽입 또는 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 이벤트에 의해 또는 상동성-표적 복구(HDR) 이벤트에 의해 생성된 삽입 또는 결실을 포함한다.

[0006] 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 유전자의 변형은 CD34의 발현을 변경시키고/시키거나 조혈 세포 또는 이의 후손의 특성을 변경시킨다. 일부 구현예에서, CD34의 발현은 CD34를 암호화하는 변형된 유전자를 보유하지 않는 야생형 대응 세포에 비해 감소되거나 제거된다. 일부 구현예에서, CD34의 발현은 CD34를 암호화하는 변형된 유전자를 보유하지 않는 야생형 대응 세포에서의 CD34의 발현 수준과 비교하여 25% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만, 0.01% 미만, 또는 0.001% 미만이다. 일부 구현예에서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 항-CD34 결합 도메인을 포함하는 제제에 대한 결합을 감소시키거나 전혀 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 유전적으로 조작되지 않은 조혈 세포의 집단과 비교하여 정상적으로 분화하는 능력을 보유한다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 변형된 유전자는 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손에서 CD34의 기능 상실을 초래한다.

[0007] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손은 계통 특이적 세포 표면 항원을 암호화하는 변형된 유전자를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 림프구 특이적 세포 표면 항

원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 골수 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 조혈 줄기 세포 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 조혈 줄기 또는 전구-특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 T 세포 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 B 세포 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 NK 세포 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 호염기구 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 호산구 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 호중구 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 단핵구 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 적혈구 특이적 세포 표면 항원이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 CD33, CD123, CLL-1, CD19, CD30, CD5, CD6, CD7, CD38, 또는 BCMA이다. 일부 구현예에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 악성 세포의 표면에서 발현된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손은 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적으로 하는 결합 도메인을 포함하는 제제에 대한 결합이 감소하거나 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 조혈 세포 또는 이의 후손은 CD34 에피토프가 결여되거나 변형된 CD34 에피토프를 갖는다.

[0008] 본 개시의 양태는 표 1 및 2에 기술된 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 가이드 RNA(gRNA)를 제공한다. 일부 양태에서, gRNA는 표적화 도메인을 포함하되, 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 15 중 어느 하나의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 제1 상보성 도메인, 연결 도메인, 제1 상보성 도메인에 상보적인 제2 상보성 도메인, 및 근위 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다.

[0009] 일부 구현예에서, gRNA는 화학적으로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'O-메틸 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 포스포로티오에이트를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 티오PACE 모이어티를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다.

[0010] 본 개시의 양태는 유전적으로 조작된 세포를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 세포를 제공하는 단계, 및 세포를 (i) 본원에 기술된 임의의 gRNA 및 (ii) gRNA에 결합하는 RNA 가이드 뉴클레아제와 접촉시켜, (i)의 gRNA가 (ii)의 RNA 가이드 뉴클레아제와 리보핵산 단백질 (RNP) 복합체를 형성하고/하거나 유지하고 RNP 복합체가 세포의 게놈 내 표적 도메인에 결합하는 데 적합한 조건 하에, RNP 복합체를 형성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 접촉시키는 단계는 (i) 및 (ii)를 미리 형성된 리보뉴클레오단백질(RNP) 복합체의 형태로 세포 내에 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 접촉시키는 단계는 (i) 및/또는 (ii)를 (i)의 gRNA 및/또는 (ii)의 RNA 가이드 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 형태로 세포에 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, (i)의 gRNA 및/또는 (ii)의 RNA 가이드 뉴클레아제를 암호화하는 핵산은 RNA, 바람직하게는 mRNA 또는 mRNA 유사체이다. 일부 구현예에서, 리보뉴클레오단백질 복합체는 전기천공을 통해 세포 내로 도입된다.

[0011] 일부 구현예에서, RNA 가이드 뉴클레아제는 CRISPR/Cas 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 spCas 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 saCas 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제이다.

[0012] 일부 구현예에서, 세포는 조혈 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 조혈 줄기세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 조혈 전구 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 이펙터 세포(immune effector cell)이다. 일부 구현예에서, 세포는 림프구이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 림프구이다.

[0013] 본 개시의 양태는 본원에 기술된 방법 중 어느 하나에 의해 수득된 유전적으로 조작된 세포를 제공한다. 본 개시의 양태는 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포를 포함하는 세포 집단을 제공한다.

[0014] 본 개시의 양태는 유전적으로 조작된 세포를 포함하는 세포 집단을 제공하며, 여기서 유전적으로 조작된 세포는 표 1 및 2 중 어느 하나에 기술된 바와 같은 표적화 도메인을 포함하는 gRNA에 결합될 때 RNA 가이드 뉴클레아제에 의해 절단된 부위의 바로 근위에서의 삽입 또는 결실로 이루어진 게놈 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 변형은 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 이벤트에 의해 생성된 삽입 또는 결실이다. 일부 구현예에서, 게놈 변형은 상동성-유도 복구(HDR) 이벤트에 의해 생성된 삽입 또는 결실이다. 일부 구현예에서, 게놈 변형은 이러한 게놈 변형을 보유하는 유전적으로 조작된 세포에서 CD34의 기능 상실을 초래한다. 일부 구현예에서, 게놈 변형은 CD34의 게놈 변형을 보유하지 않는 동일한 세포 유형의 야생형 세포에서의 CD34의 발현 수준과 비교하여, CD34의 발현을 25% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만, 0.01% 미만, 또는

0.001% 미만으로 감소시킨다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포는 조혈 줄기 또는 전구 세포이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포는 면역 이펙터 세포(immune effector cell)이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포는 T 림프구이다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD34를 표적으로 한다.

[0015] 본 개시의 양태는 본원에 기술된 임의의 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 조혈 세포 또는 이의 후손) 또는 본원에 기술된 세포 집단 중 임의의 것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 대상체는 조혈 악성 종양 진단을 받았거나 받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 CD34를 표적으로 하는 제제의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하되, 제제는 CD34에 결합하는 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 항체-약물 접합체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 면역 이펙터 세포이다. 일부 구현예에서, 대상체는 악성 세포에서 CD34의 발현을 수반하거나 이를 특징으로 하는 악성 종양을 갖는다. 일부 구현예에서, 악성 세포는 암 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 대상체는 조혈 악성 종양을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환을 갖는다.

[0016] 본 개시의 양태는 본원에 기술된 유전적으로 조작된 조혈 세포(예: 본원에 기술된 유전적으로 조작된 HSC)를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 CD34를 표적으로 하는 제제의 유효량, 예를 들어, CD34에 결합하는 항원 결합 단편, 항체-약물 접합체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 면역 이펙터 세포를 추가로 포함한다.

[0017] 본 개시의 양태는 CD34를 암호화하는 유전자에 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 자연적으로 발생하는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD34를 발현하는 자연적으로 발생하는 조혈 줄기 세포와 기능적으로 구별할 수 없다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 하나 이상의 조혈 줄기 세포 마커를 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD49c, CD71, CD90, CD117, CD135, CD201, CD228, CD243, CD292, CDw293, CD309, CD318, CD325, 및 CD349 중 하나 이상을 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 그 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 항-CD34 항체에 의해 인식되는 CD34 에피토프를 그 세포 표면 상에서 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 그 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD34를 그의 세포 표면 상에서 발현하지 않으며, CD71, CD90, CD201, 및 CD49c 중 하나 이상을 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 세포 표면에서 CD34를 발현하지 않으며, CD90, CD201, 및 CD49c 중 하나 이상을 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 분화된 조혈 세포(lin-)의 계통 특이적 표면 마커 특성을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, 또는 CD235a, 또는 이들의 임의의 조합을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 인간 수용자에게 장기간 생착될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 생착 후 인간 수용자에서 조혈계를 재구성할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 세포 표면에서 CD34를 발현하지 않고 CD90, CD201, 및 CD49c를 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD34를 그의 세포 표면 상에서 발현하지 않고, CD90, CD201, 및 CD49c 중 하나 이상을 발현하며, CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD45RA, CD56, CD123, 및 CD235a에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 CD34를 그의 세포 표면 상에서 발현하지 않고, CD90, CD201, 및 CD49c를 발현하며, CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD45RA, CD56, CD123, 및 CD235a에 대해 음성이다.

[0018] 상기 요약은, 비제한적인 방식으로, 본원에 개시된 기술의 일부 구현예, 장점, 특징 및 용도를 예시하기 위한 것이다. 본원에 개시된 기술의 다른 구현예, 장점, 특징 및 용도는 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] **도 1**은 인간 CD34의 2개의 스플라이스 변이체("CD34 CDS")의 암호화 영역을 보여주는 CD34 유전자의 개략도이다. 다수의 예시적인 Cas9 gRNA 표적 서열 및 CD34 유전자 내의 이들의 각각의 결합 부위는 패널의 하부에서 짧은 화살표로 표시되고, 명명된 gRNA CD34-1 내지 CD34-5 내의 위치는 패널의 중간에서 짧은 어두운 화살표로 표시된다.

도 2a 내지 2c는 CD34 유전자에 대해 본원에 기술된 예시적인 가이드 RNA의 위치를 보여주는 개략도를

나타낸다. **도 2a**는 CD34의 엑손 1을 암호화하는 핵산 서열에 대한, 본원에 기술된 예시적인 가이드 RNA의 위치를 보여주는 개략도이다. **도 2b**는 CD34의 엑손 2를 암호화하는 핵산 서열에 대해 상대적으로 본원에 기술된 예시적인 가이드 RNA의 위치를 보여주는 개략도이다. **도 2c**는 CD34의 엑손 3을 암호화하는 핵산 서열에 대해 상대적으로 본원에 기술된 예시적인 가이드 RNA의 위치를 보여주는 개략도이다.

도 3a~3d는 CD34 편집된 조혈 줄기 세포의 생존 및 편집 효율을 보여준다. **도 3a**는 실험의 워크플로우를 보여주는 개략도이다. CD34+ 세포를 해동하고 Cas9 단백질 및 본원에 기술된 예시적인 CD34 표적화 gRNA, 또는 CD5를 표적화하는 대조군 gRNA("Ctrl")로 전기천공한 다음, 시퀀싱에 의한 세포 생존력 및 편집 효율을 분석하였다. **도 3b**는 표시된 sgRNA 조건으로 전기천공 후 24시간 및 48시간에 측정된 평균 세포 수를 보여준다. **도 3c**는 표시된 sgRNA 조건으로 전기천공 후 24시간 및 48시간에 측정된 세포 생존력을 보여준다. **도 3d**는 시퀀싱 분석에 의해 결정된 CD34 유전자좌의 편집 효율을 보여준다.

도 4는 가이드 CD34-2로서 지칭되는 예시적인 CD34 표적화 gRNA로 편집된 HSC에 대한 인델(INDEL)(삽입(insertion)/결실(deletion)) 분포를 도시한다. X축은 인델의 크기를 나타내고, Y축은 혼합물 중 특정 인델의 백분율을 나타낸다.

도 5a 내지 5c는 CD34 편집된 공여자 조혈 줄기 세포의 생존 및 편집 효율을 보여준다. **도 5a**는 실험의 워크플로우를 보여주는 개략도이다. CD34+ 세포를 해동하고, 본원에 기술된 예시적인 CD34 표적화 gRNA 및 Cas9 단백질로 전기천공한 다음, 시퀀싱을 통해 세포 생존력 편집 효율을 분석하였다. **도 5b**는 표시된 gRNA 조건으로 전기천공 후 24시간 및 96시간에 측정된 평균 세포 수를 보여준다. **도 5c**는 표시된 gRNA 조건으로 전기천공 후 24시간 및 96시간에 측정된 세포 생존력을 보여준다.

도 6a 및 6b는 도 5A에 제시된 워크플로우에 따라 전기천공 후 96시간에 CD34 편집된 공여자 조혈 줄기 세포에서 CD34의 발현의 녹다운을 보여준다. **도 6a**는 항-CD34-PE 항체를 사용한 유세포 분석으로 표시된 예시적인 CD34 표적 gRNA를 사용하여 편집된 공여자 조혈 줄기 세포, 모의 편집된 세포("모의"), 및 전기천공되지 않은 세포("EP 없음")에서 CD34의 발현을 보여주는 플롯을 제시한다. X축은 항체 염색의 강도(항-CD34-PE 텍사스)를 나타내며, Y축은 세포 수에 상응한다. 도 6b는 유세포 분석에 의한 항-CD34-PE 항체의 상대적 강도에 따라 표시된 예시적인 CD34 표적 gRNA를 사용하여 편집된 기증자 조혈 줄기세포, 모의 편집 세포("모의") 및 전기천공되지 않은 세포("EP 없음")에서 CD34의 발현을 보여주는 플롯을 나타낸다.

도 7a 내지 7d는 전기천공 후 96시간 차에 CD34 편집된 공여자 조혈 줄기 세포의 유세포 분석 플롯을 나타낸다. **도 7a**는 편집되지 않은 세포의 대조군 집단을 보여준다. **도 7b**는 CD34 표적화 gRNA의 예시적인 가이드 CD34-2를 사용하여 편집된 공여자 조혈 줄기 세포를 보여준다. **도 7c**는 CD34 표적화 gRNA의 예시적인 가이드 CD34-3를 사용하여 편집된 공여자 조혈 줄기 세포를 보여준다. **도 7d**는 CD34 표적화 gRNA의 예시적인 가이드 CD34-5를 사용하여 편집된 공여자 조혈 줄기 세포를 보여준다. X축은 항-CD34 항체(항-CD34(PE Texas))의 결합에 기초한 CD34의 발현을 나타내고, Y축은 살아있는(live)/죽은(dead) 염색(L/D (APC Cy7))을 나타낸다.

도 8은 HSC에서 CD34를 표적으로 하는 대규모 편집 실험의 워크플로우를 도시하고 편집 후 48시간 및 168시간 차에 편집 효과를 측정하는 개략도이다. CD34+ 세포를 해동하고 Cas9 단백질 및 본원에 기술된 예시적인 CD34-표적 gRNA로 전기천공한 다음, 분석을 위해 전기천공 후 48시간 및 168시간 차에 세포를 수확하였다. 48시간 및 120시간 후에 배지를 변경하였다.

도 9a 및 9b는 도 8에 제시된 워크플로우에 따라 전기천공 후 48시간 차에 CD34 편집된 공여자 조혈 줄기 세포에서 CD34의 발현 녹다운을 보여준다. **도 9a**는 항-CD34-PE 항체를 사용한 유세포 분석으로 표시된 예시적인 CD34 표적 gRNA를 사용하여 편집된 공여자 조혈 줄기 세포, 모의 편집된 세포("모의"), 및 전기천공되지 않은 세포("EP 없음")에서 CD34의 발현을 보여주는 플롯을 제시한다. X축은 항체 염색의 강도(항-CD34-PE 텍사스)를 나타내며, Y축은 세포 수에 상응한다. **도 9b**는 유세포 분석에 의한 항-CD34-PE 항체의 상대적 강도에 따라 표시된 예시적인 CD34 표적 gRNA를 사용하여 편집된 기증자 조혈 줄기세포, 모의 편집 세포("모의") 및 전기천공되지 않은 세포("EP 없음")에서 CD34+ 세포의 백분율을 보여주는 플롯을 나타낸다.

도 10a 및 10b는 도 8에 제시된 워크플로우에 따라 전기천공 후 168시간 차에 CD34 편집된 공여자 조혈 줄기 세포에서 CD34의 발현의 녹다운을 보여준다. **도 10a**는 항-CD34-PE 항체를 사용한 유세포 분석으로 표시된 예시적인 CD34 표적 gRNA를 사용하여 편집된 공여자 조혈 줄기 세포, 모의 편집된 세포("모의"), 및 전기천공되지 않은 세포("EP 없음")에서 CD34의 발현을 보여주는 플롯을 제시한다. X축은 항체 염색의 강도(항-CD34-PE 텍사스)를 나타내며, Y축은 세포 수에 상응한다. **도 10b**는 유세포 분석에 의한 항-CD34-PE 항체의 상대적 강도에 따

라 표시된 예시적인 CD34 표적 gRNA를 사용하여 편집된 기증자 조혈 줄기세포, 모의 편집 세포("모의") 및 전기천공되지 않은 세포("EP 없음")에서 CD34+ 세포의 백분율을 보여주는 플롯을 나타낸다.

도 11a 내지 11q는 세포 계통 분화 및 콜로니 유전자형 분석에 대한 콜로니 형성 단위(CFU) 분석을 보여주는 차트, 그래프 및 표뿐만 아니라, 예시적인 가이드 RNA에 대한 인델 크기, 위치 및 대립유전자 분석을 보여주는 편집 빈도 분석을 보여준다. CFU-GEMM: 콜로니 형성 단위 - 과립구, 적혈구, 대식세포, 거핵세포; CFU-GM: 콜로니 형성 단위 - 과립구, 대식세포 ; CFU-E: 콜로니 형성 단위 - 적혈구; BFU-E: 파열 형성 단위 - 적혈구. **도 11a**는 CD34 편집된 HSC에서의 CFU 분석에 대한 실험적 접근법의 개요를 나타낸다. **도 11b 내지 11c**는 CD34 편집된 HSC의 CFU 분석 데이터를 나타내며, 2개 농도의 편집된 세포가 플레이팅되고 2개의 예시적인 CD34 표적 가이드 RNA 중 하나를 포함하는 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 편집한 후, CFU 분석에 사용한다: CD34-2(본원에서 가이드 2, g2 또는 sgCD34_2로도 지칭됨) 또는 CD34-3(본원에서 가이드 3, g3 또는 sgCD34_3으로도 지칭됨). **도 11d 및 11e**는 각각 CD34-2 및 CD34-3을 사용하여 조작된 다양한 HSC 파열 형성 단위(BFU) 및 콜로니 형성 단위(CFU)의 편집 효율 데이터를 나타낸다. **도 11f 및 11g**는 각각 CD34-2 및 CD34-3-편집된 HSC 콜로니에 대한 삽입/결실(INDEL) 위치 분포를 나타낸다. **도 11h 내지 11k**는 각각 CD34-2 또는 CD34-3을 사용한 HSC의 CD34 편집에 대한 대립유전자 분석을 보여준다. **도 11l 및 11m**은 각각, 히트 맵 형태의 CD34-2 및 CD34-3-편집 HSC 콜로니의 분석된 샘플에서 인델 분포를 보여준다. **도 11n 및 도 11o**는 각각 CD34-2 및 CD34-3으로 편집된 CD34 편집된 HSC의 인델 분포를 막대 그래프로 나타낸 것이다. **도 11p 및 도 11q**는 각각 **도 11n 및 도 11o**에 나타낸 분포 데이터에 상응하는 CD34-2 및 CD34-3으로 편집된 HSC에서 우세한 인델 종의 핵산 서열 변화, 아미노산 서열 변화, 빈도 및 단백질 결과를 나타낸다.

도 12a 내지 12w는 3개의 상이한 공여자 유래의 HSC 샘플에서의 CD34 편집 시간 경과 데이터의 그래프를 보여준다. **도 12a 내지 12c**는 CD34 HSC의 3개의 공여자 집단(각각 공여자 1, 공여자 2, 및 공여자 3)에 대한 전기천공 후 0, 24, 48, 120, 168, 및 216시간에 걸친 생존 데이터를 보여준다. **도 12d 내지 12i**는 전기천공을 거치지 않았거나 대조군 (CTRL) gRNA로 전기천공된 대조군 공여자 HSC 샘플에 비해 인델의 우성 종에 대한 인델% 로 나타낸 바와 같이 전기천공 후 다양한 시점에서 HSC의 편집 효율에 대한 TIDE 분석을 나타내고; **도 12d 내지 12e**는 공여자 1 HSC의 편집 데이터를 나타내고, **도 12f 내지 12g는** 공여자 2 HSC의 편집 데이터, 및 **도 12h 내지 12i**는 기증자 3 HSC의 편집 데이터를 나타낸다. **도 12j 내지 12v**는 표시된 시점에 편집된 HSC에서 CD34 단백질의 표면 발현에 대한 유세포 분석 그래프를 도시하고; **도 12j 내지 12n**은 공여자 1 HSC의 편집 데이터를 도시하고, **도 12o 내지 12s**는 공여자 2 HSC의 편집 데이터를 도시하고, **도 12t 내지 12v**는 공여자 3 HSC의 편집 데이터를 보여준다. **도 12w**는 예시적인 가이드 CD34-2 또는 CD34-3을 사용하여 편집된 2개의 공여자 HSC 샘플(공여자 1 및 공여자 2)에 대한 시간 경과에 따른 CD34+ 세포의 평균 백분율을 나타낸 그래프이며; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 13a 내지 13l은 CD34 편집된 인간 조혈 줄기 세포(HSC)의 골수 *시험관 내* 분화(IVD)를 평가하는 그래프를 보여준다. **도 13a**는 CD34 편집된 HSC의 IVD 패턴을 특성화하기 위해 취해진 실험적 접근법을 보여준다. **도 13b**는 CD34-2 또는 CD34-3을 사용해 IVD 전에 편집된 공여자 2 HSC로부터 전기천공 후 48시간 차에 및 IVD 전에 단리된 PCR-증폭 게놈 DNA의 겔 전기영동 분석을 보여준다. **도 13c 및 13d**는 각각 전기천공 후 48시간 및 IVD 전에 CD34-2 및 CD34-3을 사용해 편집된 공여자 2 HSC에서의 인델%의 TIDE 분석을 보여준다. **도 13e 내지 13f**는 IVD 조건에서 전기천공 후 0일, 2일 또는 9일에 편집된 HSC에서 CD34 단백질의 표면 발현을 CD34 기하 평균 형광 강도(도 13E) 및 % CD34 양성 세포(도 13F)에서 측정한 유세포 분석을 보여준다. **도 13g 내지 13i**는 IVD 조건에서 전기천공 후 0, 2 또는 9일차에 편집된 HSC에서 세포 분화 마커(단핵구성 마커 CD11b, CD14, 과립구성 마커 CD15 각각)의 표면 발현을 표면 마커 양성 세포의 %로 표시한 유세포 분석을 보여준다. **도 13j 내지 13l**은 IVD 조건에서 전기천공 후 0일, 2일 또는 9일차에 편집된 HSC에서 세포 분화 마커의 표면 발현을 표면 마커 기하학적 평균 형광 강도로 표시한 유세포 분석을 보여준다.

도 14a 내지 14b는 CD34 편집된 마우스 모델의 *생체 내* 특성을 보여준다. **도 14a**는 NGS 마우스 모델에서 CD34 편집된 HSC의 *생체 내 특성화*를 위한 실험적 접근법을 보여준다. 상이한 시점에서의 판독은, 예를 들어, 수득된 세포의 면역표현형을 포함한다. **도 14b**는 편집된 세포를 마우스의 혈액 및 골수 내로 생착시킨 후 NGS 마우스 모델에서 CD34 편집된 HSC를 특성화하는 예시적인 관찰을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 개시의 일부 양태는, 치료제, 예를 들어, 면역치료제에 의해 표적화된 항원의 발현이 결핍된 유전적으로 변형된 세포, 예를 들어, 조혈 세포와 관련된 조성물, 방법, 전략, 및 치료 방법을 제공한다. 본원에 제공된 유전

적으로 변형된 세포는, 예를 들어, 특정 면역치료제와 연관된, 임의의 표적, 질환 외 세포독성과 같은, 임의의 원하지 않는 효과를 완화시키거나 완전히 피하는 데 유용하다.

[0021] 특정 면역치료제와 관련된 이러한 바람직하지 않은 효과는, 예를 들어, 면역치료 개입을 필요로 하는 대상체 내의 건강한 세포가 면역치료제에 의해 표적화된 항원을 발현할 때 발생할 수 있다. 예를 들어, 대상체는 건강한 세포에서 일반적으로 발현되지 않는 특이적 항원의 발현 수준 상승과 연관된 악성 종양으로 진단될 수 있지만, 항원은 대상체 내의 비-악성 세포의 하위 집합에서 상대적으로 낮은 수준으로 발현될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 대상체는 CD34와 같은 특이적 항원을 발현하는 세포를 절제해야 할 수 있다. 면역치료제, 예를 들어, 항원을 표적으로 하는 CAR-T 세포 치료제 또는 치료 항체 또는 항체-약물-접합체(ADC)를 대상체에게 투여하는 것은 표적 세포의 효율적인 사멸을 초래할 수 있지만, 대상체에서 항원을 발현하는 비-표적 세포가 절제될 수도 있다. 이러한 온-타겟(on-target), 오프-질병(off-disease) 세포 독성은 심각한 부작용을 초래할 수 있고, 경우에 따라 면역치료제의 사용을 완전히 중단할 수 있다.

[0022] 본원에서 제공된 조성물, 방법, 전략 및 치료 방법은 특정 면역치료제의 온-타겟(on-target), 오프-질병(off-disease) 세포 독성의 문제를 해결한다. 본원에서 제공된 조성물, 방법, 전략 및 치료 방법은 또한 방사선 조사와 같은 CD34를 발현하는 세포 집단을 절제하는 종래의 방법에 대한 대안을 제공한다. 예를 들어, 본 개시의 일부 양태는 면역치료제에 의해 표적화된 항원의 발현 결여 또는 항원의 특이적 형태를 초래하는 게놈의 변형을 보유하는 유전적으로 조작된 세포를 제공한다. 이러한 유전적으로 조작된 세포 및 이의 자손은 면역치료제에 의해 표적화되지 않으며, 따라서 면역치료제에 의해 영향을 받는 임의의 세포독성에 구속되지 않는다. 이러한 세포는, 예를 들어, 세포치료제에 의해 표적화되고 사멸될 수 있는 건강한 세포를 대체하기 위해, 및/또는 세포치료제에 의한 표적화에 내성인 세포의 집단을 제공하기 위해, 항원을 표적으로 하는 면역치료제를 투여받는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 대상체에서 건강한 조혈 세포가 항원을 발현하면, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 조혈 세포, 예를 들어, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포가 항원을 발현하지 않는 대상체에게 투여될 수 있고, 따라서 세포치료제에 의해 표적화되지 않는다. 이러한 조혈 줄기 또는 전구 세포는 대상체의 조혈 틈새를 재충진할 수 있고, 이들의 자손은 세포치료제에 의해 제거될 수 있는 임의의 것을 포함하여, 다양한 조혈 계통을 재구성할 수 있다.

[0023] CD34는 인간 조혈 줄기 전구 세포 및 내피 세포의 표면에서 일반적으로 발현되는 O- 및 N-글리칸이 풍부한 115 kDa 막관통 당단백질 수용체이다. CD34의 기능은 잘 특성화되지 않지만, Cd34의 발현은 TGF-β1 및 TNF-α와 같은 성장 인자 및 산소 농도에 의해 조절되는 것으로 여겨진다. CD34는 세포 부착, 세포 형상을 조절하거나 세포 이동(예: T 세포 이동)에 관여할 수 있는 것으로 보고되었다. Tasev 등 참조. *혈관형성*(2016) 19:325-338. 일부 구현예에서, HSC는 CD34를 발현한다. 일부 구현예에서, CD34는 줄기 또는 전구 세포(예: HSC)의 검출 및/또는 단리를 위한 세포 표면 마커로서 사용된다. -. 인간 CD34를 암호화하는 유전자는 8개의 엑손을 함유하고 염색체 1 상에 위치한다.

[0024] HSC에서의 발현 외에도, CD34 발현은 또한 일부 조혈 악성 종양과 관련이 있었다.

[0025] 정상적인 건강한 HSC뿐만 아니라 악성 세포 상에서 발현된 항원 둘 다에서 CD34의 공유된 발현으로 인해, CD34의 치료적 표적화는 건강한 줄기 세포 및/또는 전구 세포 풀의 고갈을 초래할 수 있다.

[0026] CD34를 암호화하는 유전자의 유전적 변형을 특이적으로 유도하도록 개발된 gRNA가 본원에 기술된다. 또한, 변형된 세포가 CD34-특이적 면역 요법에 의해 인식되지 않도록, CD34가 결핍되거나 CD34의 발현이 감소된 조혈 세포, 면역 세포, 림프구 및 이러한 세포의 집단과 같은 유전적으로 변형된 세포를 생산하기 위한 이러한 gRNA의 용도가 본원에 제공된다. 또한, 특정 면역치료제의 온-타겟(on-target), 오프-질병(off-disease) 세포독성의 문제를 해결하기 위해 대상체에게 이러한 세포 또는 이의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이, 유전적으로 변형된 세포는 CD34가 결핍된 조혈 세포(예: HSC)이거나, 예를 들어, 전구 세포 또는 계통 전념(lineage-committed) 세포로 발달할 수 있는 CD34의 발현 감소를 갖는다. 대안적으로 또는 추가적으로, 본원에 기술된 바와 같은 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포는 면역 세포, 예컨대 CD34가 결핍되거나 CD34의 발현이 감소하는 CD34-특이적 CAR T 세포이며, 따라서 다른 CD34-특이적 CAR T 세포에 의한 프래트리사이드 사멸에 내성이 있다.

[0027] *정의*

[0028] *항체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 표적 항원에 특이적 결합을 부여하기에 충분한 정규 면역글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 자연에서 생산된 온전

한 항체는 일반적으로 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드(각각 약 50 kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드(각각 약 25 kD)를 포함하는 대략 150 kD의 사량체 제제이며, 이들은 서로 결합하여 일반적으로 "Y-형상" 구조로서 지칭된다. 각각의 중쇄는 적어도 4개의 도메인(각각 약 110개의 아미노산 길이) - (Y 구조의 선단부에 위치한) 아미노-말단 가변(VH) 도메인을 포함하고, 이어서 3개의 불변 도메인: CH1, CH2, 및 카르복시-말단 CH3(Y 줄기의 기저부에 위치함). "스위치"로 알려진 짧은 영역은 중쇄 가변 및 불변 영역을 연결한다. "힌지"는 CH2 및 CH3 도메인을 항체의 나머지 부분에 연결한다. 이러한 힌지 영역에서의 2개의 이황화 결합은 2개의 중쇄 폴리펩티드를 온전한 항체에서 서로 연결시킨다. 각각의 경쇄는 2개의 도메인, 즉 아미노-말단 가변(VL) 도메인에 이어서 카르복시-말단 상수(CL) 도메인을 포함하며, 서로로부터 다른 "스위치"에 의해 분리된다. 온전한 항체 사량체는 중쇄 및 경쇄가 단일 이황화 결합에 의해 서로 연결되는 2개의 중쇄-경쇄 이량체를 포함하고; 2개의 다른 이황화 결합은 중쇄 힌지 영역을 서로 연결시켜, 이량체가 서로 연결되고 사량체가 형성된다. 자연적으로 생성된 항체는 또한 전형적으로 CH2 도메인 상에서 일반적으로 당화된다. 천연 항체 내의 각각의 도메인은 압축된 역평행 베타 배럴에서 서로에 대해 충진된 2개의 베타 시트(예를 들어, 3-, 4- 또는 5-가닥 시트)로 형성된 "면역글로불린 접힘"을 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각각의 가변 도메인은 "상보성 결정 영역"(CDR1, CDR2, 및 CDR3)으로 알려진 3개의 초가변 루프 및 4개의 다소 불변인 "프레임워크" 영역(FR1, FR2, FR3, 및 FR4)을 포함한다. 천연 항체가 접힐 때, FR 영역은 도메인에 대한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 시트를 형성하고, 중쇄 및 경쇄 둘 다로부터의 CDR 루프 영역은 이들이 Y 구조의 선단에 위치한 단일 초가변 항원 결합 부위를 생성하도록 3차원 공간에서 합쳐진다. 자연 발생 항체의 Fc 영역은 보체 시스템의 요소에 결합하고 또한, 예를 들어, 세포독성을 매개하는 이펙터 세포를 포함하는 이펙터 세포 상의 수용체에도 결합한다. Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 친화도 및/또는 다른 결합 속성은 당질화 또는 다른 변형을 통해 조절될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 (예를 들어, CAR의 성분으로서) 생산되고/되거나 이용되는 항체는 변형되거나 조작된 당질화를 갖는 Fc 도메인을 포함하는 당질화된 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 천연 항체에서 발견되는 바와 같은 충분한 면역글로불린 도메인 서열을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 복합체는, 이러한 폴리펩티드가 자연적으로 생산되거나(예를 들어, 항원에 반응하는 유기체에 의해 생성됨) 재조합 엔지니어링, 화학 합성 또는 다른 인공 시스템 또는 방법론에 의해 생산되는지의 여부에 관계없이, "항체"로서 지칭되고/ 지칭되거나 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 다클론성이다. 일부 구현예에서, 항체는 단일클론성이다. 일부 구현예에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류 또는 인간 항체의 특징적인 불변 영역 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 항체 서열 요소는 당업계에 공지된 바와 같이 인간화, 영장류화, 키메라 등이다. 또한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 적절한 구현예에서 (달리 언급되거나 문맥으로부터 명백하지 않는 한) 대안적인 제시에서 항체 구조적 및 기능적 특징을 이용하기 위한 당업계에 알려지거나 개발된 작제물 또는 포맷을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 사용된 항체는 다음으로부터 선택된 포맷이고, 그러나 이에 한정되지는 않지만, 온전한 IgA, IgG, IgE 또는 IgM 항체; 이중 특이적 항체 또는 다중 특이적 항체(예를 들어, Zybodies®, 등); 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되는 것과 같은 항체 단편은, 단일클론 항체, 다클론 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체), 및/또는 항체 단편(바람직하게는, 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 단편)을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다. 본원에 기술된 항체는 면역글로불린, 중쇄 항체, 경쇄 항체, LRR-기반 항체, 또는 항체-유사 특성을 갖는 다른 단백질 스캐폴드, 및 예를 들어 Fab, Fab', Fab'2, Fab2, Fab3, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, 단일 도메인 항체, 단일 사슬 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), 미니바디(minibody), 맥시바디(maxibody), 탠다브(tandab), DVD, BiTe, TandAb, 등, 또는 이들의 임의의 조합을 비롯하여, 당 기술분야에 공지된 다른 면역학적 결합 모이어티일 수 있다. 상이한 부류의 항체의 서브유닛 구조 및 3차원 구성은 당 기술분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 항체는 자연적으로 생산될 경우 가질 수 있는 공유 변형(예: 글리칸의 부착)이 결여될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 공유 변형(예: 글리칸의 부착), 페이로드(예: 검출 가능한 모이어티, 치료 모이어티, 촉매 모이어티 등), 또는 다른 펜던트 기(예: 폴리-에틸렌 글리콜 등)를 함유할 수 있다.

[0029] *항원 결합 단편*: "항원-결합 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 지칭한다. 항체의 항원-결합 단편은 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 임의의 자연적으로 발생하는, 효소적으로 수득가능한, 합성 또는 유전적으로 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다. 예시적인 항체 단편은 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디; 단일 도메인 항체; 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자(예를 들어 scFv 또는 VHH 또는 VH 또는 VL 도메인 단독); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항체의 항원-결합 단편은 scFv이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항체의 항원-결합 단편은 VHH 도메인 단독이다. 전체(full) 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일-특이적 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중특이적 항원-결합 단편은 적

어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별도의 항원 또는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

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

[0031] *항체 경쇄*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항체 경쇄"는 자연적으로 발생하는 형태에서 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드 사슬 중 더 작은 것을 지칭한다.

[0032] *합성 항체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "합성 항체"는, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 박테리오파지에 의해 발현된 항체와 같은, 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되는 항체를 지칭한다. 상기 용어는 또한 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되었고, 항체 단백질을 발현하는 DNA 분자, 또는 항체를 암호화하는 아미노산 서열을 의미하며, 여기서, 상기 DNA 또는 아미노산 서열은 당업계에서 이용 가능하고 잘 알려진 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득되었다.

[0033] *항원*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "항원" 또는 "Ag"는 면역 반응을 유발할 수 있는 분자를 지칭한다. 이러한 면역 반응은 항체 생산, 특이적 면역 능력이 있는 세포의 활성화, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 당업자는 사실상 모든 단백질 또는 펩티드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 당업자는, 면역 반응을 유도하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 본원에서 사용되는 용어인 "항원"을 암호화한다는 것을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 암호화될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 둘 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이들 뉴클레오티드 서열은 원하는 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것이 쉽게 명백하다. 또한, 당업자는 항원이 "유전자"에 의해 암호화될 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 합성되거나 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다는 것은 쉽게 명백하다. 이러한 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0034] *자가:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "자가"는 나중에 동일한 개체로 재도입되기 위해 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.

[0035] *동종*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "동종이계"는 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 임의의 물질(예를 들어, 세포 집단)을 지칭한다.

[0036] *증식성 질환*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "증식성 질환"은 비정상적인 세포의 신속하고 조절되지 않은 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 증식성 질환은 양성 또는 악성 질환일 수 있다. 악성 질환은 전형적으로 악성 세포, 예를 들어, 암세포의 존재를 특징으로 한다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부위로 확산될 수 있다. 다양한 암의 예는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 대장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 과증식성은 골수 악성 종양 또는 림프 악성 종양과 같은 조혈 악성 종양이다. 일부 구현예에서, 조혈 악성 종양은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 조혈 악성 종양은 골수이형성 증후군이다.

[0037] *보존적 서열 변형*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "보존적 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의하게 영향을 미치거나 변경하지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 이러한 보존적 변형은 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 변형은 부위-유도 돌연변이 유발 및 PCR-매개 돌연변이 유발과 같은 당업계에 공지된 표준 기술에 의해 다양한 실시예와 호환 가능한 항체에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 당업계에 정의되었다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄(예: 라이신, 아르지닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예: 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄(예: 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄(예: 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함한다. 따라서, 항체의 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리 유래의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 항체는 본원에 기술된 기능적 분석을 사용하여 항원에 결합하는 능력에 대해 시험될 수 있다.

[0038] *공동 자극 리간드*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "공동 자극 리간드"는 항원 제시 세포(예: APC, 수지상 세포, B 세포 등) 상의 분자로서, 면역 세포(예: T 림프구) 상의 동족 공동 자극 분자에 특이적으로 결합하여,

증식, 활성화, 및 이와 유사한 활성화를 포함하되 이에 한정되지 않는 면역 세포 반응을 매개하는 신호를 제공하는 것을 지칭한다. 공동 자극 리간드는 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD28, PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공자극 리간드(ICOS-L), 세포간 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작용제 또는 항체 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 공동 자극 리간드는, 또한, 면역 세포(예: T 림프구) 상에 존재하는 공동 자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체, 예컨대, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, CD2, NKG2C, B7-H3 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] *세포독성*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포독성(cytotoxic)" 또는 "세포독성(cytotoxicity)"은 사멸 또는 손상 세포를 지칭한다. 일 구현예에서, 대사적으로 강화된 세포의 세포독성이 개선되며, 예를 들어, 면역 세포(예: T 림프구)의 세포용해 활성이 증가된다.

[0040] *유효량*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에 기술된 바와 같은 "유효량"은 개체에서 신생물 질환, 예를 들어, 암을 예방하거나 치료하기에 적절한 투여량을 지칭한다. 치료적 또는 예방적 사용에 효과적인 양은, 예를 들어, 치료 중인 질환 또는 장애의 단계 및 중증도, 환자의 연령, 체중, 및 전반적인 건강 상태, 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 투여량의 크기 또한 선택된 활성, 투여 방법, 투여 시기 및 빈도, 특정 활성의 투여를 수반할 수 있는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도, 및 원하는 생리학적 효과에 의해 결정될 것이다. 다양한 질환 또는 장애가 본 개시의 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)를 사용하여, 본 명세서에 기술된 바와 같이, 편집된 조혈 줄기 세포와 일시적으로 근접하여, 각각의 또는 다양한 투여 라운드에서, 아마도 다수의 투여를 포함하는 장기적인 치료를 필요로 할 수 있음을 당업자는 이해할 것이다.

[0041] 본 발명의 목적을 위해, 본원에 기술된 CAR 구축물을 포함하는 이종 핵산을 포함하는 유전적으로 조작된 세포의 양 또는 투여량은 합리적인 기간에 걸쳐 대상체 또는 동물에서 치료적 또는 예방적 반응에 영향을 미치기에 충분해야 한다. 예를 들어, 투여량은 투여 시간으로부터 약 2시간 이상, 예를 들어, 약 12 내지 약 24시간 이상의 기간 내에 항원에 결합하거나 암을 검출, 치료 또는 예방하기에 충분해야 한다. 특정 구현예에서, 기간은 훨씬 더 길 수 있다. 투여량은 본 개시의 특정 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, CAR 세포)의 효능 및 동물(예를 들어, 인간)의 상태뿐만 아니라 치료 대상 동물(예를 들어, 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.

[0042] *이펙터 기능*: 본원에서 사용되는 바와 같이, "이펙터 기능" 또는 "이펙터 활성"은 면역 세포의 자극에 반응하여 면역 세포에 의해 수행되는 특이적 활성을 지칭한다. 예를 들어, T 림프구의 이펙터 기능은 항원을 인식하고 항원을 발현하는 세포를 사멸시키는 것을 포함한다.

[0043] *내인성*: 본원에서 사용되는 바와 같이, "내인성"은 특정 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 유래되거나 그 내부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0044] *외인성*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "외인성"은 특정 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나 외부에서 생산된 임의의 물질을 지칭한다.

[0045] *확장*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "증식"은 세포, 예를 들어, 면역 세포, 예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포, 및/또는 조혈 세포의 수의 증가와 같이, 수의 증가를 지칭한다. 일 구현예에서, 면역 세포(예: T 림프구, B 림프구, NK 세포 및/또는 조혈 세포)가 *생체 외*에서 확장된 경우 배양물에 원래 존재하는 수에 비해 그 수가 증가한다. 또 다른 구현예에서, 면역 세포 (예: T 림프구, B 림프구, NK 세포, 및/또는 조혈 세포)는 *생체 외*에서 확장된 배양물에서 다른 세포 유형에 비해 상대적으로 그 수가 증가한다. 일부 구현예에서, 확장은 *생체* 내에서 발생할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "*생체 외*"는 살아있는 유기체(예를 들어, 인간)로부터 제거되고 유기체 외부에서 (예를 들어, 배양 접시, 시험 튜브, 또는 바이오리액터에서) 전파된 세포를 지칭한다.

[0046] *기능적 부분*: 본원에서 사용되는 바와 같이, CAR과 관련하여 사용될 때, 용어 "기능적 부분"은 본 발명의 CAR 구축물의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하며, 이 부분 또는 단편은 그것이 부분인 CAR 구축물(상위 CAR 구축물)의 생물학적 활성을 보유한다. 기능적 부분은, 예를 들어, 표적 세포를 인식하거나, 모 CAR 구축물(parent CAR construct)과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로 암을 검출, 치료 또는 예방하는 능력을 보유하는 CAR 구축물의 부분을 포함한다. 모 CAR 구축물을 참조하면, 기능적 부분은, 예를 들어, 모 CAR의 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 68%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0047] 기능성 부분은 부분의 아미노산 또는 카르복시 말단에, 또는 양 말단에 추가 아미노산을 포함할 수 있으며, 추

가 아미노산은 모 CAR 구축물의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는, 추가 아미노산은 기능적 부분의 생물학적 기능을 방해하지 않으며, 예를 들어, 표적 세포를 인식하거나, 암을 검출하거나, 암을 치료 또는 예방한다. 보다 바람직하게는, 추가 아미노산은 모 CAR 구축물의 생물학적 활성과 비교하여 생물학적 활성을 향상시킨다.

[0048] *기능적 변이체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, "본원에서 사용되는 용어 "기능성 변이체""는 모 CAR 구축물에 대해 실질적 또는 유의한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR 구축물, 폴리펩티드, 또는 단백질을 지칭하며, 이러한 기능적 변이체는 변이체인 CAR의 생물학적 활성을 유지한다. 기능적 변이체는, 예를 들어, 모 CAR 구축물과 유사한 정도, 동일한 정도, 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는 본원에 기술된 CAR 구축물(모 CAR 구축물)의 변이체를 포함한다. 모 CAR 구축물을 참조하면, 기능적 변이체는, 예를 들어, 모 CAR 구축물에 대한 아미노산 서열에서 적어도 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 이상 동일할 수 있다. 기능적 변이체는, 예를 들어, 적어도 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 부모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 기능적 변이체는 적어도 하나의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR 구축물의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 경우, 비보존적 아미노산 치환이 기능적 변이체의 생물학적 활성을 방해하거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비보존적 아미노산 치환은 기능적 변이체의 생물학적 활성을 향상시킬 수 있어서, 기능적 변이체의 생물학적 활성은 모 CAR 구축물과 비교하여 증가된다.

[0049] *gRNA*: 용어 "gRNA" 및 "가이드 RNA"는 전체적으로 상호 교환적으로 사용되고, gRNA/Cas9 분자 복합체를 표적 핵산에 특이적으로 표적화하거나 귀소시키는 것을 촉진하는 핵산을 지칭한다. gRNA는 (단일 RNA 분자를 갖는) 단분자일 수 있고, 때때로 본원에서는 sgRNA로 지칭되거나, 모듈화될 수 있다(하나를 초과하는, 및 전형적으로는 2개의 분리된 RNA 분자를 포함함). gRNA는 숙주 세포의 게놈에서 표적 도메인에 결합할 수 있다. gRNA(예를 들어, 이의 표적화 도메인)는 표적 도메인에 대해 부분적으로 또는 완전히 상보적일 수 있다. gRNA는, (예: gRNA 서열의 표적화 도메인에 의해) gRNA 서열에 결합된 표적 도메인에 Cas9 분자를 동원하는 "스캐폴드 서열"(예: tracrRNA 서열)을 포함할 수도 있다. 스캐폴드 서열은 적어도 하나의 줄기 루프 구조를 포함할 수 있고 엔도뉴클레아제를 동원한다. 예시적인 스캐폴드 서열은, 예를 들어, Jinek 등의 I (2012) 337(6096):816-821, Ran 등의 *Nature Protocols* (2013) 8:2281-2308, PCT 공개 번호 WO2014/093694, 및 PCT 공개 번호 WO2013/176772에서 찾을 수 있다.

[0050] *이종:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이종"은 살아있는 시스템, 예를 들어, 세포에서 발생하는 현상을 지칭하며, 이러한 현상은 그 시스템에서 자연적으로 발생하지 않는다. 예를 들어, 단백질이 그 세포에서 자연적으로 발생하지 않는(예를 들어, 세포가 그 단백질을 자연적으로 암호화하지 않는) 세포 내 단백질의 발현은 단백질의 이종 발현일 것이다. 일부 구현예에서, 이종 핵산은 키메라 항원 수용체 구축물을 암호화한다.

[0051] *면역 세포*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 세포"는 본원에서 용어 "면역 이펙터 세포"와 상호 교환적으로 사용되며, 면역 반응(예: 면역 반응 촉진)에 관여하는 세포를 지칭한다. 면역 세포의 예는 T-림프구, 자연 살해(NK) 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 호중구, 호산구, 비만 세포, 혈소판, 큰 과립 림프구, 랑게르한스 세포, 또는 B-림프구를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 면역 세포(예: T 림프구, B 림프구, NK 세포)의 공급원은 대상체로부터 수득될 수 있다.

[0052] *면역 반응*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 반응"은 림프구가 항원 분자를 외래로 식별하고 항체의 형성을 유도하고/하거나 림프구를 활성화하여 항원을 제거할 때 발생하는 항원에 대한 세포 및/또는 전신 반응을 지칭한다.

[0053] *핵산*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산"은 적어도 3개의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 단일 가닥이다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, 핵산은 단일 및 이중 가닥 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 하나 이상의 인산디에스테르 결합을 포함하는 골격을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 인산디에스테르 및 비-포스포디에스테르 결합 모두를 포함하는 골격을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 핵산은, 예를 들어 "펩티드 핵산"에서와 같이, 하나 이상의 포스포로티오에이트 또는 5'-N-포스포라미디트 결합 및/또는 하나 이상의 펩티드 결합을 포함하는 골격을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 자연 잔기(예: 아데닌, 시토신, 데옥시아데노신, 데옥시시티딘, 데옥시구아노신, 데옥시티미딘, 구아닌, 티민, 우라실) 중 하나 이상 또는 전부를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 하나 이상의, 또는 모든 비-자연 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-자연 잔기는 뉴클레오시드 유사체(예를 들어, 2-아미노아데노신, 2-티오티

미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, 5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-요오도우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, O(6)-메틸구아닌, 2-티오시티딘, 메틸화된 염기, 통합 염기, 및 이들의 조합)을 포함한다. 일부 구현예에서, 비-자연 잔기는 자연 잔기의 당과 비교하여 하나 이상의 변형된 당(예를 들어, 2'-플루오로리보오스, 리보오스, 2'-데옥시리보오스, 아라비노오스, 및 헥소스)을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 RNA 또는 폴리펩티드와 같은 기능성 유전자 산물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산은 하나 이상의 인트론을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산은 자연 공급원으로부터의 단리, 효소 합성(예를 들어, 상보적 템플릿, 예를 들어, 생체 내 또는 시험관 내, 재조합 세포 또는 시스템에서의 생식, 또는 화학적 합성에 기초한 중합화에 의해)에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 또는 그 이상의 잔기 길이이다.

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

[0055] *특이적으로 결합한다*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하는"은 항체 제제 또는 키메라 항원 수용체의 일부와 같은 항원 결합 도메인에 대하여, 특이적 항원을 인식하지만, 시료 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제를 지칭한다. 예를 들어, 한 종의 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제는 또한 하나 이상의 종의 해당 항원에도 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 종간 교차 반응성은 항원 결합 도메인 또는 항체 제제의 분류를 특이적인 것으로 자체적으로 변경시키지 않는다. 또 다른 실시예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제는 또한 항원의 상이한 대립유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성 자체는 항원 결합 도메인 또는 항체 제제의 분류를 특이적인 것으로 자체적으로 변경시키지 않는다. 일부 경우에, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 상호작용이 특정 구조(예: 상기 화학적 종 상의 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하기 위해 항원 결합 도메인 또는 항체 제제, 단백질 또는 펩티드와 제2 화학적 종과의 상호작용과 관련하여 사용될 수 있고; 예를 들어, 항원 결합 도메인 또는 항체 제제는 일반적으로 단백질보다는 특이적 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항원 결합 도메인 또는 항체 제제가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항원 결합 도메인 또는 항체 제제를 함유하는 반응에서 에피토프 A(또는 유리, 표지되지 않은 A)를 함유하는 분자의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

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

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

[0058] *치료적*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적(therapeutic)"은 치료 및/또는 예방을 지칭한다. 치료 효과는 질환 상태의 억제, 관해, 또는 박멸에 의해 수득된다.

[0059] *형질감염:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 프로세스를 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질유도된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 세포는 일차 대상 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0060] *이식 유전자*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "이식 유전자"는 핵산 서열이 자연적으로 발생하지 않는 세포, 예를 들어, 세포의 게놈에 포함된 외인성 핵산 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 이식 유전자는 유전자 산물, 예를 들어, CAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 이식 유전자는 조절 요소, 예를 들어, 프로모터의 조절 하에 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열과 같은 발현 구조를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0061] *치료*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 질환, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징의 부분적 또는 완전한 완화, 개선, 발병 지연, 억제, 예방, 완화, 및/또는 발생률 및/또는 중증도의 감소를 지칭한다. 일부 구현예에서, 치료제는 질환, 장애 및/또는 병태의 징후 또는 특징을 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다(예를 들어, 예방적일 수 있음). 일부 구현예에서, 치료는 예를 들어 질환, 장애 및/또는 병태의 초기 또는 경미한 징후 또는 특징만을 나타내는 대상체에게, 예를 들어 질환, 장애 및/또는 병태와 관련된 병리 발생 위험을 감소시키기 위한 목적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 질환, 장애 또는 병태의 확립된 중증 및/또는 말기 징후를 나타내는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, T 림프구, B 림프구, NK 세포)를 포함하는 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계, 또는 유전적으로 조작된 줄기 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 이식을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0062] *종양*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "종양"은 세포 또는 조직의 비정상적인 성장을 지칭한다. 일부 구현예에서, 종양은 전암성(예: 양성), 악성, 전-전이성, 전이성 및/또는 비전이성인 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 종양은 암과 연관되거나 암의 발현이다. 일부 구현예에서, 종양은 분산 종양 또는 액체 종양일 수 있다. 일부 구현예에서, 종양은 고형 종양일 수 있다.

[0063] 유전적으로 조작된 세포 및 관련 조성물 및 방법

[0064] 본 개시의 일부 양태는 CD34의 발현 손실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 내 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포의 게놈에서의 변형은 CD34를 암호화하는 게놈 서열에서의 돌연변이이다.

[0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "돌연변이"는 기준 서열, 예를 들어, 이러한 돌연변이를 갖지 않는 세포의 상응하는 서열, 또는 상응하는 야생형 핵산 서열과 비교하여 핵산 서열에서의 변화(예를 들어, 삽입, 결실, 반전, 또는 치환)를 지칭한다. 본원에 제공된 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 유전자에서의 돌연변이는 돌연변이를 보유한 세포에서 CD34의 발현 손실을 초래한다. 일부 구현예에서, CD34를 암호화하는 유전자에서의 돌연변이는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 결합되지 않거나, 유전자에 의해 암호화된 비돌연변이된 CD34 형태보다 상당히 낮은 수준으로 결합된 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CD34 유전자에 게놈 돌연변이를 보유하는 세포는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제, 예를 들어, 항-CD34 항체 또는 키메라 항원 수용체(CAR)에 의해 결합되지 않거나, 상당히 낮은 수준으로 결합된다.

[0066] 본 개시의 일부 양태는 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포를 생성하기 위한 조성물 및 방법을 제공하며, 예를 들어, CD34의 발현 손실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 내 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 세포를 제공한다. 본원에 제공된 이러한 조성물 및 방법은, 예를 들어, CRISPR/Cas 뉴클레아제와 같은 RNA 가이드 뉴클레아제 및 그러한 RNA 가이드 유도 뉴클레아제와 결합하여 세포의 게놈 내의 적절한 표적 부위에 표적화하여 유전체 변형을 일으켜 CD34의 발현이 손실되거나 CD34를 표적으로 하는 면역 치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현시키는 적절한 전략 및 세포를 유전자 공학하기 위한 접근법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포와 같은 유전적으로 조작된 조혈 세포)는 세포의 게놈에 "편집"으로도 지칭되는 표적화된 변화를 도입할 수 있는 임의의 기술을 포함하는 게놈 편집 기술을 통해 생성된다.

[0068] 적절한 게놈 편집 기술의 한가지 예인 "유전자 편집"은 RNA 가이드 뉴클레아제의 사용을 포함하고 (예: CRISPR/Cas 뉴클레아제) 표적화된 단일-나선 또는 이중-가닥 DNA 절단을 세포의 게놈에 도입하도록, 세포 복구

메커니즘을 트리거하고, 예를 들어, 비상동성 말단 결합(NHEJ), 미세상동성 매개 말단 결합(MMEJ, 때때로 "대체 NHEJ" 또는 "alt-NHEJ"로도 지칭됨), 또는 일반적으로 변경된 핵산 서열(예를 들어, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 서열 삽입을 통해, 결실, 반전, 또는 치환)을 뉴클레아제 절단부의 부위에 바로 근접하거나 또는 바로 근위에 위치시킨다. 참조, Yeh 등의 *Nat. Cell. Biol.* (2019) 21: 1468-1478; 예를 들어, Hsu 등의 *Cell* (2014) 157: 1262-1278; Jasin 등의 *DNA Repair* (2016) 44: 6-16; Sfeir 등의 *Trends Biochem. Sci.* (2015) 40: 701-714.

[0069] 또 다른 예시적인 적절한 게놈 편집 기술은 "염기 편집"으로, 이는 예를 들어, 특정 핵염기를 표적화하고 탈아미노화하는 탈아미나아제에 융합된 뉴클레아제-손상 또는 부분적으로 뉴클레아제-손상된 RNA 가이드 CRISPR/Cas 단백질과 같은 염기 편집기의 사용을 포함합니다. 예를 들어 세포 불일치 복구 메커니즘을 통해 C에서 T 뉴클레오티드로의 변화 또는 A에서 G 뉴클레오티드로의 변화를 초래하는 C 또는 A 뉴클레오티드의 시토신 또는 아데노신 핵염기. 예를 들어, Komor et al. *자연* (2016) 533: 420-424; Rees et al. *Nat. Rev. Genet.* (2018) 19(12): 770-788; Anzalone et al. *Nat. Biotechnol.* (2020) 38: 824-844;

[0070] 또 다른 예시적인 적절한 게놈 편집 기술은, 조작된 역전사효소(RT) 도메인에 융합된, 촉매적으로 손상되었거나 부분 촉매로 손상된 RNA 가이드 뉴클레아제, 예를 들어, CRISPR/Cas 뉴클레아제를 사용하여, 새로운 유전자 정보, 예를 들어, 변경된 뉴클레오티드 서열을 특이적으로 표적화된 게놈 부위에 도입하는 것을 포함하는 "프라임 편집"을 포함한다. Cas/RT 융합은 원하는 편집을 암호화하는 핵산 서열을 또한 포함하고 RT에 대한 프라이머로서 작용할 수 있는 가이드 RNA에 의해 게놈 내의 표적 부위에 표적화된다. 예를 들어, Anzalone et al. *Nature* (2019) 576 (7785): 149-157 참조.

[0071] 게놈 편집 기술의 용도는 일반적으로 적절한 RNA 가이드 뉴클레아제를 사용하는 것을 특징으로 하며, 이는, 일부 구현예에서, 예를 들어, 염기 편집 또는 프라임 편집을 위해, 촉매에 의해 손상되거나, 부분적으로 촉매에 의해 손상될 수 있다. 적절한 RNA 가이드 뉴클레아제의 예는 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포의 방법에 사용하기 위한 적절한 RNA 가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제, 예를 들어, spCas9 또는 saCas9 뉴클레아제이다. 다른 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포의 방법에 사용하기 위한 적절한 RNA 가이드 뉴클레아제는 Cas12 뉴클레아제, 예를 들어, Cas12a 뉴클레아제이다. 예시적인 적합한 Cas12 뉴클레아제는, 한정하지 않고, AsCas12a, FnCas12a, 다른 Cas12a 오르토로그, 및 Cas12a 유도체, 예컨대 MAD7 시스템(MAD7™, Inscripta, Inc.), 또는 Alt-R Cas12a(Cpf1) *Ultra* 뉴클레아제(Alt-R® Cas12a Ultra; Integrated DNA Technologies, Inc.)를 포함한다. 예를 들어, Gill et al. LIPSIPCOMB 2017. In United States: Inscripta Inc.; Price et al. *Biotechnol. Bioeng.* (2020) 117(60): 1805-1816 참조;

[0072] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포 또는 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포와 같은 유전적으로 조작된 조혈 세포)는 RNA 가이드 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제 또는 Cas12a 뉴클레아제와 같은 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 세포의 게놈 내 적절한 표적 부위에 표적화함으로써 생성되고, RNA 가이드 뉴클레아제가 상기 세포의 게놈 내의 적절한 표적 부위에 결합하고 세포의 게놈 DNA를 절단하기에 적합한 조건 하에서 생성된다. 적절한 RNA 가이드 뉴클레아제는 적절한 가이드 RNA(gRNA)에 의해 게놈 내의 특정 표적 부위에 표적화될 수 있다. 본 개시의 양태에 따라 CRISPR/Cas 뉴클레아제를 표적화하기 위한 적절한 gRNA가 본원에 제공되며, 예시적인 적합한 gRNA는 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된다.

[0073] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD34 gRNA는 CRISPR/Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제와 복합체를 이룬다. 다양한 Cas9 뉴클레아제는 본 개시의 양태에 따른 게놈 편집을 실시하기 위해, 예를 들어 CD34 유전자에서 게놈 변형을 생성하기 위해 본원에 제공된 gRNA와 함께 사용하기에 적합하다. 일반적으로, Cas 뉴클레아제 및 gRNA는 세포의 게놈 상의 표적 부위, 예를 들어, CD34 유전자 내의 표적 부위를 표적으로 하는, Cas/gRNA 복합체의 형성에 적합한 형태로 그리고 그 조건 하에서 제공된다. 일부 구현예에서, Cas/gRNA 복합체를 CD34 유전자 내의 원하는 표적 도메인으로 표적화하기 위한 원하는 PAM 특이성을 나타내는 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 적절한 표적 도메인 및 상응하는 gRNA 표적화 도메인 서열이 본원에 제공된다.

[0074] 일부 구현예에서, Cas/gRNA 복합체가, 예를 들어, 시험관 내에서 형성되고, 표적 세포는, 예를 들어, Cas/gRNA 복합체를 세포로의 전기천공을 통해 Cas/gRNA 복합체와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 Cas 단백질 및 gRNA와 별도로 접촉되고, Cas/gRNA 복합체는 세포 내에 형성된다. 일부 구현예에서, 세포는 핵산, 예를 들어, Cas 단백질을 암호화하는 DNA 또는 RNA, 및/또는 gRNA를 암호화하는 핵산, 또는 둘 모두와 접촉된다.

[0075] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 유전적으로 조작된 세포는 적절한 게놈 편집 기술을 사용하여 생성되며, 여기서 게놈 편집 기술은 Cas9 뉴클레아제의 사용을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 *스트렙토코쿠스 피오게네스*(SpCas9), *스타필로코커스 아우레우스*(SaCas9), 또는 *스트렙토코쿠스 써모필러스*(stCas9)이거나 이로부터 유래된다. 추가의 적합한 Cas9 분자는 또는 이로부터 유래된, *수막염균*(NmCas9), *아시도보락스 아비네(Acidovorax avenae)*, *악티노바실러스 흉막폐렴(Actinobacillus pleuropneumoniae)*, *악티노바실러스 숙시노게네스(Actinobacillus succinogenes)*, *악티노바실루스 수이스 (Actinobacillus suis)*, *방선균 종 (Actinomyces sp.)*, *시클리필루스 디니트리피칸스(Cycliphilus denitrificans)*, *아미노모나스 포시보란(Aminomonas paucivorans)*, *바실루스 세레우스 (Bacillus cereus)*, *바실루스 스미티(Bacillus smithii)*, *바실루스 투린기엔시스(Bacillus thuringiensis)*, *박테로이데스 종(Bacteroides sp.)*, *블라스토피렐룰라 마리나(Blastopirellula marina)*, *브래디리조븀 종(Bradyrhizobium sp.)*, *브레비바실루스 라테로스포러스(Brevibacillus laterosporus)*, *캄필로박터 콜리 (Campylobacter coli)*, *캄필로박터 제주니*(Campylobacter jejuni, CjCas9), *캄필로박터 라리(Campylobacter lari)*, *칸디다투스 퓨시시스피리움(Candidatus puniceispirillum)*, *클로스트리듐 셀룰로리튬 (Clostridium cellulolyticum)*, *클로스트리듐 퍼프린젠스(Clostridium perfringens)*, *코리네박테륨 어필렌스 (Corynebacterium accolens)*, *코리네박테륨 디프테리아(Corynebacterium diphtheria)*, *코리네박테리움 마트루초티 (Corynebacterium matruchotii)*, *디노로세오박터 시바에 (Dinoroseobacter shibae)*, *유박테륨 돌리쿰(Eubacterium dolichum)*, *감마 프로테오박테리움(gamma proteobacterium)*, *글루코나세토박터 디아조트로피투스 (Gluconacetobacter diazotrophicus)*, *헤모필루스 파라인플루엔자(Haemophilus parainfluenzae)*, *헤모필루스 포자충(Haemophilus sputorum)*, *헬리코박터 카나덴증(Helicobacter canadensis)*, *헬리코박터 시나에디 (Helicobacter cinaedi)*, *헬리코박터 머스텔레(Helicobacter mustelae)*, *장내세균성 폴리트로푸스 (Ilyobacter polytropus)*, *킹젤라 킹애(Kingella Kingae)*, *락토바실러스 크리스파투스(Lactobacillus crispatus)*, *리스테리아 이바노비(Listeria ivanovii)*, *리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes)*, *리스테리아세균 (Listeriaceae bacterium)*, *메틸로시스티스 종(Methylocystis sp.)*, *메틸로시너스 트리코스포리움 (Methylosinus trichosporium)*, *모빌린쿠스 뮬리에리스(Mobiluncus mulieris)*, *나이세리아 바실리포르미스(Neisseria bacilliformis)*, *나이세리아 시네리아(Neisseria cinerea)*, *나이세리아 플라베센스 (Neisseria flavescens)*, *나이세리아 락타미카(Neisseria lactamica)*, *수막염균 (Neisseria meningitidis)*, *나이세리아 종 (Neisseria sp.)*, *나이세리아 와즈워시(Neisseria wadsworthii)*, *니트로소모나스 종 (Nitrosomonas sp.)*, *해면체(Parvibaculum lavamentivorans)*, *파스퇴렐라 물토시다(Pasteurella multocida)*, *파스콜아르코박테륨 숙시나투텐(Phascolarctobacterium succinatutens)*, *랄스토니아 시지기(Ralstonia syzygii)*, *로도프슈도모나스 팔루스트리스(Rhodopseudomonas palustris)*, *로도불럼 종(Rhodovulum sp.)*, *시몬시엘라 뮬레리(Simonsiella muelleri)*, *스핑고모나스 종(Sphingomonas sp.)*, *스포롤라토바실러스 비나에(Sporolactobacillus vineae)*, *스타필로코커스 루그두넨시스(Staphylococcus lugdunensis)*, *스트렙토코쿠스 종(Streptococcus sp.)*, *과립막하 종(Subdoligranulum sp.)*, *티스트렐라 모빌리스(Tistrella mobilis)*, *트레포네마 종(Treponema sp.)*, 또는 *버미네프로박터 에이세니에(Verminephrobacter eiseniae)*를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 Cas9 뉴클레아제의 촉매에 의해 손상되었거나 부분적으로 손상된 변이체가 사용될 수 있다. 추가의 적절한 Cas9 뉴클레아제 및 뉴클레아제 변이체는 본 개시에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다. 본 개시는 이와 관련하여 제한되지 않는다.

[0076] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 자연적으로 발생하는 Cas 분자이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는, 예를 들어, 기준 서열, 예를 들어, PCT 공개 번호 WO2015/157070의 표 50의 가장 유사한 자연 발생 Cas9 분자 또는 서열과 상이한, 예를 들어, 적어도 하나의 아미노산 잔기에 의해 상이한, 조작된, 변경된, 또는 변형된 Cas 분자이며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0077] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제의 클래스 2 유형 V에 속하는 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 클래스 2 V형 Cas 뉴클레아제는 V-A형, V-B형, V-C형, 및 V-U형으로 추가로 분류될 수 있다. *예를 들어*, Stella 등. *Nature Structural & Molecular Biology* (2017) 참조. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 C2c1과 같은 V-B형 Cas 엔도뉴클레아제이다. 예를 들어, Shmakov 등. *Mol Cell* (2015) 60: 385-397 참조. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 게놈 편집 방법에 사용된 Cas 뉴클레아제는 Cpf1(Cas12a) 뉴클레아제와 같은 V-A형 Cas 엔도뉴클레아제이다. 예를 들어, Strohkendl 등. *Mol. 세포* (2018) 71: 1-9 참조 일부 구현예에서, 본원에 제공된 게놈 편집 방법에 사용된 Cas 뉴클레아제는 *프로베텔라(Provetella spp.)* 또는 *프란시셀라(Francisella spp.)*, *아시미노코커스(Acidaminococcus sp.)*(AsCpf1), *라크노스피라세아속 박테리아(Lachnospiraceae bacterium)*(LpCpf1) 또는 *유박테리움 렉테일(Eubacterium rectale)*에서 추출한 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 MAD7이다.

[0078] CRISPR/Cas 뉴클레아제의 자연적으로 발생하는 변이체 및 변형된 변이체 둘 다는 본 개시의 양태에 따른 사용에 적합하다. 예를 들어, dCas 또는 니카아제 변이체, 변경된 PAM 특이성을 갖는 Cas 변이체, 및 개선된 뉴클레아제 활성을 갖는 Cas 변이체가 본 개시의 일부 구현예에 포함된다.

[0079] 일부 예시적인 비제한적인 적절한 Cas 뉴클레아제의 일부 특징은 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이 본원에서 보다 상세히 설명된다.

[0080] 자연적으로 발생하는 Cas9 뉴클레아제는 일반적으로 2개의 로브: 인식(REC) 로브 및 뉴클레아제(NUC) 로브를 포함하고; 이들 각각은 예를 들어, PCT 공개 번호 WO2015/157070, 도 9a~9b에 도시되어 있다(본 출원은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0081] REC 로브는 아르지닌-풍부 브릿지 나선(BH), REC1 도메인, 및 REC2 도메인을 포함한다. REC 로브는 Cas9 특이적 기능성 도메인인 것으로 보인다. BH 도메인은 긴 알파 나선 및 아르지닌 풍부 영역이며, *S. 피오게네스* Cas9의 서열의 아미노산 60~93을 포함한다. REC1 도메인은, 예를 들어, gRNA 또는 tracrRNA의 반복:항-복제 이중체의 인식에 관여한다. REC1 도메인은 *S. 피오게네스* Cas9의 서열의 아미노산 94 내지 179 및 308 내지 717에서 2개의 REC1 모티프를 포함한다. 이들 2개의 REC1 도메인은 선형 일차 구조에서 REC2 도메인에 의해 분리되어 있지만, 3차 구조에서 조립되어 REC1 도메인을 형성한다. REC2 도메인 또는 이의 일부는 반복: 항-회귀 이중가닥을 인식하는 데에도 역할을 할 수 있다. REC2 도메인은 *S. 피오게네스* Cas9의 서열의 아미노산 180~307을 포함한다.

[0082] NUC 로브는 RuvC 도메인(본원에서 RuvC-유사 도메인으로도 지칭됨), HNH 도메인(본원에서 HNH-유사 도메인으로도 지칭됨), 및 PAM-상호작용(PI) 도메인을 포함한다. RuvC 도메인은 레트로바이러스 통합효소 슈퍼패밀리 구성원과 구조적 유사성을 공유하고 단일 가닥, 예를 들어 표적 핵산 분자의 비-상보성 가닥을 절단한다. RuvC 도메인은, *S. 피오게네스(pyogen) 9* Cas9의 서열의 아미노산 1-59, 718-769, 및 909-1098에서 각각 3개의 분리된 RuvC 모티프(RuvC I, RuvCII, 및 RuvCIII)로부터 조립되며, 이는 당업계에서 흔히 RuvCI 도메인, 또는 N-말단 RuvC 도메인, RuvCII 도메인, 및 RuvCIII 도메인으로 지칭된다. REC1 도메인과 유사하게, 3개의 RuvC 모티프는 일차 구조에서 다른 도메인에 의해 선형으로 분리되지만, 삼차 구조에서, 3개의 RuvC 모티프는 조립되어 RuvC 도메인을 형성한다. HNH 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 구조적 유사성을 공유하고, 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 상보적 가닥을 절단한다. HNH 도메인은 RuvC II~III 모티프 사이에 놓이고, *S. 피오게네스* Cas9의 서열의 아미노산 775~908을 포함한다. PI 도메인은 표적 핵산 분자의 PAM과 상호작용하고, *S. 피오게네스* Cas9의 서열의 아미노산 1099-1368을 포함한다.

[0083] 자연적으로 발생하는 박테리아 Cas9 뉴클레아제에 대해 결정 구조를 결정하였고(예를 들어, Jinek 등의 Science, 343(6176): 1247997, 2014 참조), 가이드 RNA(예를 들어, crRNA 및 tracrRNA의 합성 융합)를 갖는 *S. 피오게네스* Cas9에 대해 결정하였다(Nishimasu등, Cell, 156:935-949, 2014; 및 Anders 등, Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579).

[0084] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Cas9 분자는 표적 부위에서 또는 표적 부위에 바로 근위에 이중 가닥 DNA 절단의 도입을 초래하는 뉴클레아제 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 엔도뉴클레아제의 촉매 잔기 중 하나를 비활성화하도록 변형되었다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 니카제이고 단일 가닥 절단을 생성한다. 예를 들어, Dabrowska 등의 *Frontier in Neuroscience*(2018) 12(75) 참조. 효소의 RuvC 및 HNH 촉매 도메인에서 하나 이상의 돌연변이가 Cas9 효율을 개선할 수 있음이 나타났다. 예를 들어, Sarai 등의 *Currently Pharma. 바이오테크놀.* (2017) 18(13) 참조. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 제2 도메인, 예를 들어, DNA 또는 염색질을 변형시키는 도메인, 예를 들어, 탈아미노효소 또는 탈메틸효소 도메인에 융합된다. 일부 이러한 구현예에서, Cas9 분자는 그의 엔도뉴클레아제 활성을 제거하기 위해 변형된다.

[0085] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Cas 뉴클레아제 또는 Cas/gRNA 복합체는 상동성 유도 복구(HDR)를 위한 템플릿과 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 Cas 뉴클레아제 또는 Cas/gRNA 복합체는 HDR 템플릿 없이 투여된다.

[0086] 일부 구현예에서, 효소의 특이성을 향상시키기 위해 변형되는 (*예를 들어*, 오프 타겟 효과를 감소시키고, 강력한 온 타겟 절단을 유지하는) Cas9 뉴클레아제가 사용된다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 강화된 특이성 Cas9 변이체(*예:* eSPCas9)이다. *예를 들어*, Slaymaker 외 *Science* (2016) 351 (6268): 84-88 참조. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 고 충실도 Cas9 변이체(*예:* SpCas9-HF1)이다. *예를 들어*, Kleinstiver 등의 *Nature* (2016) 529: 490-495 참조.

[0087] 다양한 Cas 뉴클레아제는 당업계에 공지되어 있고, 효소의 하나 이상의 활성 또는 특이성을 조절하도록 다양한 공급원으로부터 수득되고/되거나 조작되거나/변형될 수 있다. 적절한 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, 예를 들어, spCas9 및 saCas9와 같은 적절한 Cas9 뉴클레아제의 PAM 서열 선호도 및 특이성은 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 Cas 뉴클레아제가 조작/변형 없이 인식하는 PAM 서열과 상이한 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 효소의 오프 타겟 활성을 감소시키도록 조작/변형되었다.

[0088] 일부 구현예에서, 엔도뉴클레아제 활성의 특이성을 변경(*예를 들어,* 탈표적 절단을 감소시키고, 세포에서 엔도뉴클레아제 활성 또는 수명을 감소시키며, 상동성-지시 재조합을 증가시키고, 비-상동성 말단 결합을 감소시킴)시키기 위해 추가로 변형된 Cas 뉴클레아제가 사용된다. *예를 들어*, Komor 등의 *Cell* (2017) 168: 20-36 참조. 일부 구현예에서, 엔도뉴클레아제의 PAM 인식 또는 선호도를 변경하도록 변형된 Cas 뉴클레아제가 사용된다. 예를 들어, SpCas9는 PAM 서열 NGG를 인식하는 반면, 하나 이상의 변형(*예:* VQR SpCas9, EQR SpCas9, VRER SpCas9)을 포함하는 SpCas9의 일부 변이체는 변이체 PAM 서열, 예를 들어, NGA, NGAG, 및/또는 NGCG를 인식할 수 있다. 또 다른 예를 들어, SaCas9는 PAM 서열 NNGRRT를 인식하는 반면, 하나 이상의 변형(*예:* KKH SaCas9)을 포함하는 SaCas9의 일부 변이체는 PAM 서열 NNNRRT를 인식할 수 있다. 또 다른 실시예에서, FnCas9는 PAM 서열 NNG를 인식하는 반면, 하나 이상의 변형(예: RHA FnCas9)을 포함하는 FnCas9의 변이체는 PAM 서열 YG를 인식할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 치환 돌연변이 S542R 및 K607R을 포함하는 Cas12a 뉴클레아제는 PAM 서열 TYCV를 인식한다. 또 다른 실시예에서, 치환 돌연변이 S542R, K607R, 및 N552R을 포함하는 Cpf1 엔도뉴클레아제는 PAM 서열 TATV를 인식한다. *예를 들어*, Gao 등의 *Nat. Biotechnol.* (2017) 35(8): 789-792 참조.

[0089] 일부 구현예에서, 염기 편집기를 사용하여 CD34의 발현이 손실되거나 면역요법에 의해 표적화되지 않은 CD34 변이체의 발현을 초래하는 게놈 변형을 생성한다. 염기 편집기는 전형적으로 기능 도메인, 예를 들어, 탈아미노효소 도메인에 융합된 촉매 비활성 또는 부분 비활성 Cas 뉴클레아제를 포함한다. *예를 들어*, Eid 등의 *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964; Rees 등의 *Nature Reviews Genetics*(2018) 19:770-788 참조. 일부 구현예에서, 촉매 비활성 Cas 뉴클레아제는 "죽은 Cas" 또는 "dCas"로 지칭된다. 일부 구현예에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기(ABE)에 융합된 dCas, 예를 들어 RNA 아데닌 데아미나아제 TadA로부터 진화된 ABE를 포함한다. 일부 구현예에서, 엔도뉴클레아제는 시티딘 데아미나아제 효소(예: APOBEC 데아미나아제, pmCDA1, 활성화-유도 시티딘 데아미나아제(AID))에 융합된 dCas를 포함한다. 일부 구현예에서, 촉매 비활성 Cas 분자는 감소된 활성을 가지며, 예를 들어, 니카제이다.

[0090] 적절한 염기 편집기의 예로는, BE1, BE2, BE3, HF-BE3, BE4, BE4max, BE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-CE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaBE4, SaBE4-Gam, Sa(KKH)-BE3, Target-AID, Target-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRISPR-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10*, xABE, ABESa, VQR-ABE, VRER-ABE, Sa(KKH)-ABE, 및 CRISPR-SKIP 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 기본 편집자의 추가 예는, 예를 들어, 미국 공개 번호 제2018/0312825A1호, 미국 공개 번호 제2018/0312828A1호, 및 PCT 공개 번호 제WO 2018/165629A1호에서 찾을 수 있으며, 이들은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0091] 본 개시의 일부 양태는 CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역 요법제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 세포의 게놈의 변형을 달성하기 위해, RNA 가이드 뉴클레아제를 표적화하기에 적합한, 예를 들어, 본원에 제공된 바와 같은 가이드 RNA를 세포의 게놈 내 적절한 표적 부위에 제공한다.

[0092] 용어 "가이드 RNA" 및 "gRNA"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, RNA 가이드 뉴클레아제에 의해 결합되고 RNA 가이드 뉴클레아제의 표적 핵산, 예를 들어, 세포의 게놈 내의 표적 부위에 대한 특이적 표적화 또는 귀소를 촉진하는 핵산, 일반적으로 RNA를 지칭한다. gRNA는 일반적으로 적어도 2개의 도메인을 포함한다: RNA 가이드 뉴클레아제("결합 도메인"으로도 지칭됨)에 대한 결합을 매개하는 "결합 도메인"은 때때로 "gRNA 스캐폴드" 또는 "gRNA 백본"으로도 지칭되며, gRNA-결합 RNA 가이드 뉴클레아제의 표적 부위를 매개하는 "표적화 도메인"을 포함한다. 일부 gRNA는 추가 도메인, 예를 들어 상보성 도메인, 또는 줄기-루프 도메인을 포함한다. 자연적으로 발생하는 gRNA 결합 도메인 및 이의 조작된 변이체의 구조 및 서열은 당업자에게 잘 알려져 있다. 일부 적합한 gRNA는 단일 핵산 서열을 포함하는 단분자이지만, 다른 적합한 gRNA는 2개의 서열(예: crRNA 및 tracrRNA 서열)을 포함한다.

[0093] 일부 예시적인 적절한 Cas9 gRNA 스캐폴드 서열이 본원에 제공되며, 본 개시에 기초하여 추가적인 적절한 gRNA

스캐폴드 서열이 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 추가의 적절한 스캐폴드 서열에는 Jinek 등, *Science* (2012) 337(6096):816-821, Ran, 등,에서 인용된 서열이 포함되나 이에 제한되지 않는다. *Nature Protocols* (2013) 8:2281-2308, PCT 공개 번호 WO2014/093694, 및 PCT 공개 번호 WO2013/176772에서 확인할 수 있다.

[0094] 예를 들어, 자연적으로 발생하는 spCas9 gRNA의 결합 도메인은 일반적으로 2개의 RNA 분자, crRNA(부분적) 및 tracrRNA를 포함한다. 예를 들어, 테트라루프를 통해 또는 클릭-화학 유형 공유 결합을 통해 서로 공유 결합된, crRNA 및 tracrRNA 서열 둘 다를 포함하는 단일 RNA 분자만을 포함하는 spCas9 gRNA의 변이체가 조작되었고, 일반적으로 "단일 가이드 RNA" 또는 "sgRNA"로서 지칭된다. 자연적으로 발생하는 Cas12a 가이드 RNA가 단일 RNA 분자를 포함하므로, 다른 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cas12a 뉴클레아제와 함께 사용하기에 적합한 gRNA는 전형적으로 단일 RNA 분자만을 포함한다. 따라서, 적절한 gRNA는 (단일 RNA 분자를 갖는) 단분자일 수 있고, 때때로 본원에서는 sgRNA로 지칭되거나, 모듈화될 수 있다(하나를 초과하는, 일반적으로는 2개의 분리된 RNA 분자를 포함함).

[0095] CD34 유전자에서 표적 부위를 표적화하기에 적합한 gRNA는 다수의 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어, Cas9 뉴클레아제가 사용되는 일부 구현예에서, 단분자 sgRNA는 5'에서 3'로 다음을 포함할 수 있다:

[0096] 상기 CD34 유전자의 표적 부위 서열에 상응하는 표적화 도메인;

[0097] 제1 상보성 도메인;

[0098] 연결 도메인;

[0099] (상기 제1 상보성 도메인에 상보적인) 제2 상보성 도메인;

[0100] 근위 도메인; 및

[0101] 선택적으로, 꼬리 도메인.

[0102] 이들 도메인 각각은 이제 보다 상세하게 설명된다.

[0103] 본원에 제공된 gRNA는 일반적으로 세포의 게놈에서 표적 부위에 결합하는 표적화 도메인을 포함한다. 표적 부위는 일반적으로 PAM 서열 및 PAM 서열과 동일한 가닥 상에, 그리고 PAM 서열에 직접 인접한 표적 도메인을 포함하는 이중 가닥 DNA 서열이다. gRNA의 표적화 도메인은, 때로는 하나 이상의 불일치와 함께 표적 도메인의 서열과 유사하다는 점에서 표적 도메인 서열에 상응하는 RNA 서열을 일반적으로 포함하지만, 일반적으로 DNA 서열 대신에 RNA를 포함한다. 따라서, gRNA의 표적화 도메인은 표적 도메인의 서열에 상보적인 이중 가닥 표적 부위의 서열과 (전체 또는 부분 상보성으로) 염기쌍을 이루며, 따라서 PAM 서열을 포함하는 가닥에 상보적인 가닥과 쌍을 이룬다. gRNA의 표적화 도메인은 일반적으로 PAM 서열을 포함하지 않는 것으로 이해될 것이다. PAM의 위치는 사용된 뉴클레아제에 따라 표적 도메인 서열의 5' 또는 3'일 수 있음을 추가로 이해할 것이다. 예를 들어, PAM은 일반적으로 Cas9 뉴클레아제에 대한 표적 도메인 서열의 3', 및 Cas12a 뉴클레아제에 대한 표적 도메인 서열의 5'이다. PAM의 위치 및 표적 부위에 결합하는 gRNA의 메커니즘의 예시는, 예를 들어, Vanegas 등의 *Fungal Biol Biotechnol*. 2019; 6: 6의 도 1을 참조하며, 이는 본원에 참조로서 통합된다. RNA 가이드 뉴클레아제를 표적 부위로 표적화하는 gRNA의 메커니즘에 대한 추가의 예시 및 설명은, Fu Y 등의 *Nat Biotechnol* 2014(doi: 10.1038/nbt.2808) 및 Sternberg SH 등의 *Nature* 2014(doi: 10.1038/nature13011)를 참조하고, 이들 모두는 참조로서 본원에 통합된다.

[0104] 표적화 도메인은 표적 도메인의 서열에 대응하는 뉴클레오티드 서열, 즉 PAM 서열에 바로 인접한 DNA 서열을 포함할 수 있다(예: Cas9 뉴클레아제의 경우 PAM 서열의 5', 또는 Cas12a 뉴클레아제의 경우 PAM 서열의 3'). 표적화 도메인 서열은 일반적으로 17 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함하고, (임의의 불일치 뉴클레오티드 없이) 표적 도메인 서열과 완전히 상응하거나, 하나 이상, 그러나 전형적으로 4개 이하의 불일치를 포함할 수 있다. 표적화 도메인은 RNA 분자인 gRNA의 일부이므로, 이는 일반적으로 리보뉴클레오티드를 포함하는 반면, DNA 표적화 도메인은 데옥시리보뉴클레오티드를 포함할 것이다.

[0105] 22개의 뉴클레오티드 표적 도메인을 포함하는 Cas9 표적 부위와 NGG PAM 서열, 그리고 표적 도메인에 완전히 상응하는 표적 도메인을 포함하는 gRNA의 예시적인 도면(따라서, 표적 도메인 및 PAM을 포함하는 가닥에 상보적인 DNA 가닥과 완전한 상보성을 갖는 염기쌍)이 아래에 제공된다. 상단에서 하단으로, 좌측에서 우측으로, 서열은 서열번호 24~26에 상응한다:

[0106] [표적 도메인(DNA)][PAM]

[0107] 5'-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-G-G-3' (DNA)

[0108] 3'-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-C-C-5' (DNA)

[0109] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

[0110] 5'-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-[gRNA 스캐폴드]-3' (RNA)

[0111] [표적화 도메인(RNA)][결합 도메인]

[0112] 22개의 뉴클레오티드 표적 도메인을 포함하는 Cas12a 표적 부위와 TTN PAM 서열, 그리고 표적 도메인에 완전히 상응하는 표적 도메인을 포함하는 gRNA의 예시적인 도면(따라서, 표적 도메인 및 PAM을 포함하는 가닥에 상보적인 DNA 가닥과 완전한 상보성을 갖는 염기쌍)이 아래에 제공된다. 위에서 아래로, 왼쪽에서 오른쪽으로 서열은 서열번호 27, 28 및 26에 상응한다:

[0113] [PAM][표적 도메인 (DNA)]

[0114] 5'-T-T-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-3' (DNA)

[0115] 3'-A-A-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-5' (DNA)

[0116] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

[0117] 5'-[gRNA 스캐폴드]-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-N-3' (RNA)

[0118] [결합 도메인][표적화 도메인 (RNA)]

[0119] 일부 구현예에서, Cas12a PAM 서열은 5'-T-T-T-V-V-3'이다.

[0120] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 적어도 일부 구현예에서, 표적화 도메인의 표적 서열과의 길이 및 상보성은 gRNA/Cas9 분자 복합체와 표적 핵산의 상호작용의 특이성에 기여하는 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA의 표적화 도메인은 5 내지 50 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 15 내지 25 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 18~22개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 19~21개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 15개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 16개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 17개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 18개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 19개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 20개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 21개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 22개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 23개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 24개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 적어도 25개 뉴클레오티드의 길이이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 본원에 제공된 표적 도메인 서열 또는 이의 일부에 불일치 없이 완전히 상응한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA의 표적화 도메인은 본원에 제공된 표적 도메인 서열에 대해 1개의 불일치를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 표적 도메인 서열에 대해 2개의 불일치를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 도메인은 표적 도메인 서열에 대해 3개의 불일치를 포함한다.

[0121] 일부 구현예에서, 표적화 도메인은, 예를 들어, PCT 공개 번호 WO2015/157070에 기술된 바와 같은 코어 도메인 및 이차 표적화 도메인을 포함하며, 이는 그 전체가 참조로서 통합된다. 일부 구현예에서, 코어 도메인은 표적화 도메인의 3' 말단으로부터 약 8 내지 약 13개의 뉴클레오티드(예를 들어, 표적화 도메인의 최대 3' 8 내지 13개의 뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이차 도메인은 코어 도메인에 대해 5'에 위치한다. 일부 구현예에서, 코어 도메인은 표적 도메인 서열 또는 이의 일부와 완전히 대응한다. 다른 구현예에서, 코어 도메인은 표적 도메인 서열의 상응하는 뉴클레오티드와 일치하지 않는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, 예를 들어, Cas9 gRNA가 제공되는 일부 구현예에서, gRNA는 제1 상보성 도메인 및 제2 상보성 도메인을 포함하되, 제1 상보성 도메인은 제2 상보성 도메인과 상보성이고, 적어도 일부 구현예에서는 적어도 일부 생리학적 조건 하에서 이중화된 영역을 형성하기에 제2 상보성 도메인에 대한 충분한 상보성을 갖는다. 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인은 5 내지 30 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인은 3개의 서브도메인을 포함하며, 5'에서 3' 방향으로 5' 서브도메인, 중앙 서브도메인, 및 3' 서브도메인이다. 일부 구현예에서, 5' 서브도메인은 4 내지 9, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구

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

[0123] 전술한 도메인의 서열 및 배치는 PCT 공개 번호 WO2015/157070에 보다 상세하게 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되며, 그 안에는 88-112페이지가 포함된다.

[0124] 연결 도메인은 제1 상보성 도메인을 단분자 gRNA의 제2 상보성 도메인과 연결하는 역할을 할 수 있다. 연결 도메인은 제1 및 제2 상보성 도메인을 공유적으로 또는 비공유적으로 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합은 공유결합이다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 제1 상보성 도메인과 제2 상보성 도메인 사이에 개재된 공유 결합이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 하나 이상의, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은, *예를 들어*, PCT 공개 번호 WO2018/126176에 개시된 바와 같이, 적어도 하나의 비-뉴클레오티드 결합을 포함하며, 이의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다.

[0125] 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과 적어도 부분적으로 상보성이고, 일 구현예에서는, 제2 상보성 도메인은 적어도 일부 생리학적 조건 하에서 이중 영역을 형성하기에 충분한 상보성을 갖는다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과 상보성이 결여된 서열, 예를 들어, 듀플렉스 영역으로부터 루프아웃되는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은 5 내지 27 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 영역보다 더 길다. 일 구현예에서, 상보적 도메인은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은 3개의 하위 도메인을 포함하며, 5'에서 3' 방향으로 5' 하위 도메인, 중앙 하위 도메인, 및 3' 하위 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 서브도메인은 3 내지 25, 예를 들어, 4 내지 22, 4 내지 18, 또는 4 내지 10, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 중앙 서브도메인은 1, 2, 3, 4 또는 5, 예를 들어, 3 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3' 서브도메인은 4 내지 9, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인의 5' 서브도메인 및 3' 서브도메인은 각각, 예를 들어, 제2 상보성 도메인의 3' 서브도메인 및 5' 서브도메인과 완전히 상보적이다.

[0126] 일부 구현예에서, 근위 도메인은 5 내지 20 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 근위 도메인은 자연적으로 발생하는 근위 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일 구현예에서, 이는 *S. 피오게네스, S. 아우레우스*, 또는 *S. 써모필러스* 유래의 근위 도메인과 적어도 50% 상동성을 갖는다.

[0127] 광범위한 꼬리 도메인 스펙트럼이 gRNA에 사용하기에 적합하다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 0(없음), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인 뉴클레오티드는 자연적으로 발생하는 꼬리 도메인의 5' 말단으로부터의 서열로부터 유래하거나 이의 서열과 상동성을 공유한다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 서로 상보적이고, 적어도 일부 생리학적 조건 하에서, 이중 영역을 형성하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 없거나 1 내지 50 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 자연적으로 발생하는 근위 꼬리 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 *S. 피오게네스, S. 아우레우스* 또는 *S. 써모필러스* 유래의 꼬리 도메인과 적어도 50% 상동성/동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 *시험관 내* 또는 *생체 내* 전사 방법과 관련된 뉴클레오티드를 3' 말단에 포함한다.

[0128] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 다음을 포함한다:

[0129] 예를 들어, 5'에서 3'을 포함하는 제1 가닥:

[0130] (CD34 유전자 내의 표적 도메인에 대응하는) 표적화 도메인; 및

[0131] 제1 상보성 도메인을 포함하고,

[0132] 예를 들어, 5'에서 3'을 포함하는 제2 가닥:

[0133] 임의로, 5' 연장 도메인;

[0134] 제2 상보성 도메인;

[0135] 근위 도메인; 및

[0136] 선택적으로, 꼬리 도메인을 포함한다.

[0137] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA 중 어느 하나는 화학적으로 변형된 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. gRNA의 화학적 변형은 이전에 기술되었고, 적절한 화학적 변형은 gRNA 기능에 유익한 임의의 변형을 포함하며, 주어진 gRNA의 임의의 원하지 않는 특성, 예를 들어, 오프 타겟 효과를 측정 가능하게 증가시키지 않는다. 적절한 화학적 변형은, 예를 들어, gRNA가 엔도- 또는 엑소뉴클레아제 촉매 활성에 덜 민감하게 하는 것들을 포함하고, 제한 없이, 포스포로티오에이트 골격 변형, 2′ -O-Me-변형(3' 및 5' 말단 중 하나 또는 둘 모두에서), 2'F-변형,리보스 당을 비시클릭 뉴클레오타이드-cEt로 대체, 3'thioPACE(MSP) 변형, 또는 이들의 조합을 포함한다. 추가적인 적절한 gRNA 변형은 본 개시에 기초하여 당업자에게 명백할 것이며, 이러한 적절한 gRNA 변형은, 예를 들어, Rahdar 등의 *PNAS* (2015) 112 (51) E7110-E7117 및 Hendel 등의 *Nat Biotechnol.* (2015); 33(9): 985-989, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0138] 예를 들어, 본원에 제공된 gRNA는 하나 이상의 2'-O 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 gRNA의 3' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 및 3' 말단 둘 다에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형, 예를 들어, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸-변형된다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형, 예를 들어, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸-변형된다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형, 예를 들어, gRNA의 5' 말단에서 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단에서 제2 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단에서 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단에서 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 변형된다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형, 예를 들어, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제4 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸-변형된다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-메틸-변형, 예를 들어, gRNA의 5' 말단으로부터 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터 제2 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단, gRNA의 3' 말단으로부터 제3 뉴클레오티드 및 gRNA의 3' 말단에서 제4 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸-변형된다. 일부 구현예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드에 대한 인산염 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드에 대한 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 2'-O-메틸 뉴클레오티드는 인접한 뉴클레오티드에 대한 티오PACE 결합을 포함한다.

[0139] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 하나 이상의 2'-O-변형 및 3' 인산-변형 뉴클레오티드, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 gRNA의 3' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 및 3' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 하나 이상의 비-브리징 산소 원자가 황 원자로 대체된 골격을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 5' 말단에서 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단에서 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단에서 제3 뉴클레오티드로서 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 5' 말단에서, gRNA의 5' 말단에서 제2 뉴클레오티드, gRNA의 제5' 말단에서 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 제2 뉴클레오티드, 및gRNA의 3' 말단에서 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3' 포스포로티오에이트-변형된다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제4 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'포스포티오에이트-변형된다. 일

부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 제5 말단, gRNA의 5' 말단에서 제2 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단에서 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단에서 제4 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다.

[0140] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 하나 이상의 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 gRNA의 3' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오티드를 gRNA의 5' 및 3' 말단에 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 하나 이상의 비-브리징 산소 원자가 황 원자로 치환되고 하나 이상의 비-브리징 산소 원자가 아세테이트기로 치환되는 골격을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3' 티오PACE-변형이다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형이다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3' 인산-변형, 예를 들어, 뉴클레오티드에서, gRNA의 5' 말단에서, gRNA의 5' 말단에서 유래된 제2 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단에서 유래된 제3 뉴클레오티드, 3' 말단에서 유래된 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 유래된 제3 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형이다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, gRNA의 3' 말단에서 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단에서 제4 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형이다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA는 2'-O-변형되고 3'-인-변형된, 예를 들어, gRNA의 5' 말단, gRNA의 5' 말단에서 제2 뉴클레오티드, 5' 말단에서 제3 뉴클레오티드, 3' 말단에서 제2 뉴클레오티드, 3' 말단에서 제3 뉴클레오티드, 3' 말단에서 제4 뉴클레오티드로서 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다.

[0141] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 화학적으로 변형된 골격을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 비-브리징 산소 원자는 황 원자로 대체되었다. 일부 구현예에서, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드는 각각 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드는 각각 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드는 각각 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제4 뉴클레오티드는 각각 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제4 뉴클레오티드는 각각 포스포로티오에이트 결합을 포함한다.

[0142] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 티오PACE 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 하나 이상의 비-브리징 산소 원자가 황 원자로 치환되고 하나 이상의 비-브리징 산소 원자가 아세테이트기로 치환되는 골격을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드는 각각 티오PACE 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드는 각각 티오PACE 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드는 각각 티오PACE 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제4 뉴클레오티드는 각각 티오PACE 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA의 5' 말단에서의 뉴클레오티드, gRNA의 5' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, 5' 말단으

로부터의 제3 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제2 뉴클레오티드, gRNA의 3' 말단으로부터의 제3 뉴클레오티드, 및 gRNA의 3' 말단으로부터의 제4 뉴클레오티드는 각각 티오PACE 결합을 포함한다.

[0143] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 gRNA는 하나 이상의 2′ -O-메틸-3′ -포스포로티오에이트 뉴클레오티드, 예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 2′ -O-메틸-3′ -포스포로티오에이트 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 gRNA는 3개의 말단 위치 중 하나 이상 및 5' 말단 및/또는 3개의 말단 위치 및 3' 말단 중 하나 이상에서 변형된 뉴클레오티드(예: 2′ -O-메틸-3′ -포스포로티오에이트 뉴클레오티드)를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는, 예를 들어, PCT 공개 번호 WO2017/214460, WO2016/089433, 및 WO2016/164356을 참조하고, 이들 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다.

[0144] 본원에 제공된 CD34 표적화 gRNA는 임의의 적합한 방식으로 세포에 전달될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템을 전달하기 위한 다양한 적절한 방법, 예를 들어, RNA 가이드 뉴클레아제에 결합된 gRNA를 포함하는 RNP를 포함하는 방법이 기술되었고, 예시적인 적절한 방법에는, RNP를 세포 내로 전기천공, Cas 뉴클레아제 및 gRNA를 암호화하는 mRNA를 세포 내로 전기천공, 다양한 단백질 또는 핵산 형질감염 방법, 및 암호화 RNA 또는 DNA 전달에는, 예를 들어, 레트로바이러스(예: 렌티바이러스) 벡터와 같은 바이러스 벡터를 통한 전달이 있다. 임의의 적절한 전달 방법이 본 개시에 의해 수용되고, 본 개시는 이와 관련하여 제한되지 않는다.

[0145] 본 개시는 인간 CD34에 RNA 가이드 뉴클레아제를 표적화하는 데 유용한 다수의 CD34 표적 부위 및 상응하는 gRNA를 제공한다. 아래 표 1은 본원에 기술된 gRNA에 의해 결합될 수 있는 인간 내인성 CD34 유전자의 바람직한 표적 도메인을 도시한다. 표 1에 나타낸 인간 CD34의 예시적인 표적 서열은, 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제, 예를 들어, SpCas9와 함께 사용하기 위한 것이다.

[0146] **표 1.** 인간 CD34의 예시적인 Cas9 표적 부위 서열이 제공되며, 이는 이러한 부위를 표적화하는 데 유용한 예시적인 gRNA 표적화 도메인 서열이다. 각각의 표적 부위에 대해, 제1 서열은 DNA 표적 도메인 서열을 나타내고, 제2 서열은 이의 역방향 보체를 나타내고, 제3 서열은 각각의 표적 부위를 표적화하는 데 사용될 수 있는 gRNA의 예시적인 표적화 도메인 서열을 나타낸다.

표 1

[0147]

gRNA 명칭	표적 도메인 서열
CD34-1	CAAAGCGCGGTCCAGCCCCG (서열번호: 1) CGGGGCTGGACCGCGCTTTG (서열번호: 6) CAAAGCGCGGUCCAGCCCCG (서열번호: 11)
CD34-2	CAAACTCAGCAAGCAAAGCG (서열번호: 2) CGCTTTGCTTGCTGAGTTTG (서열번호: 7) CAAACUCAGCAAGCAAAGCG (서열번호: 12)
CD34-3	GTGCAGGCTGGTACTTCCAA (서열번호: 3) TTGGAAGTACCAGCCTGCAC (서열번호: 8) GUGCAGGCUGGUACUUCCAA (서열번호: 13)
CD34-4	CATTGCCATGTTGAGACACA (서열번호: 4) TGTGTCTCAACATGGCAATG (서열번호: 9) CAUUGCCAUGUUGAGACACA (서열번호: 14)
CD34-5	ATAAACTGAGGTTATCACAG (서열번호: 5) CTGTGATAACCTCAGTTTAT (서열번호: 10) AUAAACUGAGGUUAUCACAG (서열번호: 15)

[0148] 본 개시는 인간 CD34에 RNA 가이드 뉴클레아제를 표적화하는 데 유용한 예시적인 CD34 표적화 gRNA를 제공한다. 아래 표 2는 인간 내인성 CD34 유전자에 Cas9 뉴클레아제를 표적화하는 gRNA에 사용하기 위한 바람직한 표적화 도메인을 도시한다. 표 2에 나타낸 인간 CD34의 예시적인 표적 서열은, 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제, 예를 들어, SpCas9와 함께 사용하기 위한 것이다.

표 2

[0149]

인간 CD34에 표적화된 gRNA의 예시적인 Cas9 표적화 도메인 서열이 제공된다.	
gRNA 명칭	표적화 도메인 서열
CD34-1	CAAAGCGCGGUCCAGCCCCG (서열번호: 11)

CD34-2	CAAACUCAGCAAGCAAAGCG (서열번호: 12)
CD34-3	GUGCAGGCUGGUACUUCCAA (서열번호: 13)
CD34-4	CAUUGCCAUGUUGAGACACA (서열번호: 14)
CD34-5	AUAAACUGAGGUUAUCACAG (서열번호: 15)

[0150] CD34의 대표적인 아미노산 서열은 아래에 나타낸 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 P28906-2에 의해 제공된다.

[0151] MLVRRGARAG PRMPRGWTAL CLLSLLPSGF MSLDNNGTAT PELPTQGTFS

[0152] NVSTNVSYQE TTTPSTLGST SLHPVSQHGN EATTNITETT VKFTSTSVIT

[0153] SVYGNTNSSV QSQTSVISTV FTTPANVSTP ETTLKPSLSP GNVSDLSTTS

[0154] TSLATSPTKP YTSSSPILSD IKAEIKCSGI REVKLTQGIC LEQNKTSSCA

[0155] EFKKDRGEGL ARVLCGEEQA DADAGAQVCS LLLAQSEVRP QCLLLVLANR

[0156] TEISSKLQLM KKHQSDLKKL GILDFTEQDV ASHQSYSQKT LIALVTSGAL

[0157] LAVLGITGYF LMNRRSWSPT GERLGEDPYY TENGGGQGYS SGPGTSPEAQ

[0158] GKASVNRGAQ ENGTGQATSR NGHSARQHVV ADTEL

[0159] (서열번호: 16)

[0160] CD34의 대표적인 DNA 서열은 아래에 나타낸 NCBI 참조 서열 번호 NM_001025109.2에 의해 제공된다.

[0161] agtgtcttcc actcggtgcg tctctctagg agccgcgcgg gaaggatgct ggtccgcagg

[0162] ggcgcgcgcg cagggcccag gatgccgcgg ggctggaccg cgctttgctt gctgagtttg

[0163] ctgccttctg ggttcatgag tcttgacaac aacggtactg ctaccccaga gttacctacc

[0164] cagggaacat tttcaaatgt ttctacaaat gtatcctacc aagaaactac aacacctagt

[0165] acccttggaa gtaccagcct gcaccctgtg tctcaacatg gcaatgaggc cacaacaaac

[0166] atcacagaaa cgacagtcaa attcacatct acctctgtga taacctcagt ttatggaaac

[0167] acaaactctt ctgtccagtc acagacctct gtaatcagca cagtgttcac caccccagcc

[0168] aacgtttcaa ctccagagac aaccttgaag cctagcctgt cacctggaaa tgtttcagac

[0169] ctttcaacca ctagcactag ccttgcaaca tctcccacta aaccctatac atcatcttct

[0170] cctatcctaa gtgacatcaa ggcagaaatc aaatgttcag gcatcagaga agtgaaattg

[0171] actcagggca tctgcctgga gcaaaataag acctccagct gtgcggagtt taagaaggac

[0172] aggggagagg gcctggcccg agtgctgtgt ggggaggagc aggctgatgc tgatgctggg

[0173] gcccaggtat gctccctgct ccttgcccag tctgaggtga ggcctcagtg tctactgctg

[0174] gtcttggcca acagaacaga aatttccagc aaactccaac ttatgaaaaa gcaccaatct

[0175] gacctgaaaa agctggggat cctagatttc actgagcaag atgttgcaag ccaccagagc

[0176] tattcccaaa agaccctgat tgcactggtc acctcgggag ccctgctggc tgtcttgggc

[0177] atcactggct atttcctgat gaatcgccgc agctggagcc ccacaggaga aaggctgggc

[0178] gaagaccctt attacacgga aaacggtgga ggccagggct atagctcagg acctgggacc

[0179] tcccctgagg ctcagggaaa ggccagtgtg aaccgagggg ctcaggaaaa cgggaccggc

[0180] caggccacct ccagaaacgg ccattcagca agacaacacg tggtggctga taccgaattg

[0181] tgactcggct aggtggggca aggctgggca gtgtccgaga gagcacccct ctctgcatct

[0182] gaccacgtgc tacccccatg ctggaggtga catctcttac gcccaaccct tccccactgc

[0183] acacacctca gaggctgttc ttggggccct acaccttgag gaggggcagg taaactcctg

[0184] tcctttacac attcggctcc ctggagccag actctggtct tctttgggta aacgtgtgac

[0185] gggggaaagc caaggtctgg agaagctccc aggaacaatc gatggccttg cagcactcac

[0186] acaggacccc cttcccctac cccctcctct ctgccgcaat acaggaaccc ccaggggaaa

[0187] gatgagcttt tctaggctac aattttctcc caggaagctt tgatttttac cgtttcttcc

[0188] ctgtattttc tttctctact ttgaggaaac caaagtaacc ttttgcacct gctctcttgt

[0189] aatgatatag ccagaaaaac gtgttgcctt gaaccacttc cctcatctct cctccaagac

[0190] actgtggact tggtcaccag ctcctccctt gttctctaag ttccactgag ctccatgtgc

[0191] cccctctacc atttgcagag tcctgcacag ttttctggct ggagcctaga acaggcctcc

[0192] caagttttag gacaaacagc tcagttctag tctctctggg gccacacaga aactcttttt

[0193] gggctccttt ttctccctct ggatcaaagt aggcaggacc atgggaccag gtcttggagc

[0194] tgagcctctc acctgtactc ttccgaaaaa tcctcttcct ctgaggctgg atcctagcct

[0195] tatcctctga tctccatggc ttcctcctcc ctcctgccga ctcctgggtt gagctgttgc

[0196] ctcagtcccc caacagatgc ttttctgtct ctgcctccct caccctgagc cccttccttg

[0197] ctctgcaccc ccatatggtc atagcccaga tcagctccta acccttatca ccagctgcct

[0198] cttctgtggg tgacccaggt ccttgtttgc tgttgatttc tttccagagg ggttgagcag

[0199] ggatcctggt ttcaatgacg gttggaaata gaaatttcca gagaagagag tattgggtag

[0200] atatttttc tgaatacaaa gtgatgtgtt taaatactgc aattaaagtg atactgaaac

[0201] acatctgtta tgtgactctg tcttagctgg gtgtgtctgc atgcaagagt gacaccctcc

[0202] attagaccta gctagactgt gcagtgatgt ggtggggagg accagccagg gaagagggag

[0203] cacctcagca gacacaggca ccagccagga tgctaaggac ctttagccaa gtctgccaac

[0204] tattctcctc catggggaga ggaaacatcc atttccagtg gtagaaaggc agacccgaat

[0205] gtaccaggga gcttccaaat ggagggtggt atgttgggtt cttaggagct gtacccttca

[0206] tgaacaccct tctgagaaga ggagcatgct gatcactgct gcaaaatatg caaaacaaag

[0207] ggaaggggca atgtcctgtg cacctttat tatcaggcca ccccctccc cagcccccca

[0208] ggtcagagta gacacagtga aggactatgt ggggactgtt gttctagaga cctggcagcc

[0209] aactcaggga gggggctggt ttccaccctc aagattaaga cagcagccta attaaaaaaa

[0210] aaatctgtaa gcatgtacct ccccccagct tccaaaacaa cccccacccc acccctacca

[0211] ggccatagga agttggggag ggagtgctga ggagctccag gaaacactcc caagtgtgtc

[0212] gacagtggca gaggcagttg gggccaaaca aaggttgatt cttccattct tatctccata

[0213] aagccagacc tttcccttca gcactcctcc acccccatct ccttcttgct tttctccaac

[0214] tcctctaatc ataggttctt ccctaggaca gaggggaggc gaaatgatga ggttcagagt

[0215] cttccctcaa aggcgatggc tgccttgagg gttggagcaa aggatgatga gcaaaagacg

[0216] atggtaatca gtagggaagt ccagcccact tgcatctagt tgcacatctt gccttgagag

[0217] taatccagtg agggtctgtc ccagctagga catcaagtag gaggggtggg ttcagggttc

[0218] agattcctag gaaatatggg aggagaggaa aaggcaactt ggatgcacct ccagcttcag

[0219] gcctagcaac ctgcaatgca tctcaccctg agtttgctgg aatgtgtatg tatgctttgg

[0220] gaggaagggc tgtgtgtgta ttgcggggtg gggtggggca gctggttccc tctgacagct

[0221] ggacagcttg ccctgaagaa tttgcctgct ttctggaaaa atccaacttt cccaccgtgg

[0222] gcctgagcgt cctggtacag caatggcgcc acctgctggc cttattgagg tcctactgct

[0223] cagcctcagc tcaatcgcct ccatgttggg cttctctccc tggctgcccc accctctagt

[0224] ccaatttctc ttgtacacaa agctcatata actatagaac gtcactgttg aagagaactt

[0225] taaagataca tttaattaaa ctcccttatg gtatagttaa agacaaacta aggctcagag

[0226] aagggaggtg gcttgcccaa tcacccagaa ttccaaagtc ctgaatctgt agttttccct

[0227] tccatcatat catcctactc ttctgccgag tcctccgtgt tactccagtt ggatgtcatg

[0228] aagccagtgt ggcagtgtga agataggttt gggacttcac ttctggagca tttcatcaac

[0229] ataagctatc ctaggcctgg ccagccaagc aggtcctgga ggagccccag gacaaagatc

[0230] acaggaggcc atgaggttcg gcttcttcgg cgcccacagt gagcccagga aaattagctg

[0231] tagggtatta cactgttgac tatggagagc atatctggaa ttatcttcag ccagattttc

[0232] atctgaatgg ataaatggga ataccatcta agtccagata aatagatcac ttccatctca

[0233] tcccttctag gtagattaat cccacacttc ctcttcacac aaaaccagta ataggtcatc

[0234] gattttgtgc aacaggatgc tgcttctctt cctaaagccc ccatcgaaga ggcttccagc

[0235] caccattcaa tcattcatca agtcttatga tgtgccagac actgcgcgaa atgtgccaga

[0236] acatctgtta tgtgccagac actgttcttg agactgggga tacagcaaac actcatgaag

[0237] cttataattc tagcagaaga ggacagtaaa caatgtcatc tcagtaagta tatacatgtg

[0238] ttttcaggat tgagagctat gaaaaacata aaatatattg agaataatgg ttggtatttt

[0239] acatatggtg gttactttta gaaaaataac agtggagagc acagcttcac ttgaatgaag

[0240] tggagaagca ggttgtatgc caagctggga gagattatcc cacacagggg aaaggacaag

[0241] tgcaaagccc tatgatgaaa agctgccaag tgcagaaagc ctcagatggc agggggcaag

[0242] atggccatga ggttgtgtca gtgagtgggg gtggggagag gcaggaggtc agactacatg

[0243] gggccttttt agttgtagat tgggaagcca ctggagggtt ttgagcagag aagtcatatc

[0244] atctgcttta tgttttaaaa ggatcatgct ggctgctgag tagagaatag aggttgaggg

[0245] ataagaaagt agaaggagac cgtagcaaga agaacgatca tggctgggag caggtgatca

[0246] tattggcagt gatgagatca agcagaattc aaaaagtggt ttcaaagtag aggtaacagg

[0247] acttgctcag tctatttatt tcttcaaata ataatcatat ttacaatgat agtagctaac

[0248] agtttttgag tgcttactgt atgaaaattg agatatggtg ccaatattta aatagcatat

[0249] tttacttaac attcacagaa accctgtgaa gtaggttcta ttatctcaga aaaagaaact

[0250] gaaactcaga gaataacaag ggactgtgtt acgtgcacag tggcagaggc aaagatgaat

[0251] aggatgtgag tttatttgaa ccccaaatgt ttaaatcttg gggataatac aacacacatt

[0252] taaacaaaga agcaagaaaa aaaatgcaca acagaaagtg agaaataaca cgaggaaaga

[0253] ctaaatgaag tgctttgtat ctagatgtgg gcaggaccct ttccagctga gaagatctga

[0254] gactgggtca tgaacaggtg gtttctgagt gggtcctgta aaaatgaata cgattttgat

[0255] gatagtaatg agtaaggaca tttgagactg atagaagagt acatacaata tgtagtgatg

[0256] gggaaagata aggtactgtc aaaggacaat gtgttttctg gtatgacaga gaagtagaat

[0257] gtgttaaggg aagccgagta ccagaaagat ccgggtgtca cagtttgtgt agggtgttta

[0258] aagctaaacc acagagttta attttatcca atagaagagg agccacagaa gagtttccat

[0259] ttattcatta atttattcat ttattcaaaa aatatttgag tgcttattat aagccaggta

[0260] ctatgccagg cacctgggat aagacatagt cccttctgtc aagtctttac attgggtgga

[0261] tgtgggaggg acagatgaca gaacaatatg cattgagtgt aagtgctatg gtataggaag

[0262] ctctgagtgg gaggggcatg gaagccgtgg aagaccatgg aaggcttccc aggagaagtg

[0263] acgtctggac tgatcctttg gtcaagcagg agttaaagag gagaaaagga gagatatggg

[0264] tgttcccgag agaggaagaa gccttgtccc aggagcaaag tgagggtgat tgttccagaa

[0265] atgtgagtga ttcttttaag gctcaagcaa agcatgtgat tcttctttat accttctatt

[0266] tctttgctga gtgtttctgt tcttttgttt caagcatgct gcaattgctc attaaagcat

[0267] gtttatgatg gctgtctgtt ttaaaattct tgtcagatgg tttcaacatc tttatcatct

[0268] caatgttggc atctgttaat ggtttttttct caatcaaatt gagattttcc tggttcttgg

[0269] tattaccagt gattttaatt gcatctggaa atttgggatt tatgttgaaa gactggatct

[0270] tattgaaaga ttctgtttag cacccctcct ttgataccac actggtgggt ccaggttccc

[0271] cattcagctg ttgacacctt cagggcagag aggtgggatg gggtgaaggg ggtacctcat

[0272] tattgctggc ccaggttaga agttcaggct tcccagtaga tctctgctga taccaccctg

[0273] gtgccatgtc attccttgag tccaaaagtc cctcccaatt ctgccttctt ctctctacat

[0274] atcggagtct ccctatgttt gacttatata taatgtccag ggtttttaga gttagttaac

[0275] aggaggcata agaaaaagtg tgtccactcc atcttgtctg gaactggaag ttcaagtcga

[0276] atataagaga gaggagagga aattacaagc catgagactg gagagttagg caggttctac

[0277] accagctatt ctcaaagccc tcttacactc ttaaaaattt agaacttcaa agagcttttg

[0278] attttgaaag ttacatctat caattattac tgtttcaaaa attaaaattg agaaaatttt

[0279] atttattaat ttgtttaaaa ataacaataa ttattcaatt acatgataat gtaagtaatg

[0280] cttttcttaa tgaaaaataa ttatattttc caaaacaaaa acaattagga aaaagagtgt

[0281] cattgtttta gactttggta aatctctcta atatctggct gaagagaaga atgctgattc

[0282] ttttttttttt ttttttttttt tgagacggag tctcgctctg tcacccaggc tggagtgtag

[0283] tggtgtgatc tcggctcact gcaagctctg cctcccgggt tcacgccatt ctcctgcctc

[0284] agcctcccaa gtagctggga ctacaggcac ccgccaccac gcccggctaa ttttttttgta

[0285] tttttagtag agatggggtt tcaccgtgtt agccaggctg gtctcgatct cctgacctca

[0286] tgatccaccc acctcagcct cccaaagcgc tgggattaca ggtgtgagac accgcgccca

[0287] gcccccgaat gctgattctt ttatctgctt ctgtattcaa tctgttgtga tatgatgggt

[0288] agcctctgaa acactccact gtatacttgt gaaagaatga atgtgaaaaa ggaaaataga

[0289] tttgtagtat tattattcaa attgttttga cctcagagac cacttggaaa tgttttaggg

[0290] aacccccaga ggaccttgga tcatgctttg agaaccgcgg ctctagatat gttactattt

[0291] cagtagcatc taagtacatg tggctgctga gcacttgtaa tgtggctagt gcaaatgaga

[0292] gacaggactt ccagctatat gtaatttaat aaactcaaat ttaaaaactg gaacctcata

[0293] aaatgttttg ttgttgttgt taaacatgac cttatagttt tggtaggaa (서열번호: 17)

[0294] CD34의 추가의 대표적인 DNA 서열은 아래에 나타낸 NCBI 참조 서열 번호 NM_001773.3에 의해 제공된다.

[0295] agtgtcttcc actcggtgcg tctctctagg agccgcgcgg gaaggatgct ggtccgcagg

[0296] ggcgcgcgcg cagggcccag gatgccgcgg ggctggaccg cgctttgctt gctgagtttg

[0297] ctgccttctg ggttcatgag tcttgacaac aacggtactg ctaccccaga gttacctacc

[0298] cagggaacat tttcaaatgt ttctacaaat gtatcctacc aagaaactac aacacctagt

[0299] acccttggaa gtaccagcct gcaccctgtg tctcaacatg gcaatgaggc cacaacaaac

[0300] atcacagaaa cgacagtcaa attcacatct acctctgtga taacctcagt ttatggaaac

[0301] acaaactctt ctgtccagtc acagacctct gtaatcagca cagtgttcac caccccagcc

[0302] aacgtttcaa ctccagagac aaccttgaag cctagcctgt cacctggaaa tgtttcagac

[0303] ctttcaacca ctagcactag ccttgcaaca tctcccacta aaccctatac atcatcttct

[0304] cctatcctaa gtgacatcaa ggcagaaatc aaatgttcag gcatcagaga agtgaaattg

[0305] actcagggca tctgcctgga gcaaaataag acctccagct gtgcggagtt taagaaggac

[0306] aggggagagg gcctggcccg agtgctgtgt ggggaggagc aggctgatgc tgatgctggg

[0307] gcccaggtat gctccctgct ccttgcccag tctgaggtga ggcctcagtg tctactgctg

[0308] gtcttggcca acagaacaga aatttccagc aaactccaac ttatgaaaaa gcaccaatct

[0309] gacctgaaaa agctggggat cctagatttc actgagcaag atgttgcaag ccaccagagc

[0310] tattcccaaa agaccctgat tgcactggtc acctcgggag ccctgctggc tgtcttgggc

[0311] atcactggct atttcctgat gaatcgccgc agctggagcc ccacaggaga aaggctggag

[0312] ctggaaccct gaccactctt caggaagaaa ggagtctgca catgcagctg caccctccct

[0313] ccgatccttc ctcccacctc cccctccccc ttctcccacc cctgccccca cttcctgttt

[0314] gggcccctct cccatccagt gtctcacagc cctgcttacc agataatgct actttattta

[0315] tacactgtct agggcgaaga cccttattac acggaaaacg gtggaggcca gggctatagc

[0316] tcaggacctg ggacctcccc tgaggctcag ggaaaggcca gtgtgaaccg aggggctcag

[0317] gaaaacggga ccggccaggc cacctccaga aacggccatt cagcaagaca acacgtggtg

[0318] gctgataccg aattgtgact cggctaggtg gggcaaggct gggcagtgtc cgagagagca

[0319] cccctctctg catctgacca cgtgctaccc ccatgctgga ggtgacatct cttacgccca

[0320] acccttcccc actgcacaca cctcagaggc tgttcttggg gccctacacc ttgaggaggg

[0321] gcaggtaaac tcctgtcctt tacacattcg gctccctgga gccagactct ggtcttcttt

[0322] gggtaaacgt gtgacggggg aaagccaagg tctggagaag ctcccaggaa caatcgatgg

[0323] ccttgcagca ctcacacagg acccccttcc cctacccccc cctctctgcc gcaatacagg

[0324] aacccccagg ggaaagatga gcttttctag gctacaattt tctcccagga agctttgatt

[0325] tttaccgttt cttccctgta ttttctttct ctactttgag gaaaccaaag taacctttg

[0326] cacctgctct cttgtaatga tatagccaga aaaacgtgtt gccttgaacc acttccctca

[0327] tctctcctcc aagacactgt ggacttggtc accagctcct cccttgttct ctaagttcca

[0328] ctgagctcca tgtgcccccc ctaccatttg cagagtcctg cacagttttc tggctggagc

[0329] ctagaacagg cctcccaagt tttaggacaa acagctcagt tctagtctct ctggggccac

[0330] acagaaactc tttttgggct ccttttttctc cctctggatc aaagtaggca ggaccatggg

[0331] accaggtctt ggagctgagc ctctcacctg tactcttccg aaaaatcctc ttcctctgag

[0332] gctggatcct agccttatcc tctgatctcc atggcttcct cctccctcct gccgactcct

[0333] gggttgagct gttgcctcag tcccccaaca gatgcttttc tgtctctgcc tccctcaccc

[0334] tgagcccctt ccttgctctg caccccccata tggtcatagc ccagatcagc tcctaaccct

[0335] tatcaccagc tgcctcttct gtgggtgacc caggtccttg tttgctgttg atttctttcc

[0336] agaggggttg agcagggatc ctggtttcaa tgacggttgg aaatagaaat ttccagagaa

[0337] gagagtattg ggtagatatt ttttctgaat acaaagtgat gtgtttaaat actgcaatta

[0338] aagtgatact gaaacaca (SEQ ID NO: 18)

[0339] 본 개시의 일부 양태는 CD34의 발현 손실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 내 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포의 게놈에서의 변형은 CD34를 암호화하는 게놈 서열에서의 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 게놈 편집을 통해, 예를 들어, 본원에 제공된 CD34 표적 부위를 표적화하는 Cas 뉴클레아제 및 gRNA를 사용하거나 본원에 제공된 표적화 도메인 서열을 포함하는 방식으로 수행된다.

[0340] 본원에 제공된 조성물, 방법, 전략 및 치료 방법은 임의의 세포 또는 세포 유형에 적용될 수 있지만, 본 발명의 양태에 따른 CD34 유전자의 게놈 변형에 특히 적합한 일부 예시적인 세포 및 세포 유형은 본원에서 더 상세히 기술된다. 그러나, 당업자는 이러한 실시예의 제공이 일부 특정 구현예를 예시하기 위한 것이며, 추가의 적절한 세포 및 세포 유형이 본 개시에 기초하여 당업자에게 명백할 것이며, 이는 이와 관련하여 제한되지 않음을 이해할 것이다.

[0341] 본 개시의 일부 양태는 CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 내 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 조혈 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포는 이들의 게놈에 변형을 포함하여 동일한 세포 유형의 조혈 세포(예를 들어, HSC)와 비교하여, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의한 CD34의 세포 표면 발현 감소 및/또는 결합 감소를 초래하지만, 게놈 변형을 포함하지는 않는다. 일부 구현예에서, 조혈 세포는 조혈 줄기 세포(HSC)이다. 일부 구현예에서, 조혈 세포는 조혈 전구 세포(HPC)이다. 일부 구현예에서, 조혈 세포는 조혈 줄기 또는 전구 세포이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, HSC는 자가-재생할 수 있고 조혈계의 모든 계통을 생성 및/또는 재구성할 수 있는 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, HSC는 대상체에게 생착될 수 있으며, 여기서 HSC는 확장되고 조혈계의 모든 계통을 생성 및/또는 재구성할 수 있다. 일부 구현예에서, HSC는 하나 이상의 세포 표면 마커, 예를 들어, CD34를 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 HSC)는 일반적으로 HSC 식별 또는 단리와 관련된 하나 이상의 세포 표면 마커를 발현하지 않으며, 감소된 양의 세포 표면 마커를 발현하고, 또는 세포 표면 마커를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 세포 표면 마커를 발현하고, 그럼에도 불구하고, 자가 재생이 가능하고, 조혈계의 모든 계통을 생성 및/또는 재구성할 수 있다.

[0342] 일부 구현예에서, CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 이들의 게놈에 변형을 포함하는 조혈 세포(예를 들어, HSC 또는 HPC)는 본원에 기술된 바와 같은 뉴클레아제 및/또는 인간 CD34를 표적으로 하는 gRNA를 사용해 생성된다. 이러한 세포는 세포를 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 접촉시킴으로써 생성될 수 있거나, 세포는 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 접촉된 세포의 딸 세포일 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 HSC 또는 HPC)는 HSC 또는 HPC 특새를 채울 수 있고/있거나 대상체의 조혈계를 재구성할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포(예를 들어, HSC 또는 HPC)는 인간 대상체에서 생착(engrafting), 골수 계통 세포 생

산, 및 림프 계통 세포 생산 중 하나 이상(예를 들어, 전부)이 가능하다. 일부 바람직한 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 조혈 세포, 또는 이의 자손은, 바람직하게는 동일한 세포 유형의 조혈 세포에 비해 임의의 분화 편향 없이, 모든 혈액 세포 계통으로 분화될 수 있지만, CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 변형을 포함하지 않는다.

[0343] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 단 하나의 게놈 변형, 예를 들어, CD34의 발현 손실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 변형을 포함한다. 본원에 제공된 유전자 편집 방법은 표적 유전자의 한쪽 또는 양쪽 대립유전자에서 게놈 변형을 초래할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 주어진 유전자좌의 양쪽 대립유전자에서 게놈 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 세포가 바람직하다.

[0344] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 2개 이상의 게놈 변형, 예를 들어, CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 변형에 더하여 하나 이상의 게놈 변형을 포함한다.

[0345] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 변형을 포함하고, 키메라 항원 수용체를 암호화하는 발현 작제물을, 예를 들어, 세포의 게놈에 통합된 CAR을 암호화하는 발현 작제물의 형태로 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD34에 결합하는 결합 도메인, 예를 들어, 항체 단편을 포함한다.

[0346] 본 개시의 일부 양태는 CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈의 변형을 포함하는 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 림프구이다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 T 림프구이다. 일부 구현예에서, T 림프구는 알파/베타 T 림프구이다. 일부 구현예에서, T 림프구는 감마/델타 T 림프구이다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 자연 살해 T(NKT) 세포이다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 자연 살해 (NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 내인성 이식 유전자, 예를 들어, 유전자 이식 단백질을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 CD34를 표적으로 하는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 CD34를 표적으로 하는 CAR을 발현하지 않는다.

[0347] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 CD34의 발현 상실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 초래하는 게놈 변형을 포함하고, 외인성 단백질을 암호화하는 발현 작제물을 포함하지 않으며, 예를 들어, CAR을 암호화하는 발현 작제물을 포함하지 않는다.

[0348] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 CD34 단백질을 실질적으로 발현하지 않으며, 예를 들어, 면역 염색 방법과 같은 적절한 방법에 의해 측정될 수 있는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 야생형 CD34 단백질을 실질적으로 발현하지 않지만, 돌연변이 CD34 단백질 변이체를 발현하며, 예를 들어, CD34를 표적으로 하는 면역치료제, 예를 들어, CAR-T 세포 치료제, 또는 항-CD34 항체, 항체 단편, 또는 항체-약물 접합체(ADC)에 의해 인식되지 않는 변이체를 발현한다.

[0349] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포이다. 조혈 세포는 일반적으로 다능성, 자가-재생 특성, 및/또는 조혈계의 세포를 생성하는 능력을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 조혈 줄기 세포(HSC)는 골수 세포(예를 들어, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호염기구, 수지상 세포, 적혈구, 혈소판 등) 및 림프 세포(예를 들어, T 세포, B 세포, NK 세포)를 각각 추가로 생성하는 골수 전구 세포 및 림프 전구 세포 둘 다의 증가를 야기할 수 있다. 일부 구현예에서, HSC는 세포 표면 마커 CD34(예: CD34+)의 발현을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, CD34는 HSC의 식별 및/또는 단리를 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세포 표면 마커, 예를 들어, CD34의 부재는 세포 계통에 대한 약속과 연관된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 HSC)는 CD34를 발현하지 않거나, CD34를 감소된 수준으로 발현하거나, CD34 변이체를 발현하지 않는다(예를 들어, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않음). 일부 이러한 구현예에서, 예를 들어, 유전적으로 조작된 HSC가 CD34의 완전한 발현 상실을 특징으로 하는 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포는 CD34의 발현에 의해 HSC로서 식별하거나 분리할 수 없다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 HSC는 CD34를 발현하지 않거나, 감소된 수준으로 CD34를 발현하거나, (예를 들어, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는) CD34 변이체를 발현하지만, 그럼에도 불구하고 자체 재생될 수 있는 HSC이다.

[0350] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 유전적으로 조작된 HSC, 예를 들어, CD34를 발현하지 않거나, CD34를 감소된 수준으로 발현하거나, CD34 변이체를 발현하는 HSC는 CD34의 발현에 의해 HSC로서 식별될 수 없거나 분리될 수 없지만, 여전히 HSC로서, 예를 들어, HSC의 다른 특성에 의해 식별될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 유전적으로 조작된 HSC(예: CD34를 발현하지 않거나, CD34를 감소된 수준으로 발현하거나, CD34 변이체를 발현하는 HSC)는 CD34 프로모터 활성의 상태 또는 그의 게놈에서 CD34 프로모터의 후성적 상태, 예를 들어, 내인성 CD34 프로모터에 의해 구동되는 이종 리포터 작제물을 통해, 또는 CD34 프로모터 메틸화 상태(또는 기타 적절한 후성 마커)를 통해 HSC로서 식별될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 유전적으로 조작된 HSC, 예를 들어, CD34를 발현하지 않거나, CD34를 감소된 수준으로 발현하거나, CD34 변이체를 발현하는 HSC는, 예를 들어, 이러한 발현 프로파일이 편집되지 않은 HSC와 일치하거나 매우 유사하다는 점에서 다른 HSC 마커의 발현 프로파일에 의해 HSC로서 식별될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 유전적으로 조작된 HSC, 예를 들어, CD34를 발현하지 않거나, CD34를 감소된 수준으로 발현하거나, CD34 변이체를 발현하는 HSC는 수용자 대상체, 예를 들어, 이를 필요로 하는 인간 대상체에게 생착하는 능력에 의해 HSC로서 식별될 수 있고, 모든 조혈 세포 계통을 재구성할 수 있다.

[0351] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포의 집단은 복수의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포의 집단은 복수의 유전적으로 조작된 조혈 전구 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포의 집단은 복수의 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포 및 복수의 유전적으로 조작된 조혈 전구 세포를 포함한다.

[0352] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 HSC는 인간 대상체와 같은 대상체로부터 수득된다. HSC를 수득하는 방법은, 예를 들어, 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 PCT 출원 번호 US2016/057339에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, HSC는 말초 혈액 HSC이다. 일부 구현예에서, 포유류 대상체는 비인간 영장류, 설치류(예: 마우스 또는 쥐), 소, 돼지, 말 또는 가축이다. 일부 구현예에서, HSC는 조혈 악성 종양을 가진 인간 대상체와 같은 인간 대상체로부터 수득된다. 일부 구현예에서, HSC는 건강한 공여자로부터 수득된다. 일부 구현예에서, HSC는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 후속하여 투여될 대상으로부터 수득된다. 세포가 수득된 동일한 대상체에게 투여되는 HSC는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 수득되는 HSC는 동종 세포로서 지칭된다.

[0353] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포의 집단은 세포의 이종 집단, 예를 들어 상이한 CD34 돌연변이를 함유하는 유전적으로 조작된 세포의 이종 집단이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 세포의 모집단에서 CD34를 암호화하는 유전자의 카피의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 본원에 기술된 게놈 편집 접근법에 의해, 예를 들어, 본원에 제공된 gRNA를 사용하는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 영향을 받는 돌연변이를 포함한다. 예로서, 유전적으로 조작된 세포의 집단은 복수의 상이한 CD34 돌연변이를 포함할 수 있고, 복수의 각각의 돌연변이는 돌연변이를 갖는 세포의 집단에서 CD34의 카피의 백분율에 기여할 수 있다.

[0354] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 세포(예를 들어, HSC) 상에서의 CD34의 발현은 자연적으로 발생하는 조혈 세포(예를 들어, 야생형 대응체), 예를 들어, 자연적으로 발생하는 HSC 상에서의 CD34의 발현과 비교된다. 일부 구현예에서, 유전자 공학은 자연 발생 조혈 세포(예: 야생형 대응체)에서 CD34의 발현에 비해 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%만큼 CD34의 발현 수준을 감소시킨다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 세포는, 자연적으로 발생하는 조혈 세포(예: 야생형 대응체) 대비 20% 미만, 19% 미만, 18% 미만, 17% 미만, 16% 미만, 15% 미만, 14% 미만, 13% 미만, 12% 미만, 11% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만의 CD34를 발현한다.

[0355] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 공학(예: 본원에 기술된 바와 같은 gRNA 표적화 CD34를 사용하는 단계)은 자연적으로 발생하는 조혈 세포(예: 야생형 대응체)에서 야생형 CD34의 발현 수준 대비 야생형 CD34의 발현 수준을 적어도 50%만큼, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%만큼 감소시킨다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 세포는, 자연적으로 발생하는 조혈 세포(예: 야생형 대응체) 대비 20% 미만, 19% 미만, 18% 미만, 17% 미만, 16% 미만, 15% 미만, 14% 미만, 13% 미만, 12% 미만, 11% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1%

미만의 CD34를 발현한다.

[0356] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 공학(예: 본원에 기술된 바와 같은 gRNA 표적화 CD34를 사용하는 단계)은 적절한 대조군(예: 세포 또는 복수의 세포) 대비 야생형 계통 특이적 세포 표면 항원(예를 들어, CD34)에 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 만큼 감소시킨다. 일부 구현예에서, 적절한 대조군은 동일한 대상체로부터의 복수의 비조작 세포에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통 특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함한다. 일부 구현예에서, 적절한 대조군은 건강한 대상체로부터의 복수의 세포에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통 특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함한다. 일부 구현예에서, 적합한 대조군은 건강한 개체(예를 들어, 10, 20, 50, 또는 100명의 개체)의 풀로부터의 세포 집단에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통 특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함한다. 일부 구현예에서, 적절한 대조군은 본원에 기술된 치료, 예를 들어 항-CD34 요법을 필요로 하는 대상체에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통 특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함하며, 여기서 대상체는 암을 앓고 있고, 여기서 암 세포는 CD34를 발현한다.

[0357] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포를 유전적으로 조작하는 방법은 야생형 세포, 예를 들어, 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 야생형 세포는 CD34를 암호화하는 유전자의 2개의 기능적 카피를 포함하는(예를 들어, 발현 중인) 편집되지 않은 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 서열번호 113에 따른 CD34 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열번호 17 또는 18로 암호화된 CD34 단백질을 암호화하는 CD34 유전자 서열을 포함한다. 예를 들어, CD34 유전자 서열은 서열번호 17 또는 18에 대해 상대적으로 하나 이상의 침묵 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 사용된 세포는 자연적으로 발생하는 세포 또는 조작되지 않은 세포이다. 일부 구현예에서, 야생형 세포는 CD34를 발현하거나, CD34를 발현하는 세포주와 유사한 수준(또는 CD34를 발현하는 세포주의 90%~110%, 80%~120%), 70%~130%, 60~140%, 또는 50%~150% 이내)으로 CD34를 발현하는 보다 분화된 세포를 생성한다.

[0358] 일부 구현예에서, 야생형 세포는 CD34에 결합하는 항체(예를 들어, 항-CD34 항체)에 결합하거나, CD34를 발현하는 세포주 (예: L1236, L428, KM-H25, KM2L591)에 대한 항체의 결합과 유사한 수준(또는 90%~110%, 80%~120%, 70%~130%, 60~140%, 또는 50%~150% 이내)으로 이러한 항체에 결합하는 더 분화된 세포를 생성시킨다. 항체 결합은, 예를 들어, 유세포 계측법 또는 면역조직화학법에 의해 측정될 수 있다.

[0359] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CD34 편집된 세포는 CD34 편집된 조혈 줄기 세포(HSC)이다. 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 조혈 줄기 세포는, 예를 들어, 임상 환경에서, 모든 조혈 계통으로의 분화, 및 예를 들어, 조혈 줄기 이식 후 수용자의 조혈계를 재구성하는 수용자 내로의 장기간 생착이 가능하다는 점에서, 편집되지 않은(예를 들어, 자연적으로 발생하는) HSC와 기능적으로 동등하다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CD34 편집된 HSC는 CD34를 제외하고, HSC의 특징적인 세포 표면 마커를 발현한다. 조혈 줄기 세포와 연관된 일부 적절한 세포 표면 마커가 본원에 제공되며, 조혈 줄기 세포와 연관된 다른 적절한 표면 마커는 본 개시에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다. 적절한 HSC 마커에는, 예를 들어, BD Biosciences Human and Mouse CD Marker Handbook (www.bd.com/documents/bd-legacy/catalogue/biosciences/DS_Human-Mouse-CD-Maker-Biosciences_CT_DE.pdf, 2021년 12월 30일 최종 액세스) 에 개시되어 있는 마커가 포함된다. 추가적인 적절한 HSC 마커는, 예를 들어, Tomellini 등의 Cell Reports 2019 28(4):1063-1073(PMID: 31340144 DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.084)에 개시된 것들을 포함하며, 이들 각각의 전체 내용은 참조로서 본원에 통합된다. 일부 예시적인 적합한 HSC 마커는 CD49c, CD71, CD90, CD117, CD135, CD243, CD292, CDw293, CD318, CD325, CD349, CD201, CD228, 및 CD309를 제한 없이 포함한다. 일부 구현예에서, 적합한 HSC 표면 마커는 분화된 세포에 대한 표면 마커의 특징이 없는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CD34 편집된 HSC, 예를 들어, 편집되지 않은(예를 들어, 자연적으로 발생하는) HSC와 기능적으로 구별할 수 없는 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고, 예를 들어 자연적으로 발생하는 HSC의 장기 유전 형질에 의해 일반적으로 발현되는 하나 이상의 표면 마커를 발현한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-이고, 예를 들어 면역염색 또는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 결정된 바와 같이 CD90(CD90+임)을 발현한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD71+이다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD117+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD135+이다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD243+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD292+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편

집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CDw293+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고, CD318+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD325+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD349+이다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD201+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD228+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD309+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD71+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD49c+이다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD201+이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고, 분화된 조혈 세포(lin-)와 관련된 임의의 계통 마커에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 계통 마커는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, 또는 CD235a, 또는 이들 마커 중 2개 이상의 임의의 조합을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고, CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, 또는 CD235a, 또는 이들 마커 중 2개 이상의 임의의 조합에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34(CD34-)에 대해 음성이고 CD45RA-이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 CD34 편집된 HSC는 상기 제공된 기준 중 2개 이상의 조합을 만족시킨다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, 및 CD71+이다. 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, CD71+, 및 lin-이다. 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, CD45RA-이다. 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, CD45RA-, 및 CD201+이다. 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, CD45RA-, 및 CD49c+이고; 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, CD45RA-, CD201+, 및 CD49c+이다. 일부 구현예에서, 이러한 CD34 편집된 HSC는 CD34-, CD90+, CD45RA-, CD201+, CD49c+, 및 lin-이다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 세포 표면에서 CD34를 발현하지 않고 CD90, CD201, 및 CD49c를 발현한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않고, CD90, CD201, 및 CD49c를 발현하며, CD45c를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 조혈 줄기 세포는 세포 표면 상에서 CD34를 발현하지 않으며, CD90, CD201, 및 CD49c 중 하나 이상을 발현하고, CD2, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD45RA-, CD56, CD123, 및 CD235a에 대해 음성이다.

[0360] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CD34 편집된 HSC는 CD34를 암호화하는 유전자의 유전자 편집을 포함하여, 편집된 유전자가 CD34 유전자 산물(예: CD34 단백질)을 암호화하지 않고 CD34 편집된 HSC의 표면에서 발현되거나, 편집된 유전자는 CD34-표적화 항체에 의해 결합될 수 없는 (예: CD34-표적화 항체에 의해 결합된 에피토프에 변형을 가짐) CD34 단백질을 암호화하는 결과를 초래한다. 일부 구현예에서, 상기 CD34 유전자 편집은 CD34를 암호화하는 유전자에서 이중-가닥으로 절단(예: RNA 가이드 뉴클레아제에 의한)된 NHEJ-매개 복구의 결과인 인델을 포함하고, 이는 결과적으로 CD34에 의해 암호화된 유전자 산물의 조기 종결 및 이에 따른 절단을 초래하며, 또는 CD34 유전자 산물을 암호화하지 않는 편집된 CD34 유전자에서 발생하고, 예를 들어, CD34 단백질, 상기 CD34 편집된 HSC의 표면 상에서 발현되거나 편집된 유전자가 CD34 표적 항체에 결합할 수 없는 CD34 단백질을 암호화한 결과(예: 상기 CD34 표적 항체에 의해 결합된 에피토프에서 변형을 가짐)를 초래한다. 일부 구현예에서, 상기 CD34 유전자 편집은 단일 뉴클레오티드 변화를 포함하고, 예: 기본 편집 또는 프라임 편집으로 인한 결과, 또는 CD34를 암호화하는 유전자에서 이중 가닥 절단의 HDR 매개 복구로부터, 이는 결과적으로 CD34에 의해 암호화된 유전자 산물의 조기 종결 및 이에 따른 절단을 초래하며, 또는 CD34 유전자 산물을 암호화하지 않는 편집된 유전자에서 발생하고, 예를 들어, CD34 단백질, 상기 CD34 편집된 HSC의 표면 상에서 발현되거나 편집된 유전자가 CD34 표적 항체에 결합할 수 없는 CD34 단백질을 암호화한 결과(예: 상기 CD34 표적 항체에 의해 결합된 에피토프에서 변형을 가짐)를 초래한다. 일부 구현예에서, CD34 유전자 편집은 프레임 이동 또는 스플라이스 변이체를 초래한다. 일부 구현예에서, CD34 유전자 편집은 CD34 항체에 결합된 에피토프의 전체 또는 일부가 결실되거나 변형되는 결과를 초래한다. 일부 구현예에서, CD34 편집된 HSC는 CD34 표적 항체, CD34-binding 항체 단편, 또는 다른 면역 결합제, 예를 들어, CD34-binding scFv, CD34-binding CAR, 또는 CD34-binding 항체-약물-접합체에 의해 인식되지 않는다. 일부 구현예에서, CD34 편집된 HSC는 CD34 표적 면역 치료제, 예를 들어, CD34 표적 CAR-T 세포 또는 CD34 표적 CAR-NK 세포에 의해 인식되지 않는다.

[0361] 이중 gRNA 조성물 및 이의 용도

[0362] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA(예: 표 1 또는 2에 제공된 gRNA)는, 예를 들어, CRISPR/Cas 뉴클레아제

를 게놈 내의 2개의 부위에 표적화하기 위해, 제2 gRNA와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CD34 및 계통 특이적 세포 표면 항원 (예: CD33, CD123, CLL-1, CD19, CD30, CD5, CD6, CD7, CD38, 또는 BCMA)이 결핍된 조혈 세포를 생산하여, 세포가 두가지 제제, 즉 항-CD34 제제 및 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적으로 하는 제제에 내성을 갖도록 하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 조혈 세포는 CD34 및 림프구 특이적 세포 표면 항원 또는 골수 특이적 세포 표면 항원에 대해 결핍된다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 2개의 절단부를 만들고 2개의 절단부 부위 사이에 결실 또는 삽입부를 생성하기 위해, CD34의 상이한 부위를 표적으로 하는 2개의 상이한 gRNA와 세포를 접촉시키는 것이 바람직하다. 따라서, 본 개시는 gRNA 및 관련 CRISPR 시스템의 다양한 조합뿐만 아니라 gRNA 및 관련 CRISPR 시스템의 이러한 조합을 사용하는 게놈 편집 방법에 의해 생성된 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, CD34 gRNA는 제2 gRNA와 상이한 뉴클레아제에 결합한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CD34 gRNA는 Cas9에 결합할 수 있고, 제2 gRNA는 Cas12a에 결합할 수 있거나, 그 반대일 수 있다.

[0363] 일부 구현예에서, 제1 gRNA는 본원에 제공된 CD34 gRNA(예: 표 1 또는 표 2에 제공된 gRNA 또는 이의 변이체)이고, 제2 gRNA는 다음으로부터 선택된 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적화한다: BCMA, CD19, CD20, CD30, ROR1, B7H6, B7H3, CD23, CD33, CD38, C형 렉틴 유사 분자-1, CS1, IL-5, L1-CAM, PSCA, PSMA, CD138, CD133, CD70, CD5, CD6, CD7, CD13, NKG2D, NKG2D 리간드, CLEC12A, CD11, CD123, CD56, CD30, CD14, CD66b, CD41, CD61, CD62, CD235a, CD146, CD326, LMP2, CD22, CD52, CD10, CD3/TCR, CD79/BCR, 및 CD26.

[0364] 일부 구현예에서, 제1 gRNA는 본원에 제공된 CD34 gRNA(예를 들어, 표 1 또는 표 2에 제공된 gRNA 또는 이의 변이체)이고, 제2 gRNA는 림프구-특이적 세포 표면 항원(예를 들어, T 세포-, B 세포-, 또는 NK 세포-특이적 세포 표면 항원)을 표적화한다. 일부 구현예에서, 림프구 특이적 세포 표면 항원은 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, 또는 CD56이다. 일부 구현예에서, 제1 gRNA는 본원에 제공된 CD34 gRNA(예를 들어, 표 1 또는 표 2에 제공된 gRNA 또는 이의 변이체)이고, 제2 gRNA는 골수-특이적 세포 표면 항원(예를 들어, 단핵구-, 대식세포-, 호중구-, 호염기구-, 수지상 세포-, 적혈구-, 또는 혈소판-특이적 세포 표면 항원)을 표적으로 한다. 일부 구현예에서, 골수-특이적 세포-표면 항원은 CD11c, CD123, CD14, CD33, CD66b, CD41, CD61, CD62, 또는 CD235a이다. 추가적인 림프계 및 골수 특이적 세포 표면 항원 및 이들이 연관된 세포 유형은, 예를 들어, www.bd.com/documents/bd-legacy/catalogue/biosciences/DS_Human-Mouse-CD-Maker-Biosciences_CT_DE.pdf, 2021년 12월 30일에 마지막으로 액세스 가능한 BD Biosciences Human and Mouse CD Marker Handbook에서 찾을 수 있으며, 그 목록은 본원에 참조로서 통합된다.

[0365] 일부 구현예에서, 제1 gRNA는 본원에 제공된 CD34 gRNA(예를 들어, 표 1 또는 표 2에 제공된 gRNA 또는 이의 변이체) 및 제2 gRNA는 신생물 또는 악성 질환 또는 장애와 관련된 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적으로 하며, 예: 특정 유형의 암, 예를 들어, 제한 없이, CD20, CD22(비-호지킨 림프종, B-세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병(CLL) CD52 (B-세포 CLL), CD33(급성 골수성 백혈병(AML)), CD10 (gp100) (흔함 (pre-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 림프종 악성 종), 인간 백혈구 항원(HLA)-DR, HLA-DP, 및 HLA-DQ(림프종 악성 종), RCAS1(부인과 암종, 담도 선암종 및 췌장의 담관 선암종) 및 전립선 특이적 막 항원을 포함한다.

[0366] 일부 구현예에서, 제1 gRNA는 본원에 제공된 CD34 gRNA(예: 표 1 또는 표 2에 제공된 gRNA 또는 이의 변이체)이고, 제2 gRNA는 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, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66F, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75S, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85C, CD85D, CD85E, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD14, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD152, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b1, CD158b2, CD158d, CD158e1/e2, CD158f,

CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210a, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD272, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362 또는 CD363으로부터 선택된 계통 특이적 세포 표면 항원을 표적으로 한다.

[0367] 일부 구현예에서, 제2 gRNA는 WO2017/066760, WO2019/046285, WO/2018/160768, 또는 Borot 등의. *PNAS* (2019) 116 (24):11978-11987을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0368] 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법

[0369] 본 개시의 일부 양태는 본원에 기술된 바와 같은 효과적인 수의 유전적으로 조작된 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 CD34의 발현 손실, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34의 발현을 필요로 하는 대상체에게 초래하는 그들의 게놈에서의 변형을 포함한다.

[0370] 이를 필요로 하는 대상체는, 일부 구현예에서, CD34를 표적으로 하는 면역 요법을 받고 있거나 받을 예정이다. 이를 필요로 하는 대상체는, 일부 구현예에서, 예를 들어, CD34 발현 세포의 유해한 면역 활성을 특징으로 하는 자가면역 질환을 앓고 있거나 진단을 받은 대상체이다. 이를 필요로 하는 대상체는, 일부 구현예에서, 악성 세포 상에서 CD34의 발현을 특징으로 하는 악성 종양을 앓고 있거나 진단받은 대상체이다. 일부 구현예에서, 이러한 악성 종양 또는 자가면역 질환을 가진 대상체는 CD34를 표적으로 하는 면역요법의 후보일 수 있지만, 유해한 온 타겟, 오프-질병 외 효과의 위험은 대상체에게 예상되거나 관찰된 이점보다 더 클 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전적으로 조작된 세포의 투여는, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포가 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 효율적으로 표적화되지 않기 때문에, 유해한 온 타겟, 질병 외 효과의 완화를 초래한다.

[0371] 본원에 기술된 세포, 조성물, 및 방법이 유용할 수 있는 자가 면역 질환의 예로는, 이완불능증, 애디슨병, 성인 스틸병, 무감마글로불린혈증, 원형 탈모증, 아밀로이드증, 강직성 척추염, 항-GBM/항-TBM 신염, 항인지질 증후군, 자가면역 혈관 부종, 자가면역성 자율성 장애, 자가면역 뇌척수염, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환(AIED), 자가면역 심근염, 자가면역 난소염, 자가면역 고환염, 자가면역 췌장염, 자가면역 망막병증, 자가면역 두드러기, 축삭 및 신경 신경병증(AMAN), 발로병, 베체트병, 양성 점막 유사천포창, 수포성 유사천포창, 캐슬만병(CD), 복강병, 샤가스병, 만성 염증성 탈수초 다발신경병증(CIDP), 만성 재발성 다초점 골수염(CRMO), 처그-스트라우스 증후군(CSS) 또는 호산구성 육아종증(EGPA), 반흔성 유사천포창, 코간 증후군, 콜드 아글루티닌 질환, 선천성 심장 차단, 콕사키 심근염, CREST 증후군, 크론병, 포진성 피부염, 피부근육염, 데빅병(시신경척수염), 원반 모양 루푸스, 드레슬러 증후군, 자궁내막증, 호산구성 식도염(EoE), 호산구성 근막염, 결절성 홍반, 필수 혼합 한랭글로불린혈증, 에반스 증후군, 섬유근통, 섬유화 폐포염, 거대 세포 동맥염(측두 동맥염), 거대 세포 심근염, 사구체신염, 굿파스처 증후군, 다발혈관염을 동반한 육아종증, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-션라인 자색반(HSP), 임신성 포진 또는 천포창양 임신(PG) 화농땀샘염(HS) (Acne Inversa), 저감마글로불린혈증, IgA 신장병증, IgG4-관련 경화성 질환, 면역성 혈소판감소성 자반증(ITP), 봉입체 근염(IBM), 간질성 방광염(IC), 청소년 관절염, 청소년 당뇨병(제1형 당뇨병), 청소년 근염(JM), 가와사키병, 램버트-이튼 증후군, 백혈구망상 혈관염, 편평 태선, 경화성 태선, 리그닌성 결막염, 선형 IgA 질환(LAD), 루푸스, 만성 라임병, 메니에르병, 현미경적 다발혈관염(MPA), 혼합 결합 조직 질환(MCTD), 무렌의 궤양, 무차-하베르만병, 다초점 운동 신경병증(MMN) 또는 MMNCB, 다발성 경화증, 중증근무력증, 근염, 발작수면, 신생아 루푸스, 시신경 척수염, 호중구 감소증, 안구 반흔성 유사천포창, 시신경염, 재발성 류머티즘(PR), 판다스, 신생물딸림 소뇌 변성(PCD), 발작성 야간 혈색소뇨증(PNH), 패리 롬버그 증후군, 활액낭염(말초 포도막염),

파소니지-터너 증후군, 천포창, 말초 신경병증, 정맥 주위 뇌척수염, 악성 빈혈(PA), POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염, I형 다선성 증후군, II, III, 류마티스성 다발근통, 다발근육염, 심근경색증 후 증후군, 심장막절개술 후 증후군, 원발성 담즙성 간경화증, 원발성 경화성 담관염, 프로게스테론 피부염, 건선, 건선성 관절염, 순수 적혈구 무형성증(PRCA), 괴저성 농피증, 레이노 현상, 반응성 관절염, 반사성 교감신경 이영양증, 재발성 다발연골염, 하지 불안 증후군(RLS), 후복막 섬유증, 류머티스성 발열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 슈미트 증후군, 공막염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 정자 및 고환 자가면역, 강직 환자 증후군(SPS), 아급성 세균성 심내막염(SBE), 수삭 증후군, 교감성 안염(SO), 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/대세포 동맥염, 혈소판감소성 자반증(TTP), 갑상선 안구 질환(TED), 톨로사-헌트 증후군(THS), 횡단 척수염, 제1형 당뇨병, 궤양성 대장염(UC), 미분화 결합 조직 질환(UCTD), 포도막염, 혈관염, 백반증, 또는 보그트-코야나기-하라다병을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0372] 일부 구현예에서, 이러한 악성 종양 또는 자가면역 질환을 가진 대상체는, 예를 들어, 악성 세포(예: 악성 세포를 발현하는 CD34)를 제거하기 위한 방사선 요법의 후보이다. 일부 구현예에서, (예를 들어, 인접하거나 주변 세포 또는 조직에 대한) 유해한 오프 타겟 효과 및 (예를 들어, 비-악성 CD34 발현 세포에 대한) 온 타겟 오프 질환 효과의 위험은 방사선 요법에 대한 대상체에게 기대되거나 관찰된 이익보다 더 클 수 있다. 일부 구현예에서, 방사선 요법 후 본원에 기술된 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 조혈 세포, 예를 들어, HSC)의 투여는 유해한 온-타겟, 오프-질병 효과의 완화를 초래한다. 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 면역치료 접근법의 조합, 예: CD34를 표적으로 하는 림프구 이펙터 세포를 포함하되, 예컨대 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포, 및 유전적으로 조작된 세포(예를 들어, 유전적으로 조작된 줄기 세포, 예: HSC) CD34를 발현하지 않는 경우, (예: 야생형 세포에 비하여) 감소된 수준의 CD34, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하는 것은 CD34 발현 악성 종양 또는 CD34 발현 세포의 유해한 면역 활성을 특징으로 하는 자가면역 질환을 갖는 대상체를 위한 방사선 요법에 대한 대안으로 여겨진다. CD34를 표적으로 하는 면역치료 접근법은 (예를 들어, 인접하거나 주변 세포 또는 조직에 대한) 표적 외 효과의 위험을 회피하거나 상당히 감소시키는 것으로 여겨진다. CD34를 발현하지 않거나, (예: 야생형 세포에 비해) CD34의 감소된 수준을 발현하거나, CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하는 면역 요법-내성 유전자 조작 세포(예를 들어, HSC와 같은 유전적으로 조작된 줄기 세포)로 고갈된 줄기 세포 집단을 보충하는 것은 면역 질환의 표적-이상 효과를 개선시키거나 제거하는 것으로 여겨진다.

[0373] 일부 구현예에서, 악성종양은 조혈 악성종양 또는 조혈 암이다. 일부 구현예에서, 악성 종양은 림프구 악성 종양이다. 일반적으로, 림프구 악성 종양은 T 계통 또는 B 계통의 림프구와 같은 림프 세포의 부적절한 생산, 발생 및/또는 기능과 관련이 있다. 일부 구현예에서, 악성 종양은 세포 표면 상에서 CD34를 발현하는 세포를 특징으로 하거나 이와 연관된다.

[0374] 일부 구현예에서, 악성 종양은 T-계통 암, 예를 들어, T 세포 백혈병 또는 T 세포 림프종과 같은 비정상적인 T 림프구와 연관된다.

[0375] T 세포 백혈병 및 T 세포 림프종의 예는 다음을 포함한다: 제한 없이, T-계열 급성 림프아구성 백혈병(T-ALL), 호지킨 림프종, 또는 비호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 큰 과립성 림프구성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병/림프종(ATLL), T-세포 전림프구성 백혈병(T-PLL), T-세포 만성 림프구성 백혈병, T-전림프구성 백혈병, T-세포 림프구성 백혈병, 달리 명시되지 않은 말초 T-세포 림프종(PTCL-NOS), 장병증 관련 T-세포 림프종, B-세포 만성 림프구성 백혈병, 외투세포 림프종, 말초 T 세포 림프종(PTCL), 역형성 대세포 림프종, 피부 T-세포 림프종, 혈관 면역 모세포성 림프종, 역형성 대세포 림프종, 장병증-형 T-세포 림프종, 혈액비장 감마-델타 T-세포 림프종, 림프모구성 림프종, 또는 털 세포 백혈병.

[0376] 일부 구현예에서, 악성 종양은 B-계통 암, 예를 들어, B-세포 백혈병 또는 B-세포 림프종과 같은 이상 B 림프구와 연관된다. 일부 구현예에서, 악성 종양은 B-계열 급성 림프구성 백혈병(B-ALL) 또는 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 원발성 종격동 B-세포 림프종이다.

[0377] 일부 구현예에서, 악성 종양의 세포는, 예를 들어, 이들의 표면 상에 CD34를 발현한다.

[0378] 일부 구현예에서, 악성 종양은 CD34의 발현을 특징으로 하는 세포 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, CD34의 발현을 특징으로 하는 세포 집단은 암 줄기 세포이다. 이론에 구속되고자 함이 없이, 암 줄기 세포 이론은 일부 악성 종양의 경우, 암 줄기 세포가 정상적인 건강한 줄기 세포와 많은 특성을 공유함을 시사한다. 일부 구현예에서, 암 줄기 세포는, 예를 들어, 그 표면 상에 CD34를 발현한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 면역 요법 접근법은, 예를 들어, CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포와 같은 CD34를 표적으로 하는 림프구 이펙터 세포를 포함하

며, 암의 암 줄기 세포를 특이적으로 표적화한다. 일부 구현예에서, 암 줄기 세포를 표적으로 하는 본원에 기술된 면역치료 접근법은 또한, 예를 들어, 건강한 줄기 세포에 대한, 유해한 표적-외 질환 효과를 갖는다. 일부 구현예에서, CD34를 발현하지 않거나, (예: 야생형 세포에 비해) 감소된 수준의 CD34를 발현하거나, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하는 유전적으로 조작된 세포(예: 유전적으로 조작된 줄기 세포, HSC)를 사용하여 면역 치료법이 표적으로 하는 비암 줄기세포 (예: 건강한 줄기세포)를 보충 또는 대체할 수 있다.

[0379] 일부 구현예에서, 악성 종양은 이식편 대 숙주 질환이다.

[0380] 또한, 본 개시의 범주 내에는 재발성 및/또는 불응성인 것으로 간주되는 악성 종양, 예컨대 재발성 또는 불응성 혈액암이 있다. 이를 필요로 하는 대상체는, 일부 구현예에서, CD34를 표적으로 하는 면역 이펙터 세포 요법, 예를 들어, CAR-T 세포 요법을 거치고 있거나 거치게 되는 대상체이며, 여기서 면역 이펙터 세포는 CD34를 표적으로 하는 CAR을 발현하고, 면역 이펙터 세포의 적어도 하위 집합은 또한 그들의 세포 표면 CD34 또는 건강한 줄기 세포(예를 들어, HSC)에서 CD34를 발현한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "동족 살해(fratricide)"는 자기사멸을 지칭한다. 예를 들어, 세포 집단의 세포는 동일한 집단의 세포를 사멸시키거나 사멸을 유도한다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포 요법의 세포는 면역 이펙터 세포 요법의 다른 세포를 사멸시키거나 사멸을 유도한다. 이러한 구현예에서, 동족 살해(fratricide)는 원하는 임상 결과, 예를 들어 대상 내에서 CD34를 발현하는 악성 세포의 제거가 달성될 수 있기 전에 면역 이펙터 세포의 일부 또는 전체 집단을 제거한다. 일부 이러한 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포, 예를 들어, 면역 이펙터 세포 요법의 기초를 형성하는 면역 이펙터 세포로서, CD34를 발현하지 않거나 CAR에 의해 인식되는 CD34 변이체를 발현하지 않는 면역 이펙터 세포를 사용하면, 이러한 동족 살해(fratricide) 및 치료 결과에 대한 연관된 부정적인 영향을 피할 것이다. 이러한 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이, 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포, 예를 들어, CD34를 발현하지 않거나 CAR에 의해 인식되는 CD34 변이체를 발현하지 않는 면역 이펙터 세포는 CD34 표적화 CAR을 또한 발현하도록 추가로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 림프구, 예를 들어, 알파/베타 T 림프구, 감마/델타 T 림프구, 또는 자연 살해 T 세포와 같은 T 림프구일 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.

[0381] 일부 구현예에서, 면역 이펙터 세포 요법의 세포는 대상체의 세포 표면에서 CD34를 발현하는 줄기 세포(예를 들어, HSC)를 사멸시키거나 사멸을 유도한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 대상체에서 표적 줄기 세포 틈새(예를 들어, HSC 틈새)의 고갈을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 대상체에서 적어도 하나의 비표적 줄기 세포 틈새에서 줄기 세포의 수준 또는 생존력을 변경시키거나 눈에 띄게 변경하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 대상체에서 특정 유형의 모든 줄기 세포 틈새(예를 들어, 모든 HSC 틈새)를 표적화한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 대상체에서 줄기 세포 틈새(예를 들어, HSC 틈새)의 완전한 고갈을 초래한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 줄기 세포 틈새는 미분화되고 자가-재생 가능한 상태에서 줄기 세포의 집단을 포함하는 특이적 미세환경을 포함하는 대상체의 해부학적 영역을 지칭한다.

[0382] 일부 구현예에서, CD34를 발현하지 않거나 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하지 않는 유전적으로 조작된 줄기 세포를 대상체에게 투여하는 것은 대상체에서 줄기 세포(예를 들어, HSC)의 공급을 CD34 보충한다. 일부 구현예에서, 대상체에게 CD34를 발현하지 않거나 CD34를 표적으로 하는 면역 이펙터 세포와 조합하여 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 변이체 형태의 CD34를 발현하지 않는 유전적으로 조작된 줄기 세포(예를 들어, 본원에 제공된 바와 같이, 유전적으로 조작된 면역 이펙터 세포, 예를 들어, CD34를 발현하지 않거나 CAR에 의해 인식되는 CD34 변이체를 발현하지 않는 면역 이펙터 세포는 CD34 표적화 CAR을 또한 발현하도록 추가로 변형될 수 있음)를 투여한다.

[0383] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유효 수의 유전적으로 조작된 세포는 CD34의 발현 상실을 초래하는 게놈의 변형, 또는 CD34를 표적으로 하는 면역치료제에 의해 인식되지 않는 CD34의 변이 형태의 발현을 포함하고, 유전적으로 조작된 세포는 이를 필요로 하는 대상체(예: CD34를 표적으로 하는 면역요법을 받고 있거나 받을 대상)에게 투여되며, 면역요법은 유해한 온 타겟, 오프-질병(예: CD34를 발현하는 대상체에서 건강한 세포에 대한 세포독성의 형태)과 연관되거나 연관될 위험이 있다. 일부 구현예에서, 이러한 유전적으로 조작된 세포의 유효 수는 항-CD34 면역치료제와 병용 요법으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0384] 제제(예: CD34-modified 세포 및 항-CD34 면역치료제)가 병용 요법으로 투여될 때, 세포 및 제제는 동시에 또는 상이한 시간에, 예를 들어, 시간적으로 근접하게 투여될 수 있음이 이해된다. 또한, 세포 및 제제는 혼합되거나 별도의 부피 또는 투여 형태로 될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 병용 투여는 동일한 치료 과정에서,

예를 들어, 항-CD34 면역요법으로 대상체를 치료하는 과정에서, 대상체에게, 예를 들어, 항-CD34 면역요법으로 치료 전, 치료 중, 또는 치료 후에, 동시에 또는 순차적으로, 유전적으로 조작된 CD34-modified 세포를 유효 수만큼 투여할 수 있다.

[0385] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD34를 표적으로 하는 면역치료제는 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포이며, 상기 키메라 항원 수용체는 CD34에 결합할 수 있는 항원 결합 단편(예: 단일 사슬 항체)을 포함한다. 면역 세포는, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CD4+ 또는 CD8+ T 세포) 또는 NK 세포일 수 있다.

[0386] 키메라 항원 수용체(CAR)는 적어도 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 기능적 신호 전달 도메인, 예를 들어, 자극 분자로부터 유래된 도메인을 포함하는 세포질 신호 전달 도메인을 포함하는 재조합 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포질 신호전달 도메인은 적어도 하나의 공동 자극 분자, 예컨대 4-1BB(즉, CD137), CD27, 및/또는 CD28, 또는 이들 분자의 단편으로부터 유래된 하나 이상의 기능적 신호전달 도메인을 더 포함한다. CAR의 세포외 항원 결합 도메인은 CD34-binding 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체 단편은 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 이의 부분), 불변 영역(또는 이의 부분), 또는 전술한 것 중 어느 하나의 조합을 포함할 수 있다.

[0387] 키메라 항원 수용체(CAR)는 일반적으로, 예를 들어, CAR 프레임워크에 융합된 항체 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는데, 이는 (예를 들어, CD8 또는 CD28로부터 유래된) 힌지 영역, (예를 들어, CD8 또는 CD28로부터 유래된) 막관통 도메인, (예를 들어, CD8 또는 CD28로부터 유래된) 하나 이상의 공동자극 도메인(예를 들어, CD28 또는 4-1BBB의) 및 신호 전달 도메인(예를 들어, CD3zeta)을 포함할 수 있다. CAR 도메인 및 구성 요소의 예시적인 서열이, 예를 들어 PCT 공개 번호 WO 2019/178382 및 아래 표 3에 제공된다.

표 3

[0388]

키메라 항원 수용체의 예시적인 성분	
키메라 수용체 성분	**아미노산 서열**
항원 결합 단편	예를 들어, scFv, 경쇄-링커-중쇄, 단일 도메인 항체, 또는 나노바디
CD28 공자극 도메인	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPT RKHYQPYAPPRDFAAYRS (서열번호: 19)
CD8alpha 막관통 도메인	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (서열번호: 20)
CD28 막관통 도메인	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (서열번호: 21)
4-1BB 세포내 도메인	KRGRKKLLYIFKQPFMRVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열번호: 22)
CD3ζ 세포질 신호전달 도메인	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호: 23)

[0389] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포, 예를 들어, HSC, HPC, 또는 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 면역 이펙터 세포의 수는 10^6~10^{11}의 범위 내에 있다. 그러나, 이러한 예시적인 범위 미만 또는 초과의 양은 또한 본 개시의 범위 내에 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포, 예를 들어, HSC, HPC, 또는 면역 이펙터 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 세포의 수는 약 10^6, 약 10^7, 약 10^8, 약 10^9, 약 10^{10}, 또는 약 10^{11}이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 유전적으로 조작된 세포, 예를 들어, HSC, HPC, 또는 면역 이펙터 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 세포의 수는 10^6~10^9의 범위 내에 있고, 10^6~10^8의 범위 내에 있고, 10^7~10^9의 범위 내에 있고, 약 10^7~10^{10}의 범위 내에 있고, 10^8~10^{10}의 범위 내에 있거나, 10^9~10^{11}의 범위 내에 있다.

[0390] 일부 구현예에서, CD34를 표적으로 하는 면역치료제는 항체-약물 접합체(ADC)이다. ADC는 독소 또는 약물 분자에 접합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 분자일 수 있다. 상응하는 항원에 대한 항체 또는 이의 단편의 결합은 독소 또는 약물 분자를 그의 세포 표면(*예를 들어*, 표적 세포) 상에 항원을 제시하는 세포로 전

달하여 표적 세포의 사멸을 초래한다.

[0391] 예를 들어, 키메라 항원 수용체의 생성, 이러한 키메라 수용체를 발현하는 CAR-T 세포의 생성, 또는 항체-약물-접합체의 생성에 사용될 수 있는 CD34에 결합하는 적절한 항체 및 항체 단편은 당업자에게 명백할 것이다. 적절한 항-CD34 항체의 예는, 제한 없이, EP373Y (Abcam (토끼, 비결합)), 클론 QBEnd-10 (LifeSpan BioSciences (마우스)), 클론 MEC14.7 (LifeSpan BioSciences (쥐)), 클론 SI16-01 (항체명 ET1606-11; HUABIO (토끼), 클론 HPCA1 / 2598R (biorbyt (토끼), 4C8 and 인간화 h4C8, 4H11, QBEnd-10, 27H2, CIRMA-K4, DS554AB, 10C304, 9C5, B-C34, RM300, 및 AC136 의 cQBEND/10 또는 hQBEND/10 변형을 포함한다.

[0392] 인간 CD34에 결합할 수 있는 임의의 적절한 항체 및 항원 결합 단편(mRNA NCBI 참조 서열: NM_001025109.1, 단백질 NCBI 참조 서열: NP_001020280.1)은 본원에 기술된 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있다. 세포질 꼬리의 길이(긴 것 및 짧은 것)가 상이한 2개의 아이소폼(isoform)의 CD34가 있다. 최근에, 긴 아이소폼을 사용하여 면역원으로서 사용될 수 있는 CD34를 발현하는 안정한 세포주를 생성하였다(예를 들어, Adv. Pharm. Bull. 5:69-75, 2015). CD34의 긴 아이소폼과 같은 CD34는 면역원으로서 사용될 수 있는데, 이는 CD34에 결합할 수 있는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 식별하고, 적절한 CD34 표적 면역치료제, 예를 들어CD34 표적 CAR 및 CAR-T 세포, 또는 항체-약물-접합체를 생성하기 위한 것이고, 암 및 자가면역 질환의 치료를 위한 것일 뿐만 아니라, 조혈 줄기 세포 이식 치료 전 컨디셔닝제로서 사용하기 위한 것이다.

[0393] 일부 적절한 CD34 항체, CD34-binding 항체 단편, 및 CD34-binding scFv가 본원에 기술되어 있고, 추가적인 적절한 CD34 항체, CD34-binding 항체 단편, 및 CD34-binding scFv가 본 개시에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다. 이는, 예를 들어, 미국 특허 제5,843,633호에 기술되어 있는 바와 같이, ATCC 접근 번호 AC133.1 및 HB 12346에서 생산 및 방출된 CD34 결합 항체가 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0394] 본원에 기술된 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 적절한 CD34-binding 항체 및 CD34-binding 항체 단편 및 scFv는, 예를 들어, 경쟁적 CD34 결합 분석을 통해, 본원에 기술된 것과 동일한 CD34 에피토프에 특이적으로 결합하는 임의의 항체, 항체 단편 및 scFv뿐만 아니라 CD34 항체, CD34-binding 항체 단편의 인간화 변이체를 추가로 포함한다.

[0395] 항체-약물 접합체에 사용하기에 적합한 독소 또는 약물은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자에게 명백할 것이다. *예를 들어*, Peters 등의 *Biosci. Rep.*(2015) 35(4): e00225; Beck 등의 *Nature Reviews Drug Discovery* (2017) 16:315-337; Marin-Acevedo 등의 *J. 헤마텔. 온콜* (2018)11: 8; Elgundi 등의 *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) 122: 2-19.

[0396] 일부 구현예에서, 항체-약물 접합체는 항체 및 약물 분자를 부착하는 링커(*예:* 절단성 링커와 같은 펩티드 링커)를 추가로 포함할 수 있다.

[0397] 항체-약물 접합체에 적합한 독소 또는 약물의 예는 다음을 포함한다: 제한 없이, 브렌툭시맙 베도틴에 포함된 독소 및 약물, 글렘바투무맙 베도틴/CDX-011, 데파툭시주맙 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, 엔폴투맙 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, 리파스주맙 베도틴/RG7599/DNIB0600A, 인두사투맙 베도틴/MLN-0264/TAK-264, 반도르투주맙 베도틴/RG7450/DSTP3086S, 소피투주맙 베도틴/RG7458/DMUC5754A, RG7600/DMOT4039A, RG7336/EDN6526A, ME1547, PF-06263507/ADC 5T4, 트라스투주맙 엠탄신/T-DM1, 미르베툭시맙 소라페닙/IMGN853, 콜툭시맙 라브탄신/SAR3419, 나라툭시맙 엠탄신/IMGN529, 인다툭시맙 라브탄신/BT-062, 아네투맙 라브탄신/BAY 94-9343, SAR408701, SAR428926, AMG 224, PCA062, HKT288, LY3076226, SAR566658, 로보투주맙 메르탄신/IMGN901, 캔투주맵 메르탄신/SB-408075, 캔투주맙 라브탄신/IMGN242, 라파리툭시맙 엠탄신/IMGN289, IMGN388, 비바투주맙 메르탄신, AVE9633, BIIB015, MLN2704, AMG 172, AMG 595, LOP 628, 바다스투시맙 탈리린/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, 겜투주맙 오조가마이신, 이노투주맵 오조가마이신/ CMC-544, PF-06647263, CMD-193, CMB-401, 트라스투주맙 듀오카마진/SYD985, BMS-936561/MDX-1203, 새시투주맙 고비테칸/IMMU-132, 라베투주맙 고비테칸/IMMU-130, DS-8201a, U3-1402, 밀라투주맙 독소루비신/IMMU-110/hLL1-DOX, BMS-986148, RC48-ADC/허투주맙-vc-MMAE, PF-06647020, PF-06650808, PF-06664178/RN927C, 루파투맙 아마도틴/ BAY1129980, 아프루투맙 익사도틴/BAY1187982, ARX788, AGS62P1, XMT-1522, AbGn-107, MEDI4276, DSTA4637S/RG7861.

[0398] 일부 구현예에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프에 대한 항체-약물 접합체의 결합은 항체-약물 접합체의 내재화를 유도하며, 약물(또는 독소)은 세포 내에서 방출될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프에 대한 항체-약물 접합체의 결합은 독소 또는 약물의 내재화를 유도하며, 이는 독소 또는 약물이 계통 특이적 단백질을 발현하는 세포(표적 세포)를 사멸시킬 수 있게 한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프에 대한 항체-약물 접합체의 결합은 독소 또는 약물의 내재화를 유도하며, 이는 계통 특이적 단백질을 발현하는 세포(표적 세포)의 활성을 조절할 수 있다. 본원에 기술된 항체-약물 접합체에 사용되는 독소 또는 약물의 유형은 임의의 특정 유형으로 제한되지 않는다.

[0399] 일반 기술

[0400] 본 개시내용의 실시는, 달리 명시되지 않는 한, 당 기술분야의 기술 범위 내에 있는, 분자 생물학(재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 종래의 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌, 예컨대 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2판(Sambrook, 외, 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, 외 eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, 외, eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan 외, 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 외 (eds.)와 같은 문헌에 충분히 설명되어 있다.

[0401] 추가의 상세 설명 없이, 당 기술분야의 숙련자는, 전술한 설명에 기초하여, 본 개시내용을 최대한 활용할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 다음의 특정 실시예는 단지 예시적인 것으로 해석되고, 임의의 방식으로 본 개시내용의 나머지를 제한하지 않는다. 본원에 인용된 모든 간행물은 본원에 참조된 목적 또는 주제를 위해 참조로서 통합된다.

[0402] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참조 문헌은 그 전체가 참조로서 통합된다. 또한, 재료, 방법 및 예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 의도가 아니다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당 기술분야의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적절한 방법 및 재료가 본원에 기술된다.

[0403] 본 개시내용은 다음의 예에 의해 추가로 예시된다. 예시는 예시 목적으로만 제공됩니다. 이들은 어떠한 방식으로도 본 개시내용의 범위 또는 내용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0404] 실시예들

[0405] **실시예 1: 인간 세포에서 CD34의 유전자 편집**

[0406] *sgRNA 작제물의 설계*

[0407] 표 1 및 표 2에 표시된 표적 도메인 및 gRNA는, 표적 영역에 매우 근접한 해당 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9에 대한 PAM 서열에 대한 수동 검사에 의해 설계되었고, 온라인 검색 알고리즘(예를 들어, Benchling 알고리즘, Doench et al 2016, Hsu et al 2013)을 사용해 인간 게놈에서 잠재적인 표적 외 부위를 최소화함으로써 예측된 특이성에 따라 우선순위가 정해졌다. 도 1 및 2A-2C는 CD34 유전자 내의 예시적인 gRNA의 위치를 보여준다. 모

든 설계된 합성 sgRNA는 5' 및 3' 말단 모두에서 3개의 말단 위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오티드로 생산하였다. 변형된 뉴클레오티드는 2′ -O-메틸-3′ -포스포로티오에이트("ms"로서 약칭됨)를 함유하였고, ms-sgRNA를 HPLC-정제하였다.

[0408] *인간 CD34+ HSC 편집*

[0409] 냉동된 CD34+ HSC를 제조업체의 지침에 따라 해동하였다. HSC를 편집하기 위해, 도 3a에 도시된 바와 같이, ~HSC를 해동하고, RNP로 전기천공하기 전에 대략 48시간 동안 StemSpan CC110 칵테일(StemCell Technologies)이 보충된 StemSpan SFEM 배지에서 배양하였다. HSC를 전기천공하기 위해, 대략 2 $x10^5$ 세포를 펠릿화하고 전기천공 용액에 재현탁하고, RNP의 형태로 3 μg Cas9 및 3 μg gRNA와 혼합하였다. 표준 전기천공 절차를 사용하여 CD34+ HSC를 전기천공하였다. 실험 조건이 표 4에 제공되어 있다.

표 4

[0410]

세포 수	조건	Cas9	가이드 농도
200K	모의 전기천공(모의)	0	0
200K	양성 대조군	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-1	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-2	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-3	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-4	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-5	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-1	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-2	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-3	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-4	3 μg	3 μg
200K	Cas9+gRNA CD34-5	3 μg	3 μg
200K	전기천공 없음(EP 없음)	0	0

[0411] *게놈 DNA 분석*

[0412] 전기천공 후 약 48시간에, 세포 수, 생존력 분석, 정제 및 시퀀싱을 위해 세포를 수확하였다. 모든 게놈 분석을 위해, DNA를 세포로부터 수확하고, 표적 영역의 측면에 위치하는 프라이머로 증폭시키고, 정제하고, 대립유전자 변형 빈도를 TIDE(분해에 의한 인델의 추적)를 사용하여 분석하였다. 모의 형질감염된 샘플 유래의 기준 서열을 사용하여 분석을 수행하였다.

[0413] 인간 CD34+ 세포를 Cas9 단백질로 전기천공하고, 전술한 바와 같이CD34-표적화 gRNA를 나타냈다. TIDE 분석에 의해 평가된 바와 같이 백분율 편집은 인델%에 의해 결정되었다. 편집 효율은 도 3D 및 도 4에 도시된 바와 같이 TIDE 분석에 의해 결정하였다.

[0414] *유세포 분석*

[0415] CD34 gRNA-편집된 세포는 CD34 단백질의 표면 발현에 대해, 예를 들어 유세포 분석(FACS)에 의해 평가될 수도 있다. 항-CD34 항체를 사용하여 CD34에 대해 실시간 HSC를 염색하고, Attune NxT 유세포 분석기(Life Technologies) 상에서 유세포 계측법으로 분석한다. CD34 유전자가 유전적으로 변형된 세포는 FACS에 의해 검출된 CD34 발현의 감소를 나타낸다.

[0416] *편집된 세포의 생존력*

[0417] *생체 외* 편집 후 24시간 및 48시간 차에, 생육성, 편집된 CD34KO 세포 및 대조군 세포의 평균 세포 수 및 백분율을 유세포 계측법 및 7AAD 생존력 염료를 사용하여 정량화하였다. 도 3B 및 3C에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 CD34 gRNA를 사용하여 편집된CD34KO 세포는 전기천공 및 유전자 편집 후 시간이 지남에 따라 생존이 가능하고, 이는 gRNA 표적화 CD5, 모의 편집된 세포, 및 전기천공되지 않은 세포로 편집하는 대조군 세포에서 관찰된 것과 유사하다.

[0418] **실시예 2: 대규모 전기천공 - 96시간 차**

[0419] 냉동된 CD34+ HSC를 제조업체의 지침에 따라 해동하였다. HSC를 편집하기 위해, 도 5A에 도시된 바와 같이,

~HSC를 해동하고, RNP로 전기천공하기 전에 대략 48시간 동안 StemSpan CC110 칵테일(StemCell Technologies)이 보충된 StemSpan SFEM 배지에서 배양하였다. HSC를 전기천공하기 위해, 대략 1 x10^6개의 세포를 펠릿화하고 전기천공 용액에 재현탁하고 RNP의 형태로 15 μg Cas9 및 15 μg gRNA와 혼합하였다. 표준 전기천공 절차를 사용하여 CD34+ HSC를 전기천공하였다. 실험 조건이 표 5에 제공되어 있다.

표 5

[0420]

세포 수	조건	Cas9	가이드 농도
1M	Cas9+gRNA CD34-2	15 μg	15 μg
1M	Cas9+gRNA CD34-3	15 μg	15 μg
1M	Cas9+gRNA CD34-5	15 μg	15 μg
1M	모의 전기천공 (모의)		
1M	전기천공 없음(EP 없음)		

[0421] 전기천공 후 24시간 및 96시간 차에, 세포 수, 생존력 분석, 정제 및 시퀀싱 분석을 위해 세포를 수확하였다. 도 5B 및 도 5C에 도시된 바와 같이, 표시된 CD34 gRNA를 사용하여 편집된 세포의 세포 수 및 생존력은 모의 편집된 세포(모의) 또는 전기천공되지 않은 세포(EP 없음)와 유사한 수준의 생존력을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0422] 항-CD34 항체(항-CD34-PE Texas Red)를 사용하는 유세포 분석(FACS)에 의해 CD34 단백질의 표면 발현에 대해 CD34 gRNA-편집 세포를 또한 평가하였다. CD34 유전자가 유전적으로 변형된 세포는 FACS에 의해 검출된 CD34 발현이 감소된 것으로 밝혀졌다. 도 6a, 6b 및 도 7a~7d를 참조한다.

[0423] **실시예 3: 대규모 전기천공 -168시간 차**

[0424] 냉동된 CD34+ HSC를 제조업체의 지침에 따라 해동하였다. HSC를 편집하기 위해, 도 8에 도시된 바와 같이, ~HSC를 해동하고, RNP로 전기천공하기 전에 대략 48시간 동안 StemSpan CC110 칵테일(StemCell Technologies)이 보충된 StemSpan SFEM 배지에서 배양하였다. HSC를 전기천공하기 위해, 대략 1 x10^6 세포를 펠릿화하고 전기천공 용액 중에 재현탁하고, RNP의 형태로 15 μg Cas9 및 15 μg gRNA와 혼합한 다음, 표준 전기천공 절차를 사용하여 전기천공하였다. 실험 조건이 표 6에 제공되어 있다.

표 6

[0425]

세포 수	조건	Cas9	가이드 농도
1M	Cas9+gRNA CD34-2	15 μg	15 μg
1M	Cas9+gRNA CD34-3	15 μg	15 μg
1M	모의 전기천공 (모의)		
1M	전기천공 없음(EP 없음)		

[0426] 전기천공 후 24, 48, 120, 144, 및 168시간 차에, 세포 수, 생존력 분석, 정제 및 시퀀싱 분석을 위해 세포를 수확하였다. 표시된 CD34 gRNA를 사용하여 편집된 세포의 세포 수 및 생존력은 모의 편집된 세포(모의) 또는 전기천공되지 않은 세포(EP 없음)와 유사한 수준의 생존력을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0427] 항-CD34 항체(항-CD34-PE Texas Red)를 사용하는 유세포 분석(FACS)에 의해 CD34 단백질의 표면 발현에 대해 CD34 gRNA-편집 세포를 또한 평가하였다. 전기천공 후 48시간 차에, CD34 유전자가 유전적으로 변형된 세포는 FACS에 의해 검출된 CD34 발현이 약간 감소된 것으로 밝혀졌다. 도 9a 및 9b를 참조한다. 그러나, 전기천공 후 168시간 시점에, CD34 유전자가 유전적으로 변형된 세포는 FACS에 의해 검출된 CD34 발현이 감소된 것으로 밝혀졌다. 도 10a 및 10b를 참조한다.

[0428] **실시예 4: CAR-T 세포독성 분석**

[0429] 표 1 또는 2에 나타낸 gRNA를 사용하여 생산된 유전적으로 변형된 세포는 CD34-CAR T 세포에 의한 사멸에 대해 평가될 수 있다.

[0430] *CAR 구성체 및 렌티바이러스 생산*

[0431] 2세대 CAR은 CD34를 표적화하도록 구성된다. 예시적인 CAR 구축물은 CD8a 신호 펩티드, CD8a 힌지 및 막관통 영

역, 4-1BB 공자극 도메인, 및 CD3x 신호 전달 도메인을 사용하는 세포외 scFv 항원 결합 도메인으로 구성된다. 항-CD34 scFv 서열은 당업계에 공지된 임의의 항-CD34 항체로부터 수득될 수 있다. 표적에 대한 CAR cDNA 서열은 pCDH-EF1a -MCS-T2A-GFP 발현 벡터의 다중 클로닝 부위 내로 하위 클로닝되고, 렌티바이러스는 제조업체의 프로토콜(System Biosciences)에 따라 생성된다. 렌티바이러스는 리포펙타민 3000(ThermoFisher)을 사용하는 293TN 세포(시스템 바이오사이언스)의 일시적 형질감염에 의해 생성될 수 있다. 예시적인 CAR 구축물은 항-CD34 항체의 경쇄 및 중쇄를 CD8a 힌지 도메인, ICOS 막관통 도메인, ICOS 신호 전달 도메인, 4-1BB 신호 전달 도메인 및 CD3x 신호 전달 도메인을 렌티바이러스 플라스미드 pHIV-Zsgreen으로 클로닝함으로써 생성된다.

[0432] *CAR 형질도입 및 확장*

[0433] 인간 일차 T 세포는 제조사의 프로토콜(Stem Cell Technologies)에 따라 항-CD4 및 항-CD8 마이크로비드를 사용한 자기 비드 분리에 의해 Leuko Pak(Stem Cell Technologies)로부터 단리된다. 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 1:1로 혼합되고 항-CD3/CD28 결합 Dynabeads(Thermo Fisher)를 사용하여 1:1 비드 대 세포 비율로 활성화된다. 사용된 T 세포 배양 배지는 면역 세포 혈청 대체, L-글루타민 및 GlutaMAX(모두 Thermo Fisher로부터 구매함) 및 100 IU/mL의 IL-2(Peprotech)가 보충된 CTS 옵티마이저 T 세포 확장 배지이다. T 세포 형질도입은 폴리브렌(Sigma)의 존재 하에, 활성화 후 24시간 차에, 원심 주입(spinoculation)에 의해 수행된다. CAR-T 세포를 동결보존 전에 9일 동안 배양한다. 모든 실험 전에, T 세포를 해동하고 37°°C에서 4~6시간 동안 방치한다.

[0434] *유세포 분석 기반 CAR-T 세포독성 분석*

[0435] 표적 세포의 세포독성은 음성 대조군 세포의 생존과 비교하여 측정된다. CD34 세포독성 분석을 위해, CD34+ 세포가 표적 세포로서 사용될 수 있고, CD34가 결핍되거나 CD34의 발현이 감소된 CD34+ 세포가 실시예 1 내지 3에 기술된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0436] 표적 세포 및 음성 대조군 세포를 제조사의 지침에 따라 CellTrace Violet(CTV) 및 CFSE(Thermo Fisher)로 각각 염색한다. 염색 후, 표적 세포와 음성 대조군 세포를 1:1로 혼합한다.

[0437] 항-CD34 CAR-T 세포가 이펙터 T 세포로서 사용된다. 비-형질도입 T 세포(모의 CAR-T)를 대조군으로서 사용한다. 이펙터 T 세포는 1:1 이펙터 대 목표 비율로 2회 반복으로 표적 세포/음성 대조군 세포 혼합물과 공동배양된다. 이펙터 T 세포가 없는 표적 세포/음성 대조군 세포 혼합물의 그룹만을 대조군으로서 포함한다. 유동 세포 측정 분석 전에 세포를 37°°C에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 프로피듐 요오드화물(ThermoFisher)은 생존력 염료로서 사용된다. 특이적 세포 용해의 계산을 위해, 살아있는 음성 대조군 세포로의 살아있는 표적 세포의 분율(표적 분율이라고 함)을 사용한다. 특이적 세포 용해는 ((이펙터 세포가 없는 표적 분획 - 이펙터 세포가 있는 표적 분획)/(이펙터가 없는 표적 분획)) X 100%로서 계산된다.

[0438] **실시예 5: 조작된 HSC에 대한 항-CD34 항체 약물 접합체의 효과**

[0439] 표 X에 나타낸 gRNA를 사용하여 생산된 유전적으로 변형된 세포는 면역독소에 대한 항-CD34 항체와 같은 항체-약물 접합체에 의한 사멸에 대해 평가될 수 있다.

[0440] 동원된 말초 혈액으로부터 유래된 냉동 CD34+ HSPC를 해동하고 72시간 동안 배양한 다음, Cas9 및 sgRNA를 포함하는 리보뉴클레오단백질로 전기천공하였다. 샘플은 다음 조건으로 전기천공된다:

[0441] i. 모의 (Cas9만 해당), 및

[0442] ii. KO sgRNA (예컨대, 표 X에 나타낸 CD34 gRNA 중 임의의 하나).

[0443] 세포를 72시간 동안 회복시키고 게놈 DNA를 수집하고 분석한다. CD34-양성 세포의 백분율을 유세포 분석법으로 평가하여 CD34 gRNA로 편집하는 것이 CD34 발현을 녹아웃시키거나 감소시키는 데 효과적임을 확인한다. HSC에서의 편집 이벤트는 다양한 인델 서열을 초래한다.

[0444] *항체-약물 접합체에 대한 CD34 결실 세포의 민감도*

[0445] *시험관 내* 독성을 결정하기 위해, 세포를 배양 배지에서 항체-약물 접합체와 함께 인큐베이션하고, 시간이 지남에 따라 생존 세포의 수를 정량화한다. CD34가 결핍되거나 본원에 기술된 CD34 gRNA로 생성된 CD34 발현이 감소된 조작된 세포는 전장 CD34(모의)를 발현하는 세포보다 항체-약물 접합체 치료에 더 내성이 있다.

[0446] *(ii) CD34 편집된 세포 농축*

[0447] CD34-modified 세포가 항체-약물 접합체로 치료한 후 풍부해지는 경우, HSPC를 gRNA 비율에 대한 50%의 표준 뉴

클레아제(예: Cas9, Cpf1)로 편집하여 분석하였다. 항체-약물 접합체로 치료하기 전과 후에 세포의 벌크 집단을 분석한다. 항체-약물 접합체로 처리한 후, CD34 편집된 세포를 농축시켜 CD34 결핍 세포의 백분율이 증가하도록 한다.

[0448] *(iii) CD34 편집된 HSPC의 시험관 내 분화*

[0449] 세포 집단은 분화 후 다양한 날짜에 항체-약물 접합체로 치료하기 전과 후에 림프구 분화 여부에 대해 평가된다. 본원에 기술된 CD34 gRNA로 생성된 조작된 CD34 녹아웃 세포는 분화 마커의 발현 증가를 나타낼 수 있는 반면, 전장 CD34(모의)를 발현하는 세포는 분화하지 않을 수 있다.

[0450] **실시예 6: *생체 내* CD34KO 세포의 지속성 평가**

[0451] 동원된 말초 혈액 CD34+ HSC(mPB CD34+HSPC)에서의 편집

[0452] gRNA(Synthego)를 실시예 1 내지 3에 기술된 바와 같이 설계하였다. mPB CD34+ HSPC는 Fred Hutchinson Cancer Center로부터 구매되고 제조업체의 지침에 따라 해동된다. 그런 다음, 이들 세포는 본원에 기술된 CD34 표적화 gRNA뿐만 아니라 인간 또는 마우스 게놈에서 임의의 영역을 표적화하지 않도록 설계된 비-CD34 표적화 대조군 gRNA(gCtrl)를 사용하여 실시예 1 내지 3에 기술된 바와 같이 CRISPR/Cas9를 통해 편집된다.

[0453] 생체 외 편집 후 4시간, 24시간, 및 48시간 차에, 생존 가능한 편집된 CD34KO 세포 및 대조군 세포의 백분율을 유세포 분석법 및 7AAD 생존력 염료를 사용하여 정량화한다. 본원에 기술된 CD34 gRNA를 사용하여 편집된 높은 수준의 CD34KO 세포는 비-CD34 표적화 대조군 gRNA인 gCtrl로 편집된 대조군 세포에서 관찰된 것과 유사하게, 전기천공 및 유전자 편집 후에 생존 가능하고 시간 경과에 따라 생존될 수 있다.

[0454] 또한, 실시예 1 내지 3에 기술된 바와 같이, 인델(INDEL)(삽입/결실)에 의해 평가된 바와 같은 편집 백분율을 결정하기 위해, 생체 외 편집 후 48시간 차에, 게놈 DNA를 세포로부터 수확하고, 표적 영역의 측면에 위치한 프라이머로 PCR을 증폭시키고, 정제하고, TIDE에 의해 분석한다.

[0455] TIDE 분석 후, 본원에 기술된 CD34 gRNA로 편집한 후 장기-HSC(LT-HSC)의 백분율은 유세포 분석법에 의해 정량화된다. 명시된 CD34 gRNA로 편집한 후 LT-HSC의 백분율을 평가한다. 이러한 분석은, 예를 들어, 생체 내 CD34KO 세포의 지속성을 조사하기 위해 마우스에 주입하기 전에, 편집된 세포의 동결보존 시점에 수행될 수 있다. 편집된 세포는 바이알당 1 mL 부피의 배지 중, CS10 배지(Stem Cell Technology)에서 $5x10^6$ cells/mL로 동결 보존된다.

[0456] *생체 내에서 CD34KO mPB HSPC의 생착 효율 및 지속성을 조사*

[0457] 생후 6 내지 8주령의 암컷 NSG 마우스(JAX)는 2~7일 동안 적응할 수 있다. 적응 후, X-선 조사기에 의한 175 cGy의 전신 조사를 사용하여 마우스를 조사한다. 이는 조사 0일로 간주됩니다. 방사선 조사 후 4~10시간 차에, 본원에 기술된 임의의 CD34 gRNA 중 하나에서 생성된 CD34KO 또는 gCtrl로 편집된 대조군 세포를 마우스에 생착시킨다. 동결 보존된 세포를 해동하고 BioRad TC-20 자동화 세포 계수기를 사용하여 계수한다. 해동된 바이알에서 생존 세포의 수를 정량화하고, 이는 마우스에서 생착을 위한 세포의 총 수를 준비하는 데 사용된다. 100 µL 부피로 $1x10^6$ 편집된 세포를 마우스에게 1회 정맥 내 주사한다. 체중 및 임상 관찰은 4개의 군의 각 마우스에 대해 주 1회 기록된다.

[0458] 생착 후 8주차 및 12주차에, 유세포 분석법에 의한 분석을 위해 각 마우스로부터 50 µL의 혈액을 안와후 출혈(retroorbital bleed)에 의해 수집한다. 생착 후 16주차에, 마우스를 희생시키고, 혈액, 비장 및 골수를 유세포 계측법에 의한 분석을 위해 수집한다. 골수는 대퇴골과 경골로부터 단리된다. 대퇴골의 골수는 또한 온 타겟 편집 분석에 사용된다. FACSCantoTM 10 컬러 및 BDFACSDivaTM 소프트웨어를 사용하여 유세포 분석을 수행한다. 세포는 일반적으로 7AAD 생존력 염료(생존/사멸 분석)를 사용하여 생존력에 의해 먼저 정렬된 다음, 살아있는 세포는 인간 CD45(hCD45)의 발현에 의해 게이팅되지만 마우스 CD45(mCD45)의 발현에 의해 게이팅되지 않는다. 그런 다음, hCD45+인 세포는 인간 CD19(hCD19)(림프구 세포, 구체적으로는 B 세포)의 발현에 대해 추가로 게이팅된다. 인간 CD45(hCD45)를 발현하는 세포 또한 게이팅되고, 골수 계통의 다양한 세포 마커의 존재에 대해 분석된다.

[0459] 분석된 마커들 각각을 발현하는 세포의 수는, 이들이 생착되는 편집된 세포가 어느 세포인지에 관계없이 모든 마우스에 걸쳐 비슷하며, 마우스의 혈액에서 CD34 gRNA로 편집된 CD34KO 세포의 성공적인 생착을 나타낸다.

[0460] 생착 후 8, 12, 및 16주차에, hCD45+인 유핵 혈액 세포의 백분율은 대조군 gRNA(gCtrl) 또는 CD34KO 세포로 편

집된 대조군 세포를 투여한 마우스(n=15 마우스/그룹)의 군에서 정량화된다. 이는 hCD45+ 절대 세포 수를 마우스 CD45+(mCD45) 절대 세포 수로 나눔으로써 정량화된다.

[0461] 혈액 내 hCD34+ 세포의 백분율은 대조군 및 CD34KO 마우스 그룹에서 생착 후 8주차에도 정량화된다. CD34KO 세포로 생착된 마우스(본원에 기술된 CD34 gRNA 중 어느 하나로 편집됨)는 8, 12 및 16주차에 대조군 세포로 생착된 마우스와 비교하여 유의하게 더 낮은 수준의 hCD34+ 세포를 가질 것으로 예상된다.

[0462] 다음으로, CD34KO 세포 또는 대조군 세포로 생착된 마우스에서 생착 후 8, 12, 및 16주차에 혈액 내 CD19+ 림프 세포, hCD14+ 단핵구, 및 hCD11b+ 과립구/호중구와 같은 분화된 세포의 특정 집단의 백분율을 정량화한다. 혈액 내 hCD19+ 세포, hCD14+ 세포, 및 hCD11b+ 세포의 수준은 대조군과 CD34KO 그룹 간에 동등하고, 이들 세포의 수준은 생착 후 8 내지 16주차에 균등하게 유지되었다. 혈액 내 hCD19+, hCD14+, 및 hCD11b+ 세포의 유사한 수준은 유사한 수준의 인간 골수 및 림프 세포 집단이 CD34KO 세포를 받은 마우스 및 대조군 세포를 받은 마우스에 존재함을 나타낸다.

[0463] 마지막으로, 생착 후 16주차에 단리된 골수 샘플에 대해 앰플리콘-seq를 수행하여, 편집된 CD34KO 세포로 생착된 마우스에서의 온 타겟 CD34 편집을 분석할 수 있다.

[0464] *생착된 동물의 비장으로부터 수득된 세포 샘플 평가*

[0465] 생착 후 16주차에, 대조군 세포 또는 CD34KO 세포로 생착된 마우스의 비장에서 hCD45+ 세포의 백분율 및 hCD34+ 세포의 백분율을 또한 정량화한다. (대조군 세포 또는 CD34KO 세포로 생착된) 마우스 그룹 사이에서 유사한 수준의 hCD45+ 세포 및 hCD34+ 세포의 감소된 수준은 NSG 마우스의 비장에서 CD34KO HSC의 장기 지속성을 나타낼 수 있다.

[0466] 또한, 생착 후 16주차에, 비장 내 hCD14+ 단핵구, hCD11b+ 과립구/호중구, CD19+ 림프 세포, 및 hCD3+ T 세포의 백분율을 정량화한다. 대조군과 CD34KO 그룹 사이에서 비장에서의 hCD14+ 세포, hCD11b+ 세포, hCD19+ 세포, 및 hCD3+의 유사한 수준은 편집된 CD34KO 세포가 NSG 마우스의 비장에서 다계열 인간 조혈 세포 재구성을 할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0467] *혈액 및 골수 호중구 평가*

[0468] 생착 후 16주차에, 대조군 세포 또는 CD34KO 세포로 생착된 마우스의 혈액 및 골수에서 hCD11b+ 세포의 백분율을 정량화한다. NSG 마우스의 혈액 및 골수 모두에서 대조군 세포 및 CD34KO 세포로 생착된 마우스에서 관찰된 CD11b+ 호중구 집단의 유사한 수준은 생착 및 분화가 성공적임을 나타낸다.

[0469] *혈액 및 골수 골수성 및 림프 전구 세포 평가*

[0470] 또한, 16주차에, 대조군 세포 또는 CD34KO 세포로 생착된 마우스에서 혈액 내 hCD123+ 세포의 백분율 및 골수 내 hCD123+ 세포의 백분율, 및 골수 내 hCD10+ 세포의 백분율을 정량화한다. 대조군과 CD34KO 그룹 간의 골수 전구 세포 및 림프 전구 세포의 유사한 수준은 생착 및 발생이 성공적임을 나타낼 수 있다.

[0471] **실시예 7: CD34 편집된-HSC 콜로니 형성 단위(CFU)의 유전자형 분석**

[0472] 본 실시예는 분화 전에 CFU 분석 및 인델 분석에 의한 예시적인 CD34 편집된 HSC의 특성화를 입증한다. HSC는 예시적인 가이드 RNA를 사용하여 편집하였다: CD34-2 또는 CD34-3.

[0473] 도 11a는 본 실시예 및 후속 실시예에서 HSC 편집을 위해 사용된 실험 접근법을 도시한다. 간략하게, $2x10^6$개의 냉동된 $CD34^+$ HSC를 해동하고, RNP로 전기천공 전에 StemSpan CC110 칵테일(StemCell Technologies)이 보충된 StemSpan SFEM 배지에서 약 48시간 동안 배양하였다. 대략 $2x10^5$개의 세포를 펠릿화하고 전기천공 용액에 재현탁하고, RNP의 형태로 3 μg Cas9 및 3 μg gRNA와 혼합하였다. 표준 전기천공 절차를 사용하여 CD34+ HSC를 전기천공하였다. $2x10^5$ 세포는 편집용 샘플(CD34-2 및 Cas9를 포함하는 RNP로 전기천공되거나, CD34-3 및 Cas9를 포함하는 RNP로 전기천공되지 않음) 뿐만 아니라, 전기천공 없음(EP 없음) 대조군 가이드(인간 게놈에 대해 설계되지 않은 대조군 가이드 RNA를 포함하는 RNP)로 전기천공된 샘플에 포함되었다.

[0474] *편집된 CD34 HSC CFU의 평가*

[0475] CFU 수준은 모의 치료를 받은 편집된 HSC 및 HSC에서 유사하였다(도 11b-11c). 이들 결과는 CD34 편집이 세포 분화에 영향을 미치지 않음을 시사한다. TIDE 분석은 CD34-2(가이드 2) 및 CD34-3(가이드 3)을 사용하여 얻은

개별 CD34 편집된 BFU 및 CFU의 편집 효율을 결정하는 데 사용되었다. 분석된 BFU 및 CFU의 대부분에서 적절한 편집 효율이 관찰되었다(도 11D 및 11E). CD34 편집된 HSC에서 생성된 편집물의 분석은 +1 인델이 CD34-2를 사용해 편집된 세포에서 우성 종(72%)이었음을 보여, 전사물의 조기 종결을 초래하는 프레임시프트(frameshift)를 초래하였다(도 11f, 11l, 11n 및 11p). 따라서, CD34-2를 사용하여 편집함으로써 생산된 인델의 우성 종은 절단된 단백질의 생산을 유도한다. CD34-3으로 편집된 세포는 -12개의 인델이 우성 종(32%)이고, 4개의 아미노산이 결실되고, 이어서 -1개의 인델(24%)이 생성되어, 전사체의 조기 종결을 초래하는 프레임시프트를 야기함을 보여주었다(도 11g, 11o, 및 11q).

[0476] BFU 및 CFU를 추가로 분석하여 편집이 단일- 또는 이중-대립유전자인지 여부를 결정하였다. 가이드 CD34-2 및 CD34-3을 사용하여 얻은 CD34 편집된 BFU 및 CFU에서 생성된 편집을 분석한 결과, 높은 백분율의 이중 대립(biallelic) 편집이 나타났다 (도 11h~11k). 이중 대립(biallelic) 편집은 CFU 및 BFU 모두에서 조사된 2개의 가이드에 대해 관찰되었다(도 11j 및 11k). 개별 콜로니에서의 인델 분석은 가이드 CD34-2에 대한 우성 +1 인델 및 가이드 CD34-3에 대한 우성 -12 및 -1 인델을 확인하였다(도 11l-11o). 두 가이드에 대한 우성 인델 종의 분석은, 가이드 CD34-2에 대한 +1 인델이 조기 종결 및 절단을 초래하는 반면(도 11n), 가이드 CD34-3에 대한 우성 -12 인델은 CD34의 세포외 도메인에서 4개의 아미노산을 결실시키고, 이 가이드에 대한 다음으로 가장 빈번한 -1 인델은 조기 종결 및 절단을 초래한다(도 11q).

[0477] *CD34 녹아웃 시간 경과 연구*

[0478] 3개의 상이한 공여자 HSC 샘플(공여자 1, 공여자 2, 및 공여자 3)의 생존력을 가이드 RNA CD34-2 또는 CD34-3을 사용하여 CD34 편집 후 평가하였다. 전술한 바와 같이 세포를 준비하고 전기천공하였다. 생체 외 편집 후 24시간 및 48시간에 생존 가능한 CD34 편집 세포(가이드 CD34-2 및 CD34-3 사용) 및 대조군 세포(전기천공되지 않음(EP 없음) 또는 CD34(sgCTRL)를 표적으로 하지 않는 대조군 가이드를 정량화하였다. CD34 편집된 세포는 전기천공 및 유전자 편집 후 시간 경과에 따라 생존가능하게 유지되었고, 대조군 gRNA로 전기천공된 대조군 세포 및 전기천공되지 않은 세포에 비해 CD34 편집된 세포에서는 생존율의 유의한 차이가 관찰되지 않았다(도 12a~12c).

[0479] 모든 게놈 분석을 위해, 세포에서 DNA를 수확하고, 표적 영역의 측면에 위치하는 프라이머로 증폭시키고, 정제하고, 대립유전자 변형 빈도를 TIDE(분해에 의한 인델(Indel)의 추적)를 사용하여 분석하였다. 참조로서 "EP 없음" 및 "sgCTRL" 데이터 세트 둘 다를 사용한 편집된 세포의 ICE 분석은, 인델 생성이 48시간 차에 검출 가능하고 CD34-2(도 12d, 12f 및 12h) 또는 CD34-3 가이드(도 12e, 12g 및 12i)로 편집된 3개의 편집된 공여자 HSC 샘플 모두에서 216시간 차에 여전히 존재함을 보여주었다. 편집된 공여자 HSC에 존재하는 인델의 우성 종은 실시예의 선행 부분에서 관찰된 것들에 상응하였다.

[0480] 편집된 HSC에서 표면 CD34 발현의 감소는 일부 경우에 전기천공 후 48시간부터, 모든 공여자 샘플에서 전기천공 후 120시간 차에 유세포 분석법에 의해 검출되었다(도 12j~12v). 이들 결과는 예시적인 가이드 CD34-2 또는 CD34-3 중 하나를 사용하여 HSC의 3개 기증자 샘플에서 CD34의 성공적인 파괴를 확인한다. 상이한 시점에서의 CD34+ 세포의 백분율을 가이드 CD34-2 또는 CD34-3을 사용하여 편집된 샘플뿐만 아니라 "EP 없음" 및 "sgCTRL" 대조군 샘플에 대해 함께 평균화하여 2개의 상이한 공여자를 계산하였다(도 12w). 결과 및 계산된 표준 편차는, 2개의 예시적인 가이드에 의해 편집된 공여자에 걸쳐, CD34+ 세포의 빈도를 상당히 감소시켰고, CD34-2에 대한 전기천공 후 216시간 차에 검출 가능한 CD34 발현을 나타내지 않는 세포 수의 ~85%를 나타냈으며, CD34-3에 대한 전기천공 후 216시간 차에 검출 가능한 CD34 발현을 나타내지 않는 세포 수를 70%를 초과하는 세포 수를 나타냈다.

[0481] **실시예 8: CD34 골수성 세포의 *시험관 내* 분화(IVD)**

[0482] 본 실시예는 본원에 제공된 예시적인 가이드 RNA를 사용하여 편집한 후 CD34 편집된 인간 HSPC의 시험관 내 분화 능력의 특성화를 입증한다. 과립구- 및 단핵구-유도 배지 조건에서 세포를 배양하여 분화 후 다양한 날에 가이드 CD34-2 또는 CD34-3을 사용하여 CD34의 CRISPR/Cas9 편집 시, 골수 분화에 대해 세포 집단을 평가하였다. 이어지는 실험 접근법이 도 13A에 도시되어 있다.

[0483] *시험관 내 분화된 HSC에서의 편집 결과의 평가*

[0484] 전기천공 후 48시간 차에, PCR 증폭 후 겔 전기영동을 통해 IVD 배지에서 배양된 세포에서 편집된 게놈 DNA의 존재를 확인하였다(도 13B). 전기천공 후 48시간 차에 편집된 HSC로부터 수확된 DNA를 TIDE 분석하여 CD34-2 처리 세포의 +1 위치에서, CD34-3-처리 세포의 -1 및 -12 위치에서 인델 생성의 편집 효율을 결정하여 성공적인 편집 결과를 확인하였다(도 13C 및 13D). CD34 편집 HSC로부터 발생하는 분화된 세포의 면역표현형은 CD34 편집

이 EP 없음 및 gCTRL 대조군 HSC와 비교하여 CD34 편집 세포의 분화 가능성에 영향을 미치지 않았음을 입증하였다(도 13E-13L). CD34 편집 세포 집단과 대조군 세포 집단 간에 분화 마커의 발현에 있어서 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 예를 들어, % 표면-마커 양성 세포로서 또는 기하 평균 형광 강도에 의해 평가된 단핵구 표면 마커 CD11b 또는 CD14 또는 CD15 과립구성 마커의 시간 경과에 따른 발현은 대조군 세포 집단과 비교하여 CD34 편집된 세포 집단에서 유의하게 다르지 않았다. 이러한 결과는 CD34 편집이 골수 계통으로 분화하거나 분화 편향을 유도하는 편집된 HSC의 분화 능력을 파괴하지 않음을 입증한다.

[0485] **실시예 9: *생체 내* CD34 편집된 마우스의 특성 분석**

[0486] 본 실시예는 마우스 모델에서 CD34 편집 HSC를 *생체 내에서* 특성화하는 생체 내 실험을 기술한다. 예시적인 실험 설정이 도 14A에 도시되어 있다.

[0487] 간략하게, 인간 CD34+ HSC는 예시적인 CD34 표적 가이드 RNA(CD34-2 및 CD34-3)와 비-CD34 표적 제어 gRNA(gCtrl)를 사용하여 본원에서 설명된 대로 CRISPR/Cas9을 통해 편집되었다. *생체 외* 편집 후 24시간 및 48시간 차에, 생존성, CD34 편집 세포 및 대조군 세포의 백분율을 정량화하고, 적절한 생존력(>80%) 및 편집(>60%) 수준을 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된 바와 같이 확인하였다. 편집된 세포를 CS10 배지(Stem Cell Technology)에서 $5x10^6$ 세포/mL로 바이알당 1 mL 부피의 배지로 동결보존하였다.

[0488] 동결 보존된 세포를 해동하고 BioRad TC-20 자동화 세포 계수기를 사용하여 계수하였다. 해동된 바이알에서 생존 세포의 수를 정량화하고, 마우스에서 생착을 위한 세포의 총 수를 제조하는 데 사용하였다. 실험의 0일차에, 6 내지 8주령인 암컷 NSG 마우스(JAX)를 175 cGy의 전신 조사를 사용하여 조사하였고, 조사 후 4 내지 10시간 차에, 마우스에 본원에 기술된 바와 같이 생성된 CD34 편집 세포 또는 gCtrl로 전기천공된 대조군 세포를 생착시켰다. 100 μL 부피로 $1x10^6$ 편집된 세포를 마우스에게 1회 정맥내 주사하였다. 체중 및 임상 관찰을 3개의 그룹의 각 마우스에 대해 매주 1회 기록하였다.

[0489] 생착 후 8, 9, 및 12주차에, 유세포 계측법에 의한 분석을 위해 50 μL의 혈액을 각 마우스로부터 안와후 출혈에 의해 수집한다. 생착 후 16주차에, 마우스를 희생시키고, 혈액, 비장, 골수, 및 흉선을 유세포 계측법에 의한 분석을 위해 수집한다. 골수는 대퇴골과 경골로부터 단리된다. 대퇴골의 골수는 또한 온 타겟 편집 분석에 사용된다. 유세포 계측은 Beckman Coulter CytoFLEX LX 소프트웨어를 사용하여 수행된다. 세포는 일반적으로 생존력에 대해 먼저 정렬되고(예를 들어, 7AAD 생존력 염료(살아 있는/죽은 분석)를 사용하여), 이어서 살아있는 세포는 인간 CD45(hCD45)의 발현에 의해 게이팅되지만 마우스 CD45(mCD45)에 대해서는 그렇지 않다. 그런 다음, hCD45+인 세포는 인간 HSC로부터 유래된 세포에 의한 혈액계의 생착 및 재증식을 입증하기 위해 인간 림프구 또는 골수 세포 표면 마커의 발현에 대해 추가로 게이팅된다. 예를 들어, 인간 CD45를 발현하는 세포를 CD19(hCD19)의 발현에 대해 분석하고, 림프 세포, 구체적으로 B 세포를 검출하거나, 다른 림프 세포 마커, 예를 들어, T 세포 마커 또는 NK 세포 마커의 발현을 분석한다. 인간 CD45(hCD45)를 발현하는 세포는 또한 골수 계통의 다양한 세포 마커의 존재에 대해 분석된다.

[0490] 생착 후 8, 12 및 16주차에, hCD45+인 유핵 혈액 세포의 백분율은 대조군 gRNA(gCtrl) 또는 CD34 편집된 세포로 편집된 대조군 세포를 받은 마우스 그룹(n=10 마우스/그룹)에서 정량화된다. 이 값은 hCD45+ 절대 세포 수를 마우스 CD45+(mCD45) 절대 세포 수로 나눔으로써 계산된다.

[0491] 혈액 중 hCD34+ 세포의 백분율은 또한 인간 및 마우스 세포 키메라증에 대한 평가로서 대조군 및 CD34 편집된 마우스 그룹에서 생착 후 8주차에 정량화된다. CD34 편집된 세포(예를 들어, 본원에 기술된 CD34-2로 편집됨)로 생착된 마우스는 8, 12 및 16주차에 대조군 세포(CD34 편집된, 예를 들어, 전기천공이 없음)로 생착된 마우스와 비교하여 유사한 수준의 hCD34CD34+ 세포를 갖는다.

[0492] 다음으로, 분화된 세포의 특정 집단의 백분율을 분석한다. 예를 들어, 혈액 내 CD19+ 림프 세포, hCD14+ 단핵구, 및 hCD11b+ 과립구/호중구의 백분율은 CD34 편집된 세포 또는 대조군 세포로 생착된 마우스에서 생착 후 8, 12, 및 16주차에 정량화된다. 혈액 내 hCD19+ 세포, hCD14+ 세포, 및 hCD11b+ 세포의 수준은 대조군과 CD34 편집 그룹 간에 동등하며, 이들 세포의 수준은 생착 후 8 내지 16주차에 균등하게 유지된다. 혈액에서 hCD19+, hCD14+, 및 hCD11b+ 세포의 유사한 수준이 관찰되며, 이는 방사선 조사된 NSG 마우스에서 CD34 편집된 HSC의 성공적인 생착 및 분화를 나타내며, 대조군 세포를 수용하는 마우스 및 CD34 편집된 세포를 수용하는 마우스에는 유사한 수준의 인간 골수 및 림프 세포 집단이 존재함을 입증한다.

[0493] CD34 편집의 존재 및 빈도는 CD34 편집된 세포 집단을 받은 NSG 동물의 생착된 세포에서 확인된다. Amplicon-

seq는, CD34 편집된 세포로 생착된 마우스에서 CD34 편집을 분석하기 위해 생착 후 16주차에 단리된 골수 샘플에 대해 수행된다. 골수에서 CD34 편집된 세포의 존재가 확인되어, CD34 편집된 세포가 성공적으로 생착할 수 있음을 입증한다. CD34 편집된 HSC의 존재는 면역표현형화 골수 유래 세포 또는 순환 PBMC 세포 및 CD34-, CD45RA-, CD49c+, CD90+, CD201+, 및 lin-인 CD34 편집된 세포를 식별함으로써 확인된다.

[0494] 생착 후 16주차에, 대조군 세포 또는 CD34 편집된 세포로 생착된 마우스의 혈액 및 골수에서 hCD11b+ 세포의 백분율을 정량화한다. NSG 마우스의 혈액 및 골수 모두에서 대조군 세포 및 CD34 편집된 세포로 생착된 마우스에서 관찰된 CD11b+ 호중구 집단의 유사한 수준은 성공적인 생착 및 분화를 나타낸다.

[0495] 생착 후 16주차에, 대조군 세포 또는 CD34 편집된 세포로 생착된 마우스의 비장에서 hCD45+ 세포의 백분율 및 hCD34+ 세포의 백분율을 또한 정량화한다. (대조군 세포 또는 CD34 편집된 세포로 생착된) 마우스 그룹 사이에서 유사한 수준의 hCD45+ 세포 및 hCD34+ 세포의 감소된 수준은 NSG 마우스의 비장에서 CD34 편집된 HSC의 장기 지속성을 나타낼 수 있다. 또한, 생착 후 16주차에, 비장 내 hCD14+ 단핵구, hCD11b+ 과립구/호중구, CD19+ 림프 세포, 및 hCD3+ T 세포의 백분율을 정량화한다. 대조군과 CD34 편집된 그룹 사이에서 비장에서 hCD14+ 세포, hCD11b+ 세포, hCD19+ 세포, 및 hCD3+의 유사한 수준은 CD34 편집된 세포가 NSG 마우스의 비장에서 다계열 인간 조혈 세포 재구성을 할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0496] 생착 후 16주차에, 대조군 세포 또는 CD34 편집된 세포로 생착된 마우스의 흉선에서도 hCD45+ 세포의 백분율 및 hCD34+ 세포의 백분율을 정량화한다. 또한, 생착 후 16주차에, 흉선에서 CD3+ 세포의 백분율(hCD45+ 세포의 백분율로서)을 정량화한다. 대조군과 CD34 편집된 그룹 간에 흉선에서 hCD3+의 유사한 수준은 CD34 편집된 세포가 NSG 마우스의 흉선에서 다계열 인간 조혈 세포 재구성을 할 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0497] **실시예 10: 조혈 장애를 가진 대상체에서 CD34+ HSC의 제거**

[0498] 악성 세포(예를 들어, 암 줄기 세포)가 CD34를 발현하는 혈액 악성 종양과 같은 조혈 장애를 가진 대상체는CD34 편집된 HSC를 포함하는 동종 조혈 세포 이식(HCT) 및 항-CD34 면역치료제, 예를 들어, 칼리케아미신 모이어티에 접합된 CD34 항체로 치료된다.

[0499] HCT의 경우, CD34 편집된 조혈 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단은, 예를 들어, 건강한 공여자로부터 HSC를 수득하는 것에 의해, 8/8개의 유전자좌(HLA-A, -B, -C, DRB1)에서 대상체에게 HLA 일치시키고, 가이드 CD34-2 또는 CD34-3을 사용하여 HSC를 편집함으로써 수득된다.

[0500] HSC는 G-CSF/plerixafor를 사용하여 최대 2회의 성분 채집 절차로 동원 후 공여자로부터 얻는다. 처리, 편집 및 수용자 대상체에 대한 후속 투여를 위해 성분채집에 의해 공여자로부터 최소 10 x 10^6 생존 세포/kg(여기서 kg은 수용자 대상체의 체중을 의미함)를 수득한다. 이러한 성분채집 생성물로부터, 적어도 3.0 x 10^6 살아있는 세포/kg(수혜자 중량)은 최소의 조작을 거치며, 예를 들어, 구제 용량으로서 사용하기 위한 백업 줄기 세포 공급원으로서의 역할을 하도록 동결보존한다. 성분채집의 나머지는 HCT에 대한 CD34 편집된 HSC 집단의 처리 및 제조에 사용된다.

[0501] HCT에 대한 CD34 편집된 HSC 집단은 CD34+ 세포에 대한 성분채집 산물을 농축한 다음, 본원에 기술된 CD34 가이드 CD34-2 또는 CD34-3을 사용하여 전술한 CD34 gRNA/Cas9 복합체로 전기천공 및 편집함으로써 제조된다.

[0502] 이어서, CD34 편집된 세포를 약 48시간 동안 배양물 내에 둔다. 수확 후, 배양 기간이 완료된 후, 세포를 세척하고, 최종 제형에 재현탁하고, 동결보존한다. 세포 생존력 및 편집 효율은 대표적인 샘플을 사용하여 확인되고, CD34 편집된 HSC 집단은 적어도 70%의 생존 세포를 포함하는 것으로 확인되고, 적어도 45%의 CD34 편집 효율이 HCT에 사용된다. 대상체에게 투여하기 위한 CD34 편집된 세포 집단은 이러한 생존력 및 편집 효율 기준을 만족시키고 수용자 대상체의 체중 kg당 적어도 3 x 10^6 세포, 바람직하게는 대상체의 kg당 적어도 4 x 10^6 세포, kg당 5 x 10^6 세포, kg당 6 x 10^6 세포, 또는 kg당 7 x 10^6 세포를 포함하는 CD34 편집된 HSC 집단을 포함한다.

[0503] 대상체는 CD34를 발현하는 임의의 악성 세포를 포함하여, 대상체의 조혈 줄기 세포를 제거하기 위한 일상적인 임상 절차를 사용하여 컨디셔닝된다. 컨디셔닝 요법을 완료한 후, 대상체는 정맥내(IV) 주입을 통해 해동된 CD34 편집된 HSC를 포함하는 HCT를 받는다. HCT를 받은 날은 치료 요법의 0일차이다.

[0504] 대상체에서 CD34 편집된 (CD34-, 예를 들어, 절단된 CD34 또는 에피토프-편집된 CD34) 호중구에 대한 절대 말초 호중구 수(ANC)를 측정함으로써, 대상체는 28일차에 CD34 편집된 HSC 생착에 대해 평가된다. 대상체가 HCT 후

28일차에 절대 말초 CD34 편집된 호중구 수 ≥1000/dL CD33-ANC를 나타내는 경우, 대상체는 호중구 회복(또한 성공적인 CD34 편집된 호중구 생착으로 지칭됨)을 나타내는 것으로 간주된다.

[0505] 대상체가 28일차에 호중구 회복을 나타내는 경우, 질환 상태 및 조혈 회복을 평가하기 위해 60일차에 대상체로부터 골수 생검을 수득한다. 또한, 공여자 키메라증 및 CD34 편집된 골수 조혈의 백분율은 이 시점에서 말초 혈액으로부터 결정된다. 대상체가 60일차에 성공적인 CD34 편집된 HSC 생착 및 CD34 편집된 조혈을 나타내는 경우, 이어서 CD34-항체-약물 접합체가 대상체에게 투여된다. CD34 표적 면역치료제, 예를 들어, 항-CD34 항체-약물-접합체의 투여는 바람직하게는 60일차에 골수 생검 후 30일 이내에 개시되며, 즉, 바람직하게는 90일차에 개시된다. 그러나 대상체의 임상 상태(예: HCT 관련 동반 질환을 포함한 동반 질환을 고려할 때)가 그러한 지연을 필요로 하는 경우 또는 대상체가 ≥1000/dL CD33-ANC에 도달할 수 있도록 하기 위해 CD34 표적 면역 치료제의 개시가 최대 120일까지 지연될 수 있다. 골수 생검 60일 이후 30일이 지나서 CD34 표적 면역 치료제를 개시하는 경우, CD34 표적 면역 치료제를 개시하기 전에 반복 골수 생검을 완료한다.

[0506] CD34 표적 면역치료제는 대상체에서 모든 CD34 발현 조혈 세포를 제거하기 위해 그 권장 투여량으로 투여된다. 그러나, 일부 대상체에는, 예를 들어, 치료-관련 역효과의 사건, 예를 들어, 용량-제한 독성(DLT)의 경우, 또는 개별 대상체의 건강 상태, 동반질환, 또는 병력의 관점에서 더 낮은 용량을 투여할 수 있다.

[0507] 대안적으로, 대상체는 HCT 전에 대상체의 자체 CD34 발현 혈액 세포를 제거하기 위한 종래의 컨디셔닝 요법을 받지 않지만, 대상체의 CD34 발현 세포는 CD34 표적 항체-약물 접합체 또는 CD34 표적 CAR-T 세포 집단과 같은 CD34 표적 면역 치료제의 투여로 표적화된다. 이러한 시나리오에서, 대상체에게 CD34 편집된 HSC의 HCT 이전에 면역치료제의 사이클, 및 HCT 이후에 면역치료제의 사이클이 투여될 수 있다. 대안적으로, 대상체에게 HCT에 후속하는 면역치료제가 하나 이상의 사이클로 투여될 수 있으므로, HCT 전 컨디셔닝 요법을 완전히 능가한다.

[0508] 면역치료제의 투여 후, 대상체는 악성 세포의 존재에 대해 평가된다. 대상체에서 악성 세포, 특히 CD34 발현 악성 세포의 수의 유의한 감소, 또는 CD34 발현 악성 세포의 완전한 제거가 관찰된다. 또한, CD34 편집된 HSC의 장기 생착 및 CD34 편집된 HSC로부터의 모든 세포 계통의 재구성이 대상체에서 관찰된다.

[0509] 균등 및 범위

[0510] 당 기술분야의 숙련자는 본원에 기술된 구현예의 많은 등가물을 일상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본 개시의 범주는 상기 설명에 제한되는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위에 기재된 바와 같다.

[0511] "하나의(a)", "하나의(an)" 및 "그(the)"와 같은 관사는 달리 명시되지 않거나 문맥에서 달리 명백하지 않는 한 하나 또는 둘 이상을 의미할 수 있다. 군의 둘 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 군 구성원 중 하나, 둘 이상 또는 모두가 존재하는 경우 반대되는 의미가 없거나 문맥에서 달리 명백하지 않는 한 충족되는 것으로 간주된다. 둘 이상의 군 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 군의 개시내용은 그룹의 정확히 한 구성원이 존재하는 실시예, 군의 구성원이 둘 이상 존재하는 실시예, 및 군 구성원 모두가 존재하는 실시예인 실시예를 제공한다. 간결성을 위해, 이들 구현예는 본원에서 개별적으로 설명되지 않았지만, 이들 구현예 각각은 본원에 제공되며 구체적으로 청구되거나 부인될 수 있음을 이해할 것이다.

[0512] 본 발명은 청구범위 중 하나 이상 또는 본 명세서의 하나 이상의 관련 부분으로부터 하나 이상의 제한, 요소, 조항 또는 기술 용어가 다른 청구범위에 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 다른 청구범위에 종속된 청구범위은 동일한 기본 청구범위에 종속된 다른 청구범위에서 발견되는 하나 이상의 제한 사항을 포함하도록 수정될 수 있다. 또한, 청구범위가 조성물을 인용하는 경우, 달리 명시되지 않는 한, 또는 모순 또는 불일치가 발생한다는 것이 당 기술분야의 숙련자에게 명백하지 않는 한, 본원에 개시된 임의의 제조 또는 사용 방법에 따라 또는 존재하는 경우 당 기술분야에 공지된 방법에 따라 조성물을 제조 또는 사용하는 방법이 포함됨을 이해해야 한다.

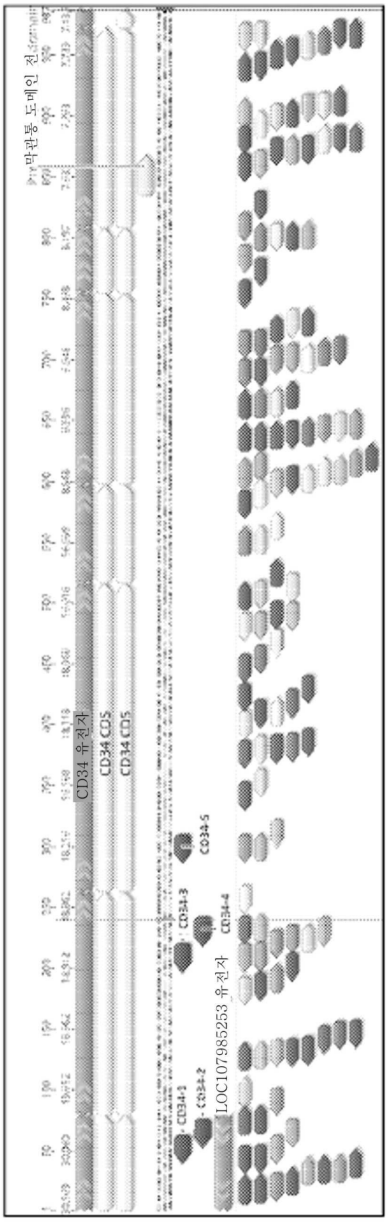
[0513] 요소가 목록으로, *예를 들어*, 마쿠쉬 그룹 포맷으로 제시되는 경우, 요소의 가능한 모든 하위그룹이 또한 개시되고, 임의의 요소 또는 요소의 하위그룹이 그룹으로부터 제거될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 또한 "포함하는(comprising)"이라는 용어는 개방적인 것으로 의도되고 추가 요소 또는 단계의 포함을 허용한다는 점에 유의한다. 일반적으로 실시예, 제품, 또는 방법이 특정 요소, 특징 또는 단계를 포함하는 것으로 언급되는 경우, 이러한 요소, 특징 또는 단계로 이루어지거나 본질적으로 이루어지는 실시예, 제품, 또는 방법도 또한 제공된다는 것을 이해해야 한다. 간결함을 위해 이들 실시예는 본 명세서에서 개별적으로 설명되지 않았지만, 이들 실시예 각각은 본 명세서에서 제공되며 구체적으로 청구되거나 부인될 수 있음을 이해할 것이다.

[0514] 범위가 주어진 경우, 종점이 포함된다. 또한, 달리 나타내지 않거나 문맥 및/또는 당 기술분야의 숙련자의 이해로부터 달리 명백하지 않는 한, 범위로 표현되는 값은 문맥이 달리 명시하지 않는 한 일부 서구현예에서에서 범위의 하한 단위의 10분의 1까지 명시된 범위 내에서 임의의 특정 값을 가정할 수 있다. 간결함을 위해, 각 범위의 값은 본 명세서에서 개별적으로 철자하지 않았지만, 이러한 각 값은 본 명세서에서 제공되며 구체적으로 청구되거나 부인될 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 달리 나타내지 않거나 문맥상 및/또는 당업자의 이해로부터 달리 명백하지 않는 한, 범위로 표현된 값은 주어진 범위 내의 모든 하위 범위를 가정할 수 있으며 하위 범위의 끝점은 범위 하한 단위의 10분의 1과 동일한 정확도로 표현된다.

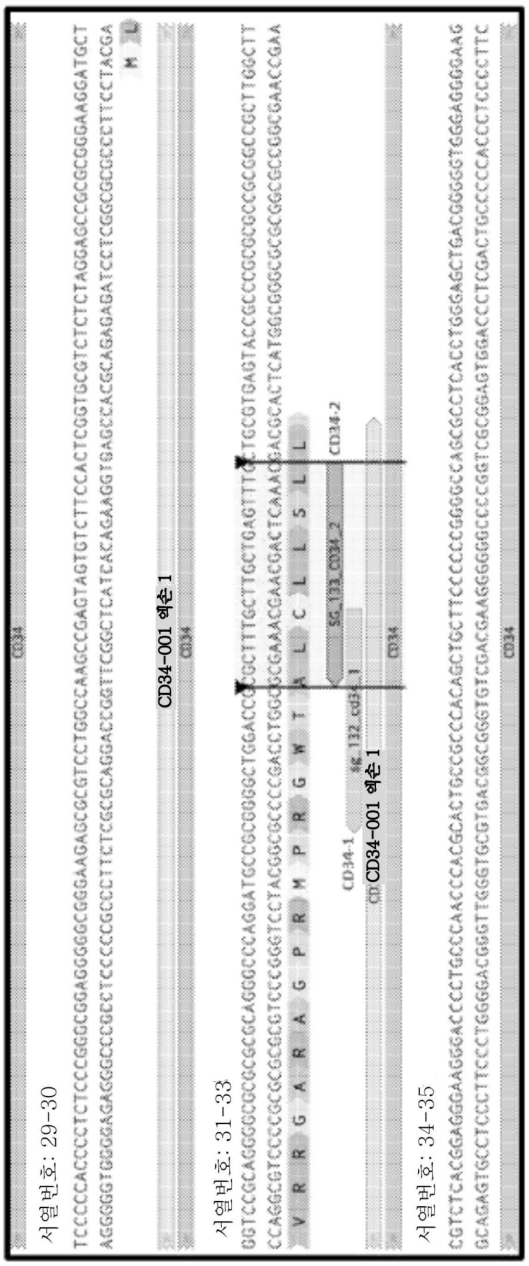
[0515] 또한, 본 발명의 임의의 특정 실시예는 임의의 하나 이상의 청구범위로부터 명시적으로 제외될 수 있음을 이해해야 한다. 범위가 주어진 경우, 범위 내의 모든 값은 하나 이상의 청구범위에서 명시적으로 제외될 수 있다. 본원에 기술된 조성물 및/또는 방법의 임의의 구현예, 요소, 특징, 적용 또는 양태는 임의의 하나 이상의 청구범위로부터 배제될 수 있다. 간결함을 위해, 하나 이상의 요소, 특징, 목적 또는 측면이 배제된 모든 실시예는 여기에서 명시적으로 설명되지 않는다.

도면

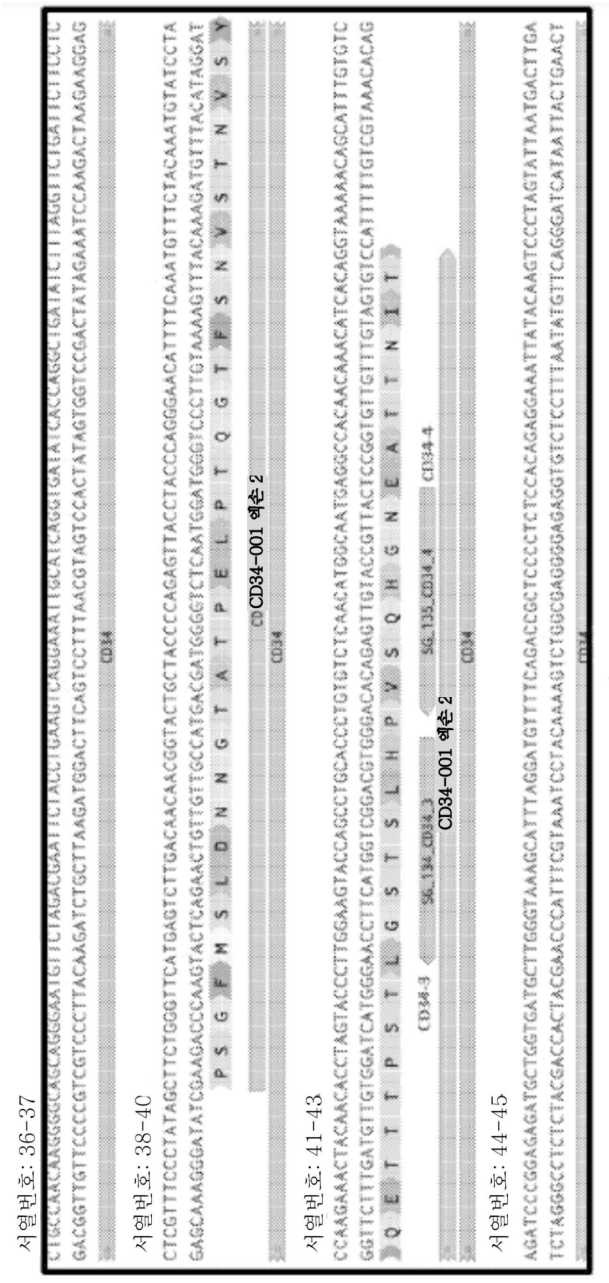
도면1



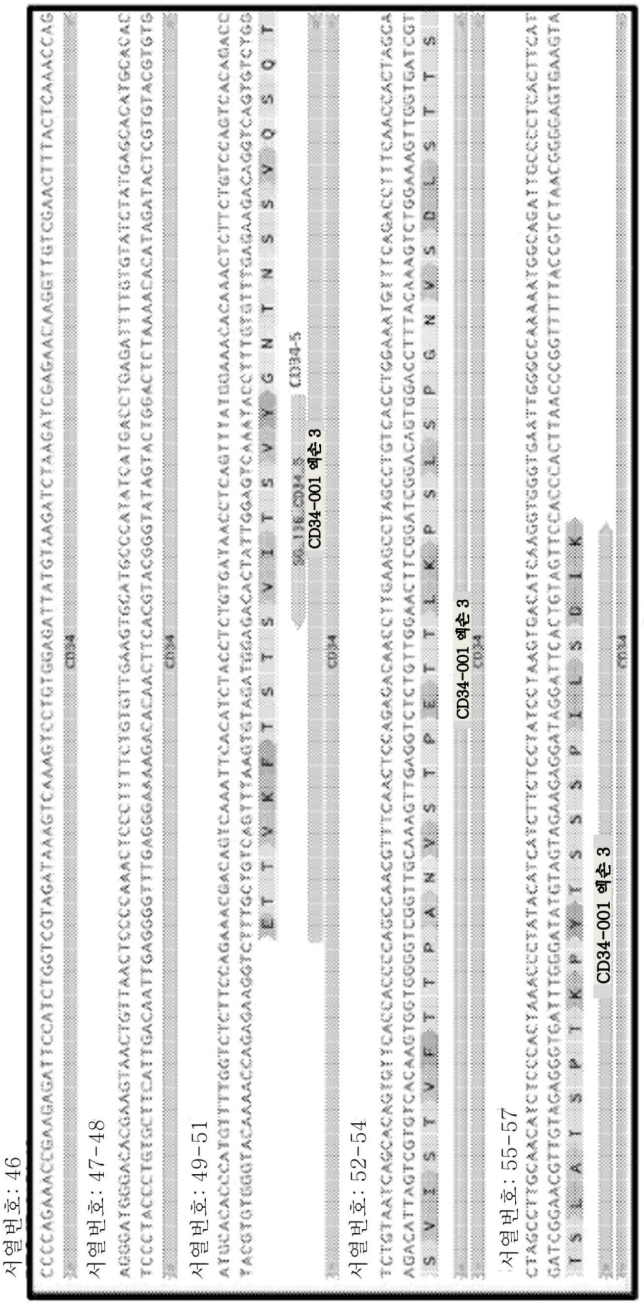
도면2a


서열번호: 29-30
서열번호: 31-33
서열번호: 34-35
CD34-001 엑손 1
CD34-1
CD34-2
SG_133_CD34_2
SG_132_CD3
CD34-001 엑손 1
CD34

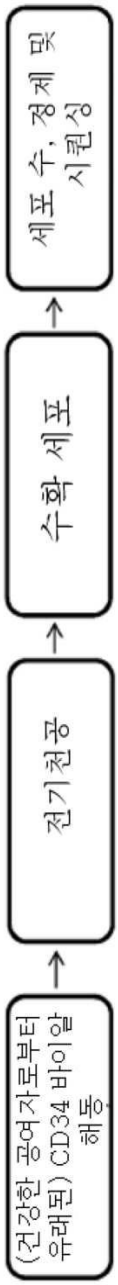
도면2b


서열번호: 36-37
CD34
서열번호: 38-40
P S G F M S L D N N G T A T P E L P T Q G T F S N V S T N V S Y
CD CD34-001 엑손 2
CD34
서열번호: 41-43
Q E T T T P S T L G S T S L H P V S Q H G N E A T T N I T
CD34-3
SG_134_CD34_3
CD34-001 엑손 2
SG_135_CD34_4
CD34-4
CD34
서열번호: 44-45
CD34

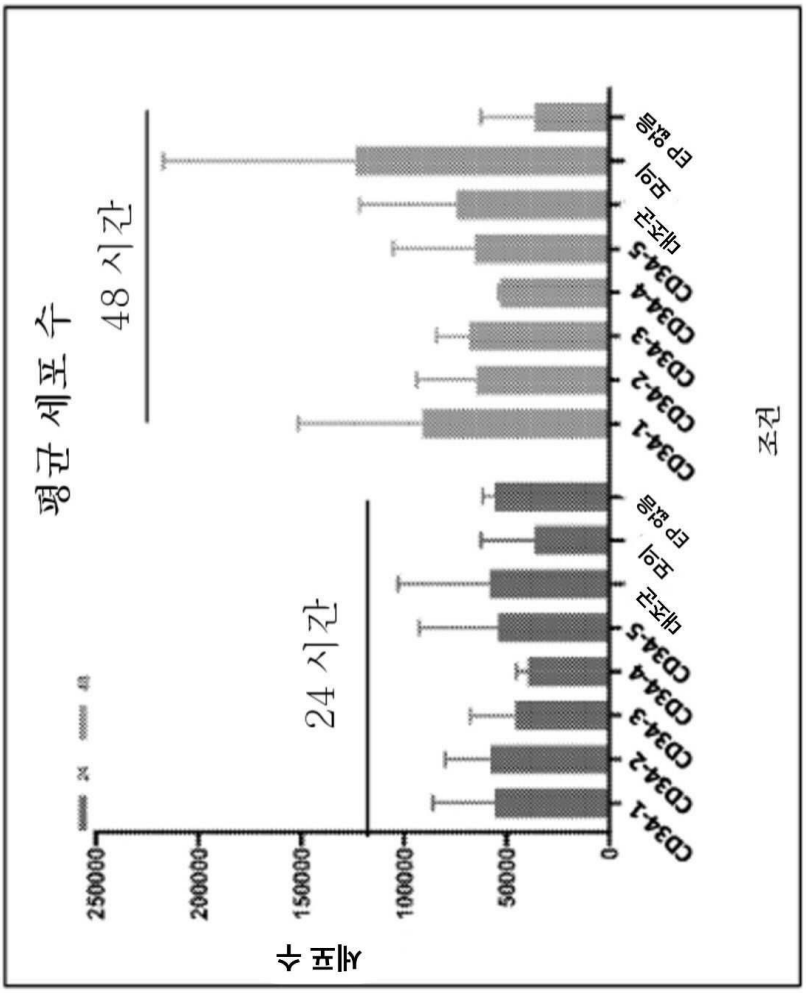
도면2c


서열번호: 46
서열번호: 47-48
서열번호: 49-51
서열번호: 52-54
서열번호: 55-57
CD34
CD34-001 예손 3
CD34-5

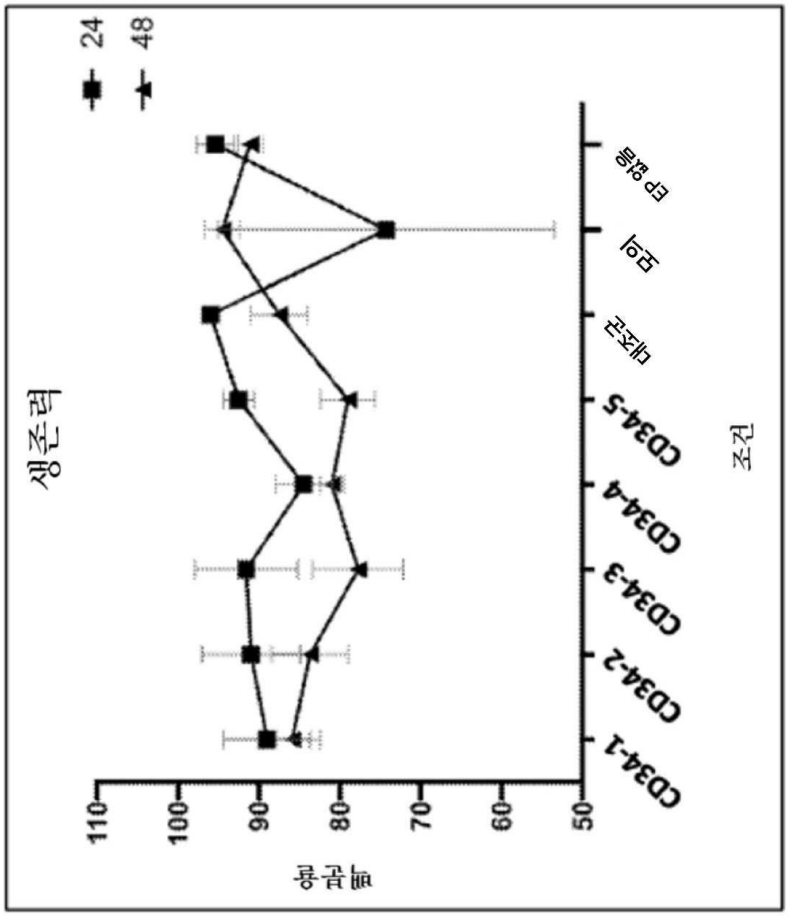
도면3a



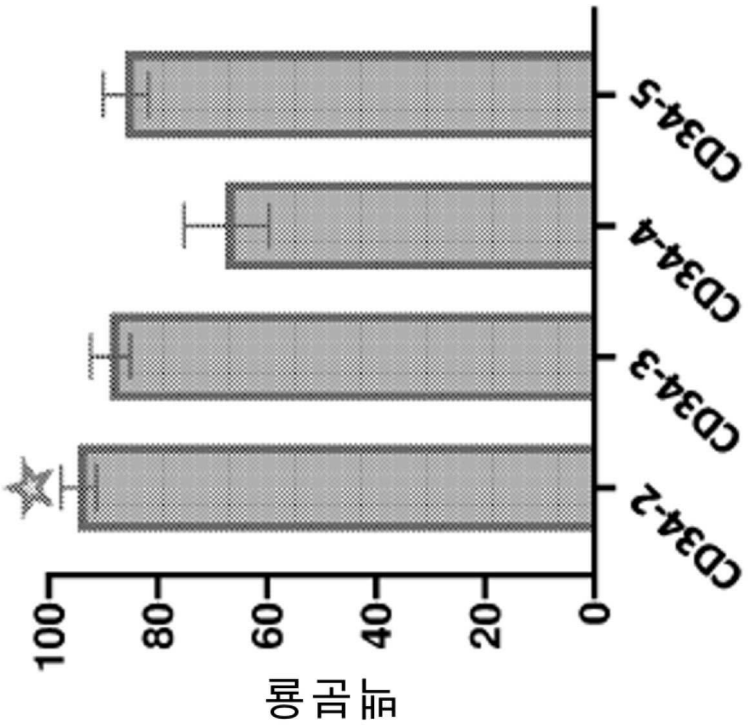
도면3b


평균 세포 수
48 시간
24 시간
세포 수
250000
200000
150000
100000
50000
0
CD34-1
CD34-2
CD34-3
CD34-4
CD34-5
대조군
모의
EP 유발
조건

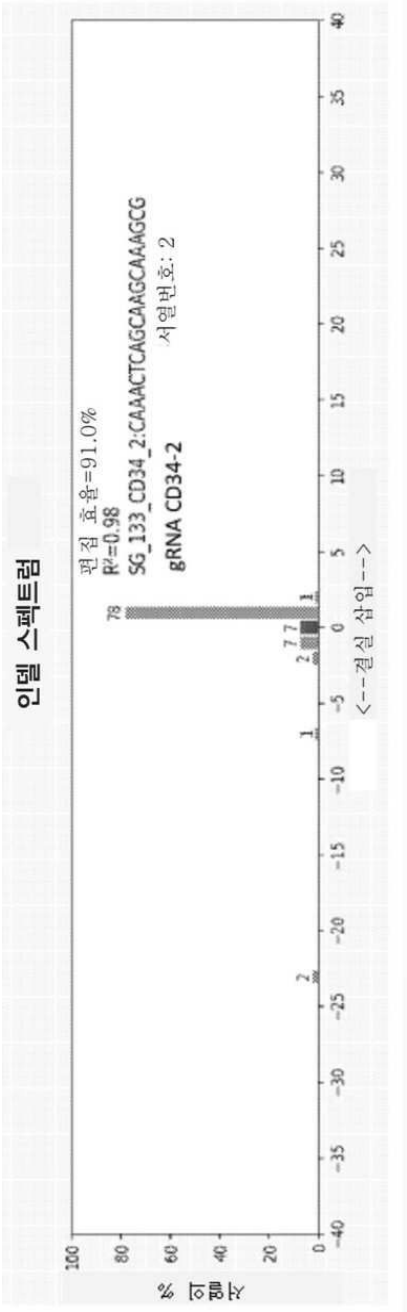
도면3c


생존력
24
48
백분율
110
100
90
80
70
60
50
CD34-1
CD34-2
CD34-3
CD34-4
CD34-5
대조군
EPI
EP 없음
조건

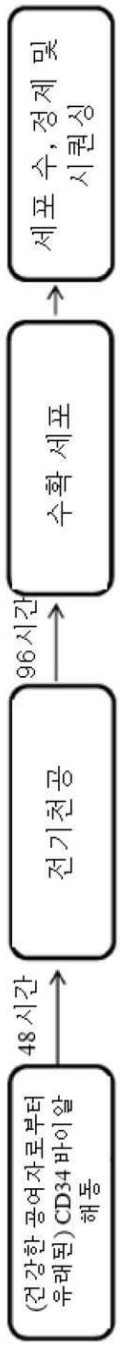
도면3d



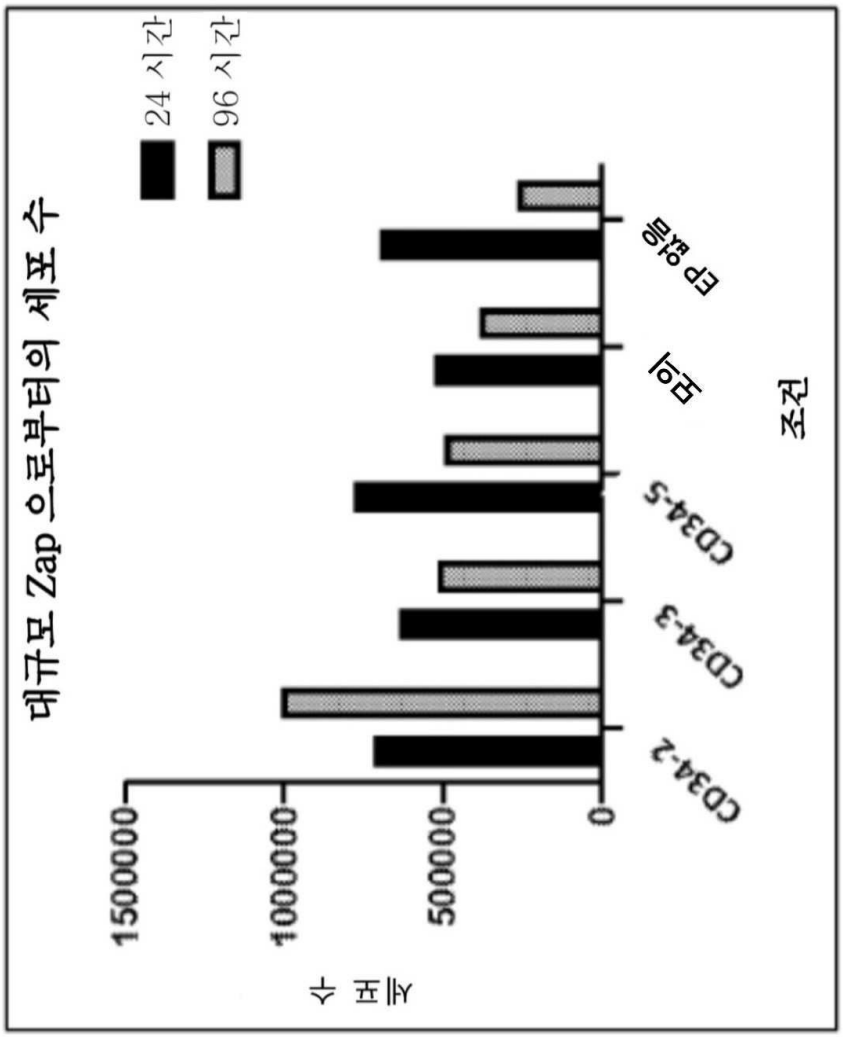
도면4


인델 스펙트럼
편집 효율=91.0%
R²=0.98
SG_133_CD34_2:CAAACTCAGCAAGCAAAGCG
서열번호: 2
gRNA CD34-2
<--결실 삽입-->
서열의 %

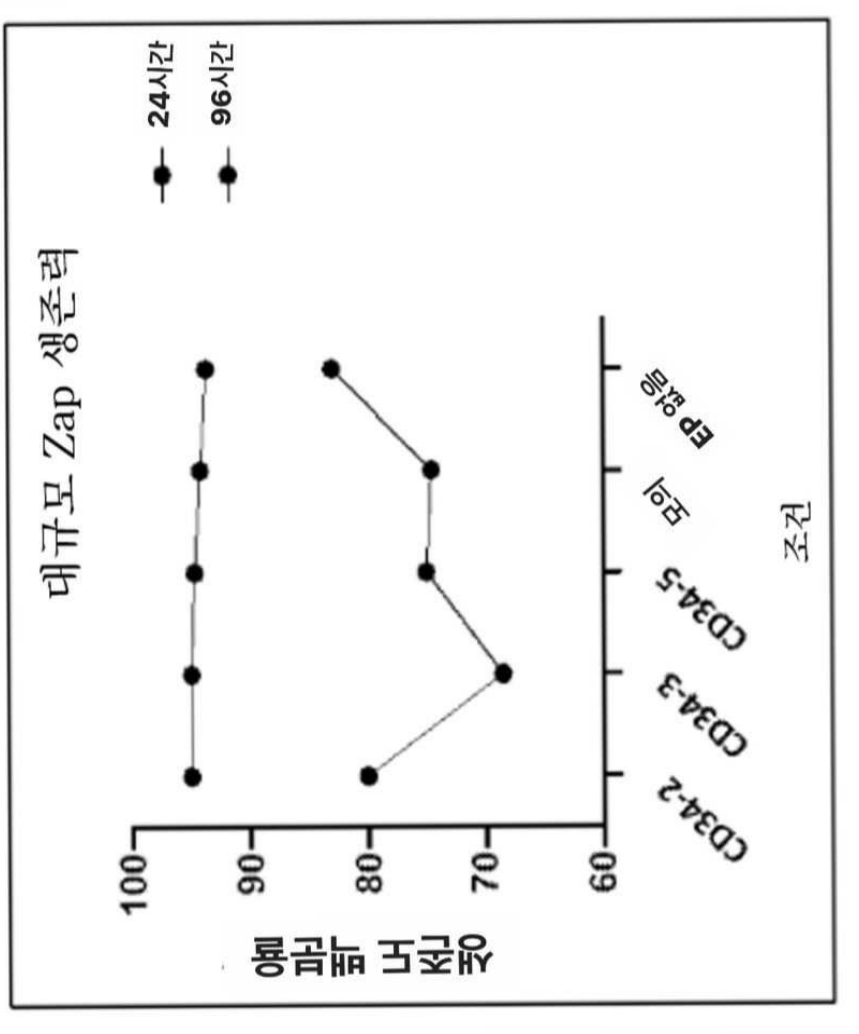
도면5a



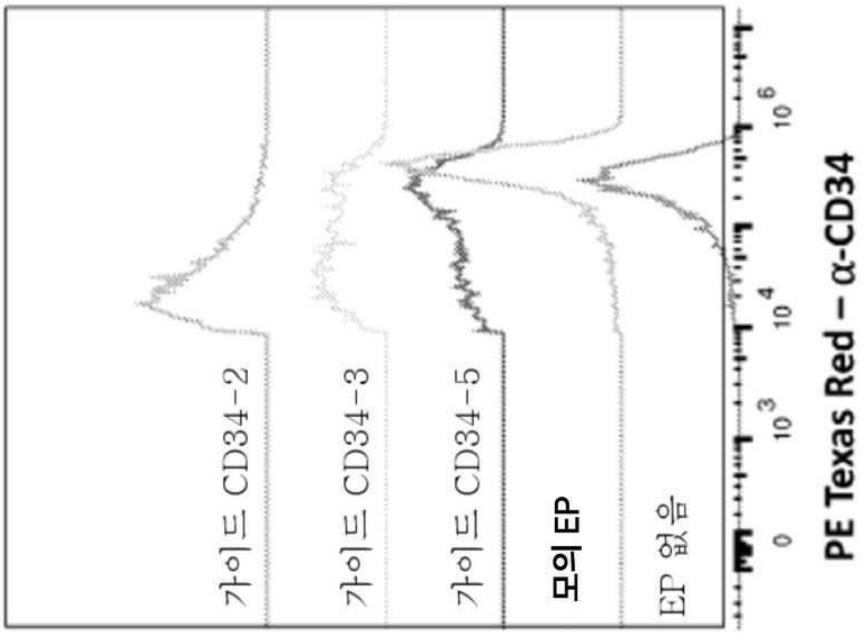
도면5b


대규모 Zap 으로부터의 세포 수
24 시간
96 시간
세포 수
1500000
1000000
500000
0
CD34-2
CD34-3
CD34-5
무처리
EP 없음
조건

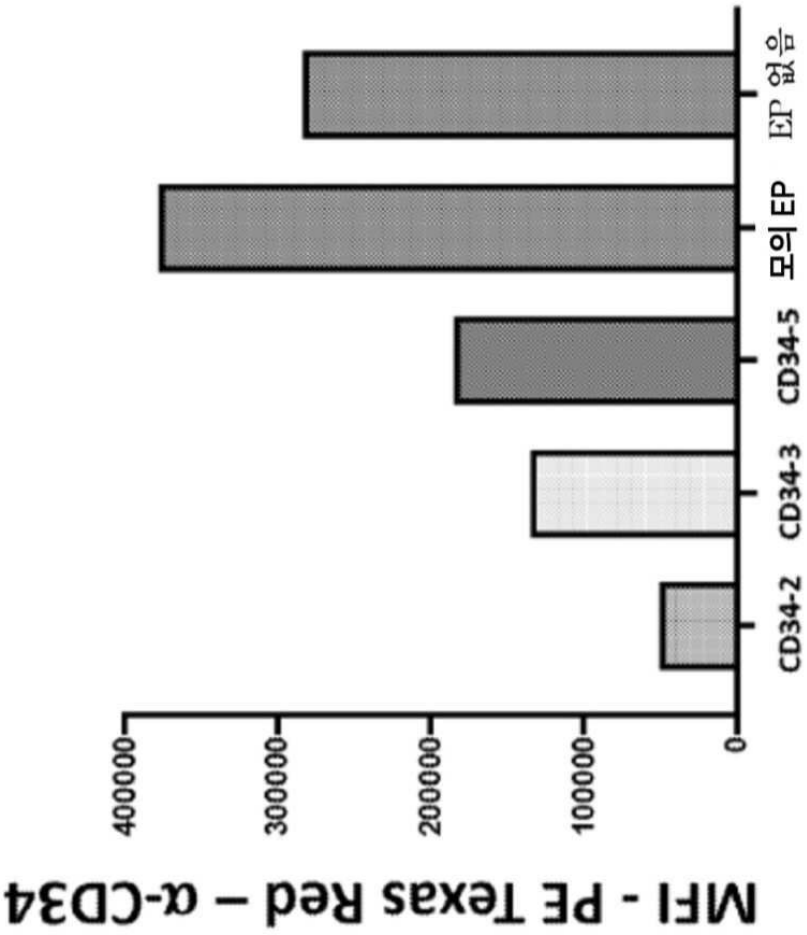
도면5c


대규모 Zap 생존력
24시간
96시간
생존 세포 백분율
100
90
80
70
60
CD34-2
CD34-3
CD34-5
없음
EP 없음
조건

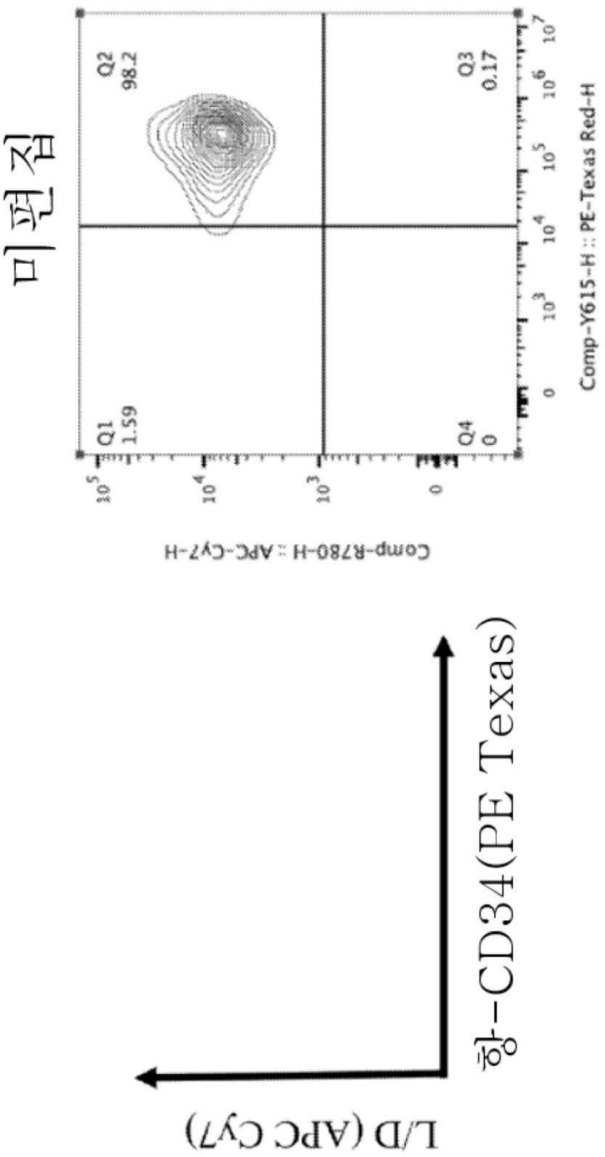
도면6a


가이드 CD34-2
가이드 CD34-3
가이드 CD34-5
모의 EP
EP 없음
0
10^3
10^4
10^6
PE Texas Red – α-CD34

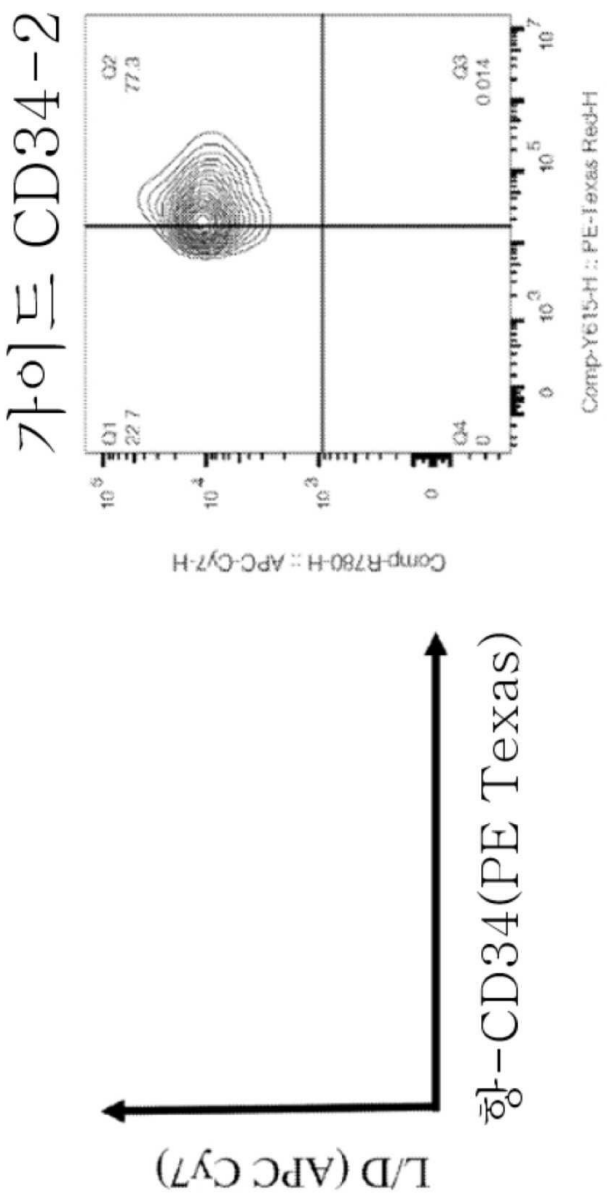
도면6b


MFI - PE Texas Red – α-CD34
400000
300000
200000
100000
0
CD34-2
CD34-3
CD34-5
모의 EP
EP 없음

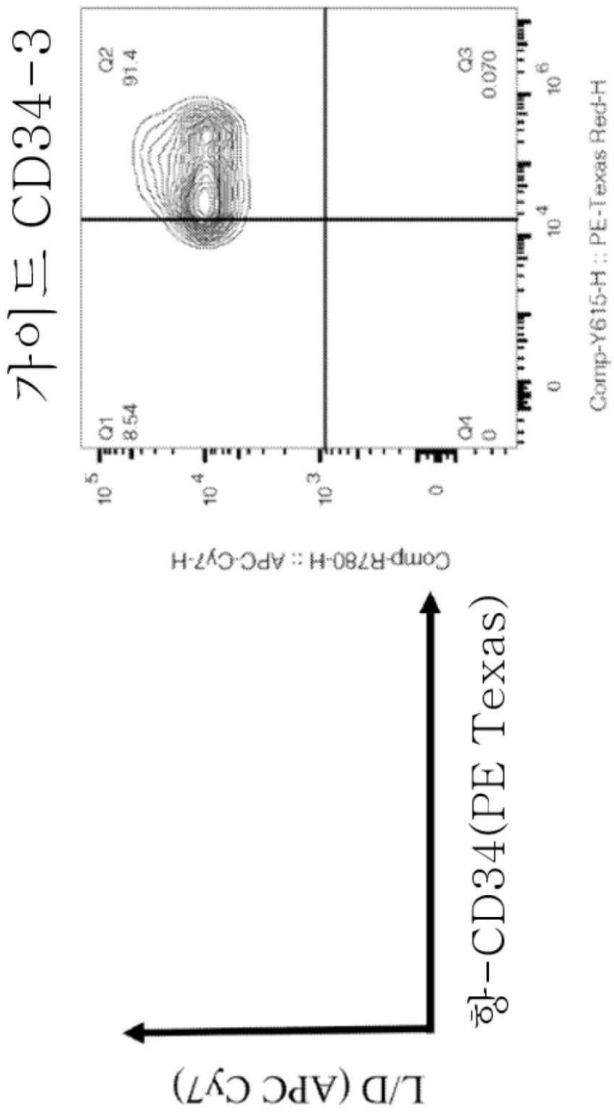
도면7a


미분집
Q2
98.2
Q3
0.17
Q1
1.59
Q4
0
Comp-Y615-H :: PE-Texas Red-H
Comp-R780-H :: APC-Cy7-H
항-CD34(PE Texas)
L/D (APC Cy7)

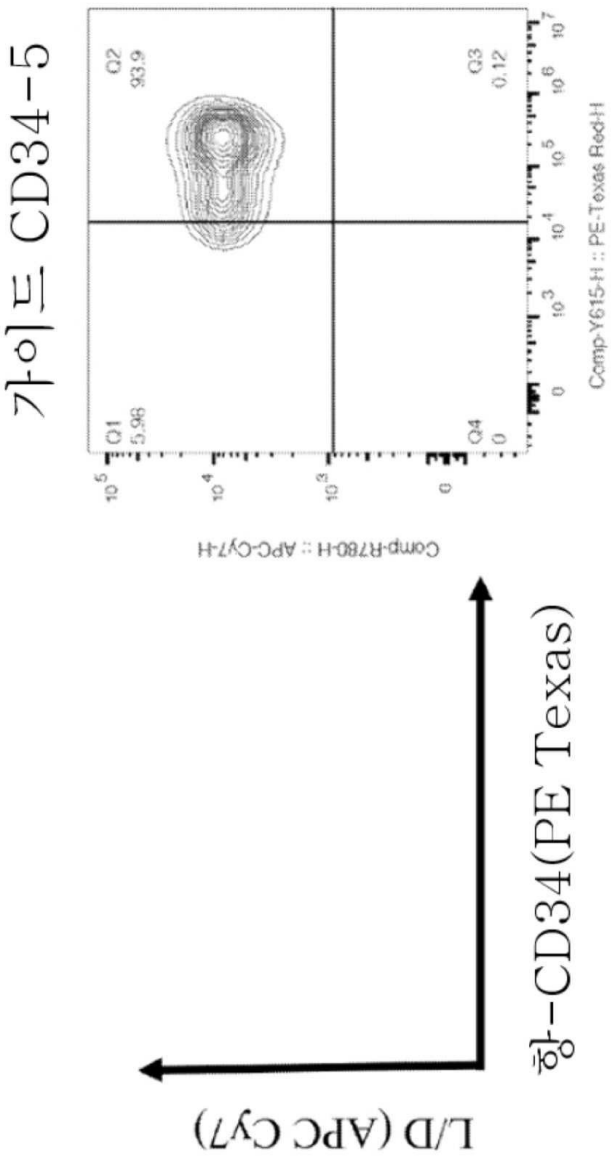
도면7b


가이드 CD34-2
Q2
77.3
Q3
0.014
Q1
22.7
Q4
0
Comp-Y615-H :: PE-Texas Red-H
Comp-R780-H :: APC-Cy7-H
항-CD34(PE Texas)
L/D (APC Cy7)

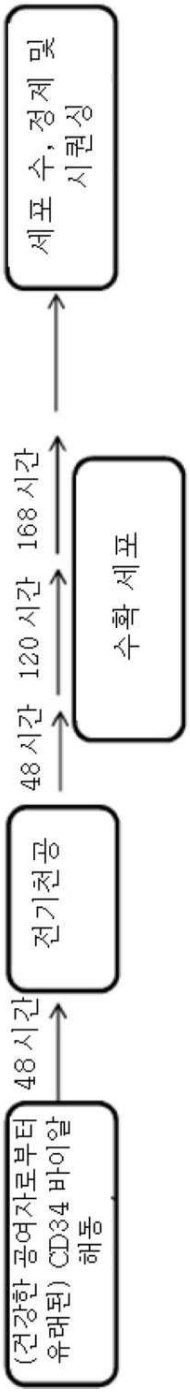
도면7c


가이드 CD34-3
Q2
91.4
Q3
0.070
Q1
8.54
Q4
0
Comp-Y615-H :: PE-Texas Red-H
Comp-R780-H :: APC-Cy7-H
항-CD34(PE Texas)
L/D (APC Cy7)

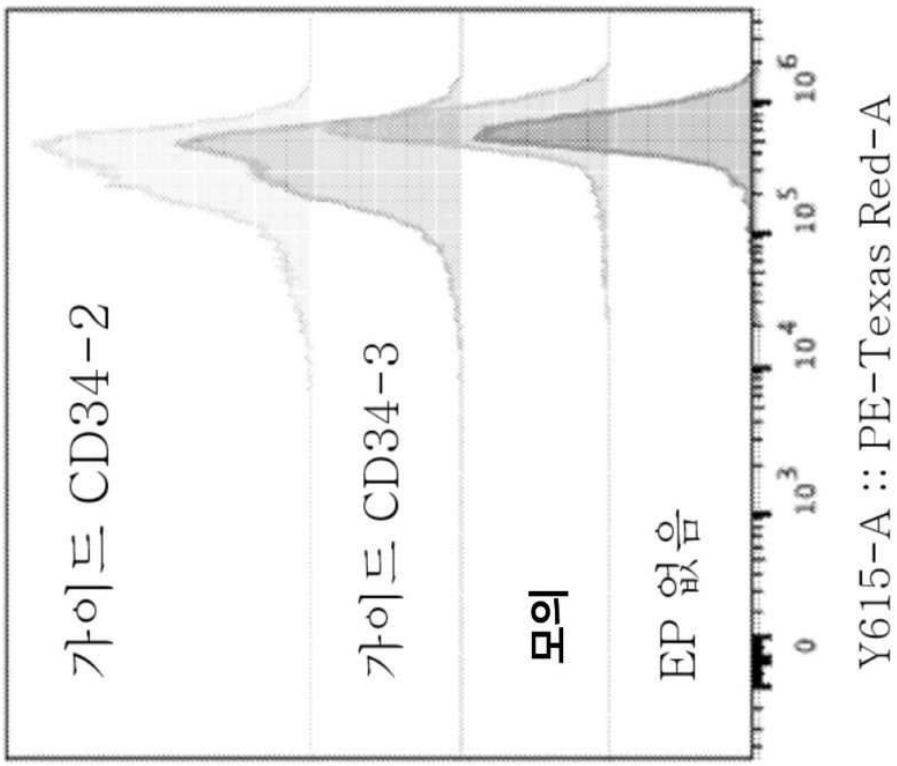
도면7d


가이드 CD34-5
Q1
5.96
Q2
93.9
Q3
0.12
Q4
0
Comp-R780-H :: APC-Cy7-H
Comp-Y615-H :: PE-Texas Red-H
L/D (APC Cy7)
항-CD34(PE Texas)

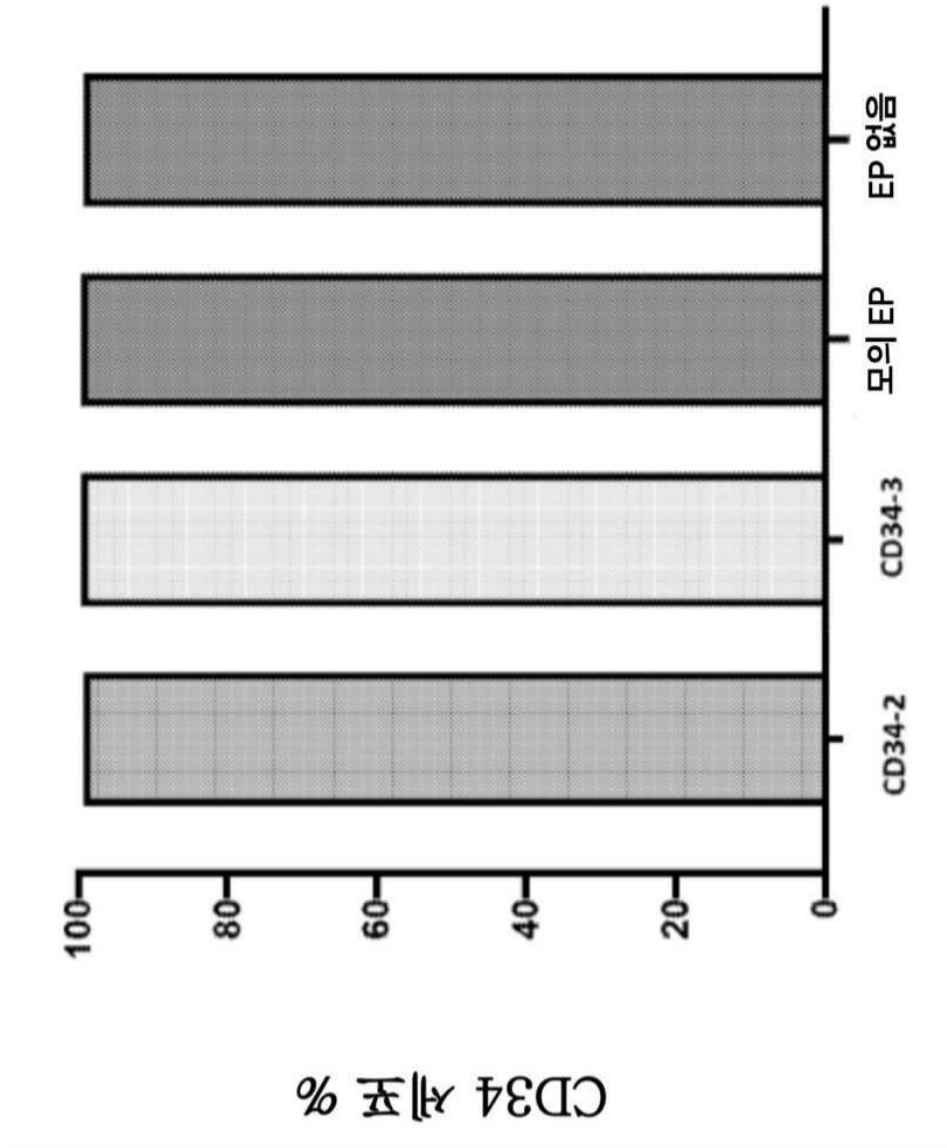
도면8


(건강한 공여자로부터 유래된) CD34 바이알 해동
48 시간
전기천공
48 시간
120 시간
168 시간
수확 세포
세포 수, 정제 및 시퀀싱

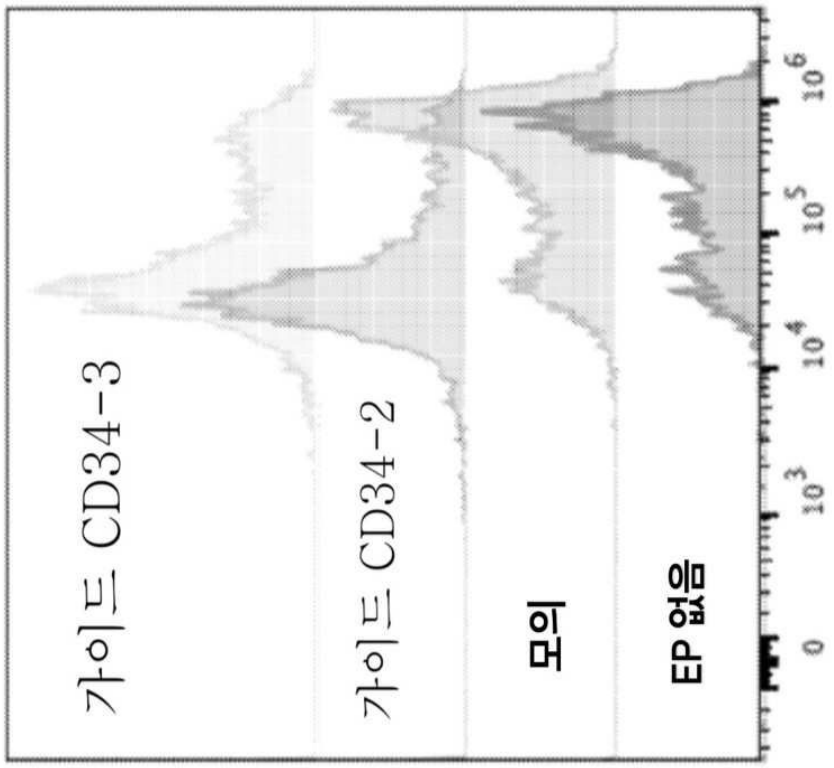
도면9a


가이드 CD34-2
가이드 CD34-3
모의
EP 없음
0
10^3
10^4
10^5
10^6
Y615-A :: PE-Texas Red-A

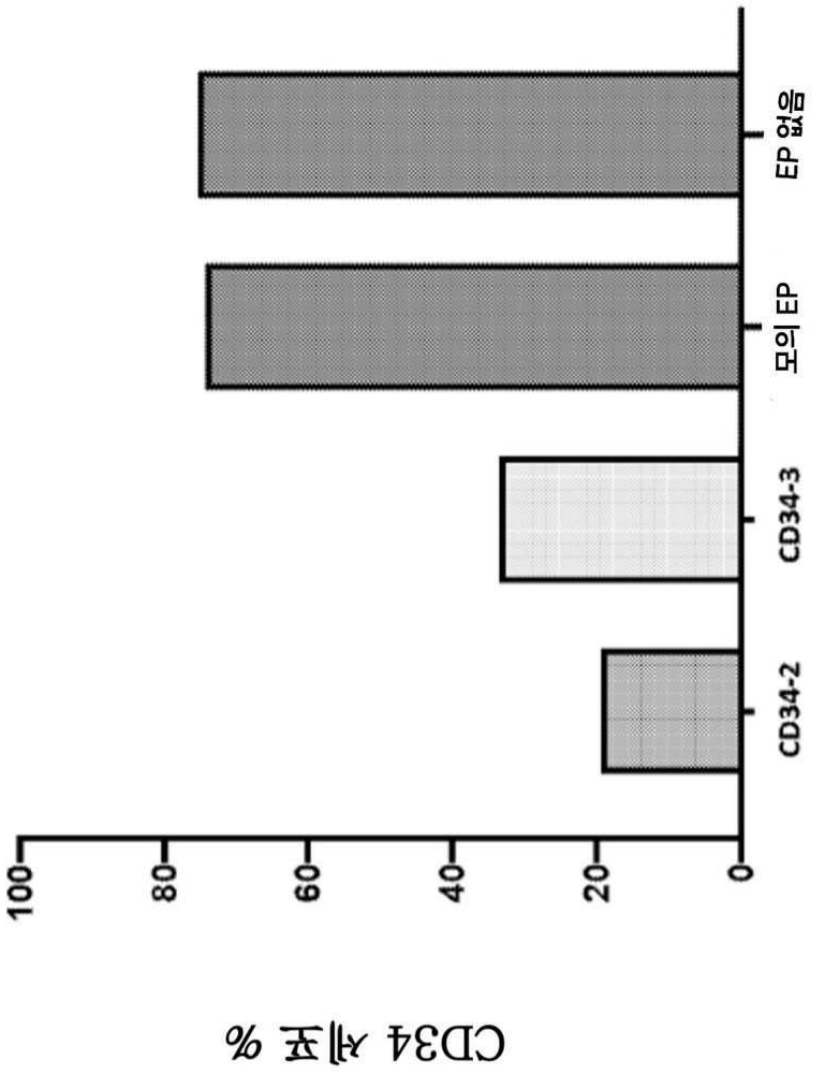
도면9b



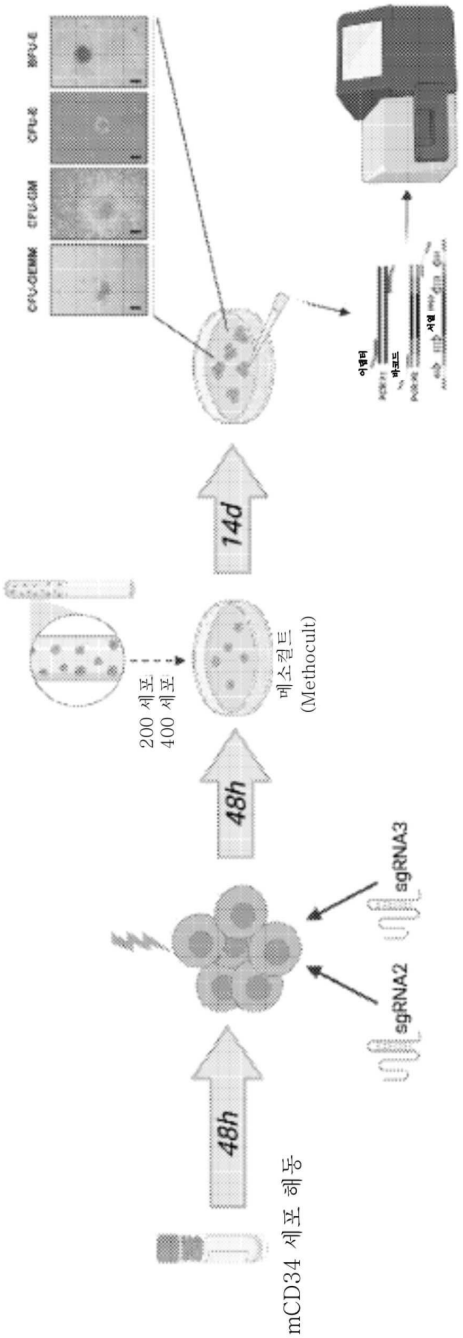
도면10a



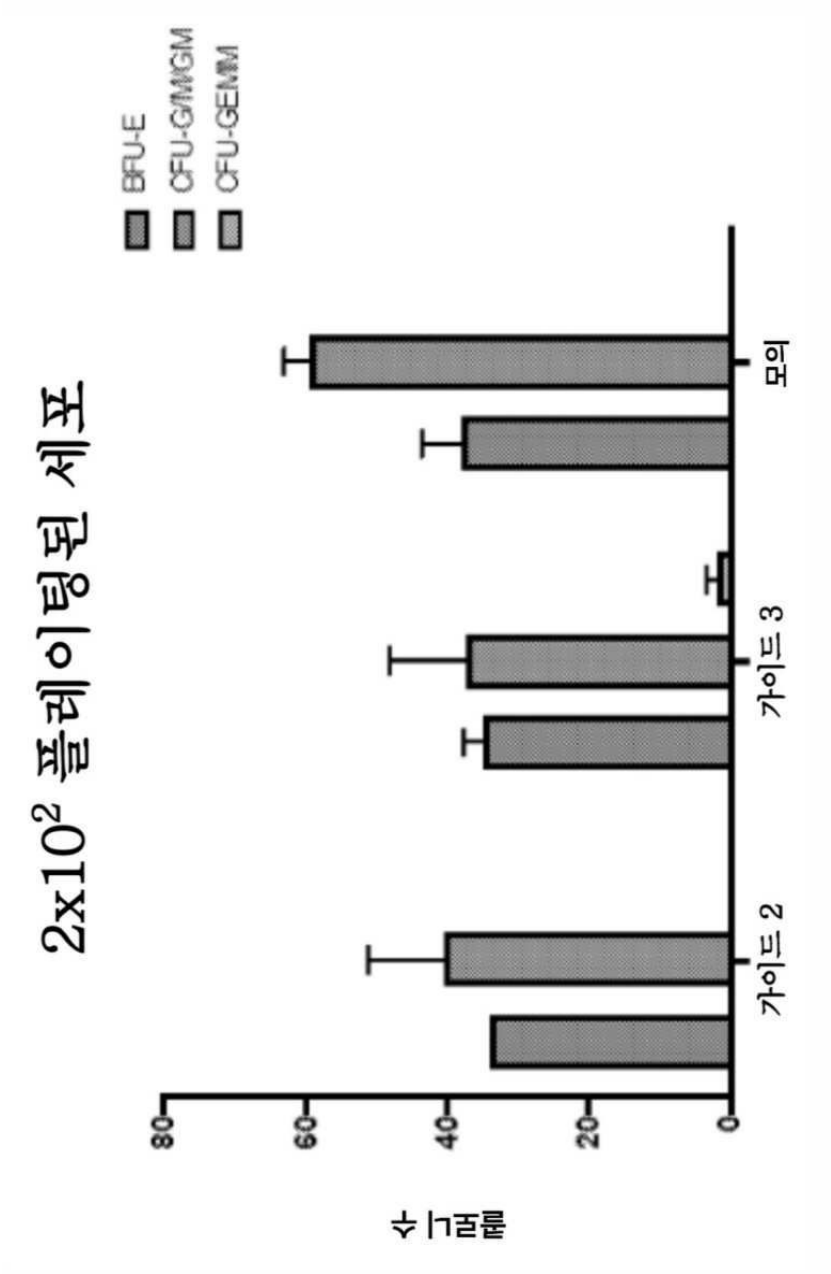
도면10b



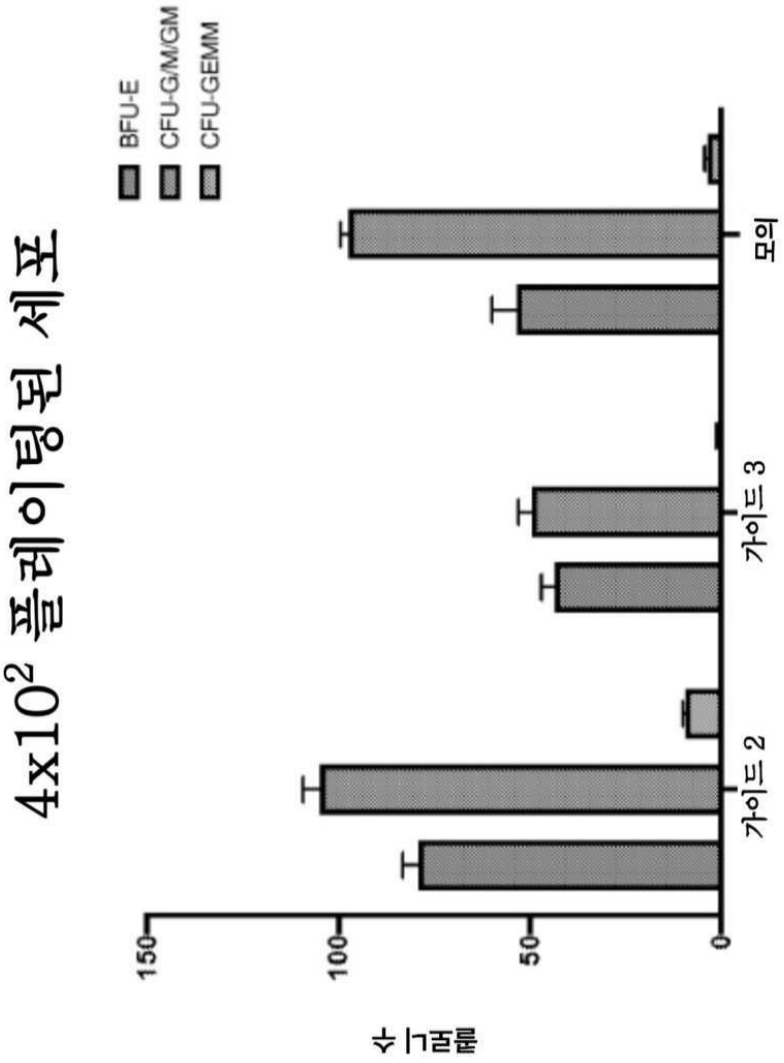
도면11a


mCD34 세포 해동
48h
sgRNA2
sgRNA3
48h
200 세포
400 세포
메소컬트
(Methocult)
14d
CFU-GEMM
CFU-GM
CFU-E
BFU-E

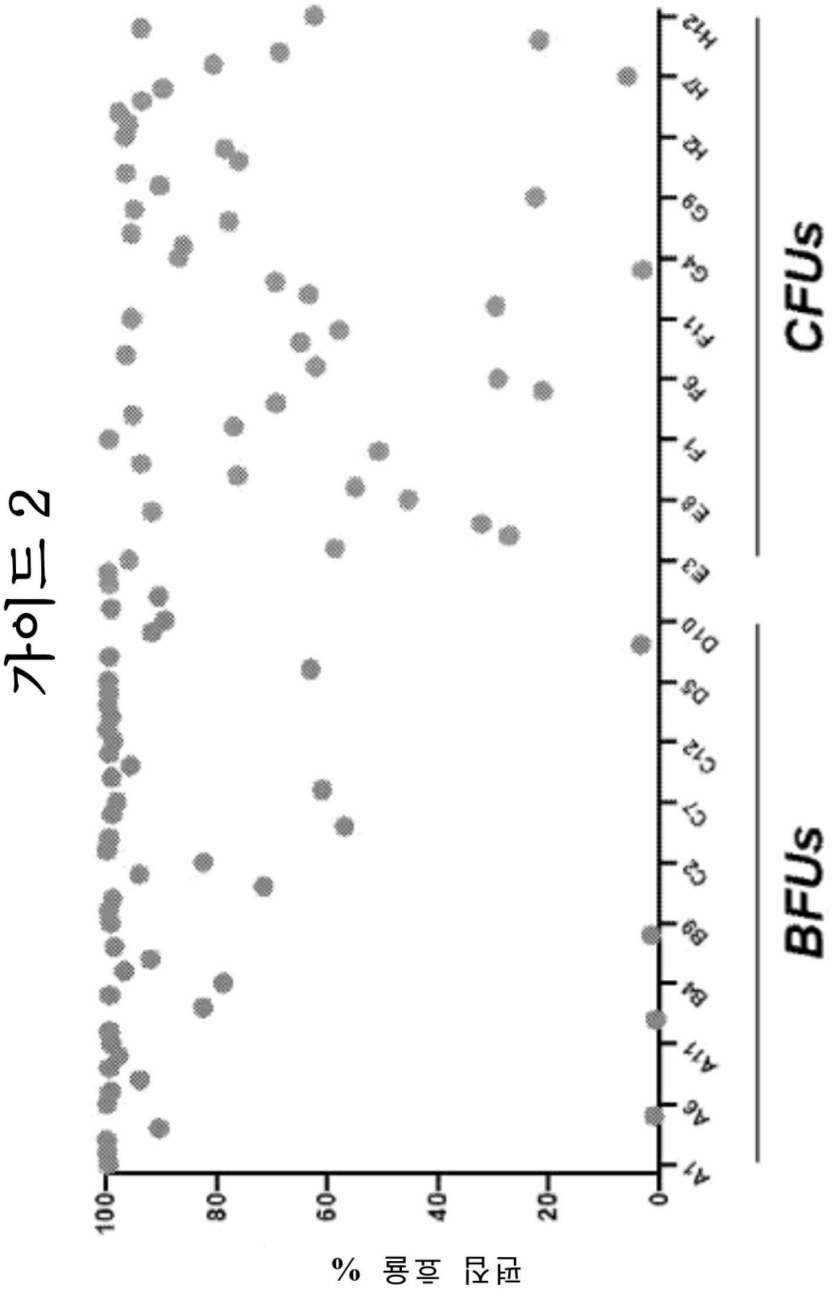
도면11b


2x10² 플레이팅된 세포
BFU-E
CFU-G/M/GM
CFU-GEMM
콜로니 수
0
20
40
60
80
가이드 2
가이드 3
모의

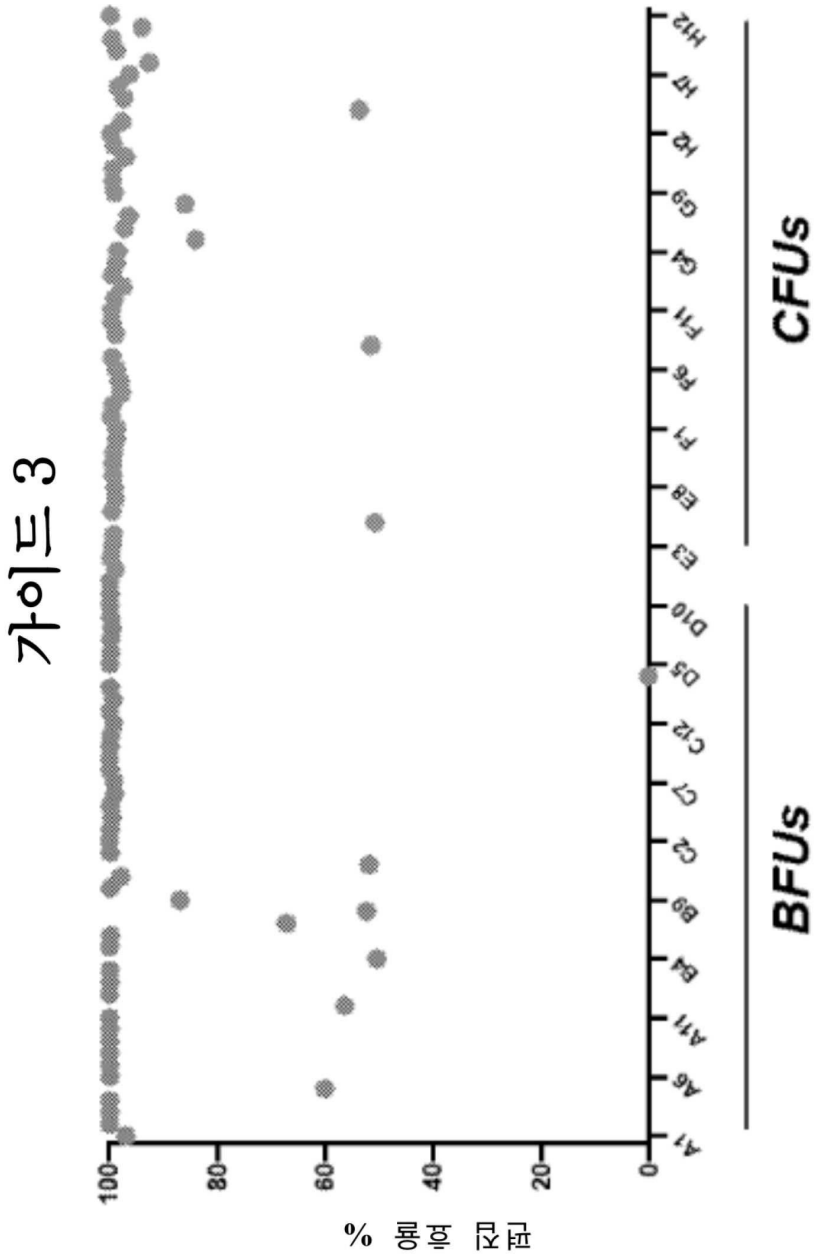
도면11c


4x10² 플레이팅된 세포
BFU-E
CFU-G/M/GM
CFU-GEMM
콜로니 수
150
100
50
0
가이드 2
가이드 3
모의

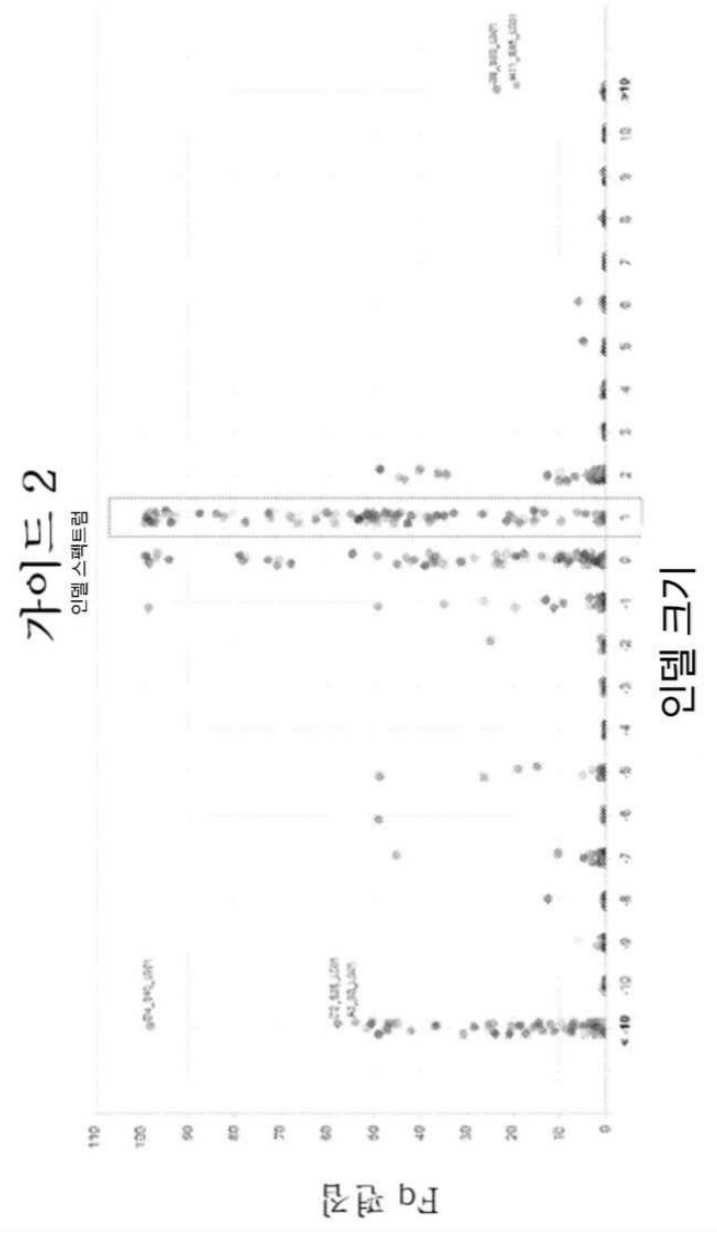
도면11d


가이드 2
편집 효율 %
100
80
60
40
20
0
A1
A6
A11
B4
B9
C2
C7
C12
D5
D10
E3
E8
F1
F6
F11
G4
G9
H2
H7
H12
BFUs
CFUs

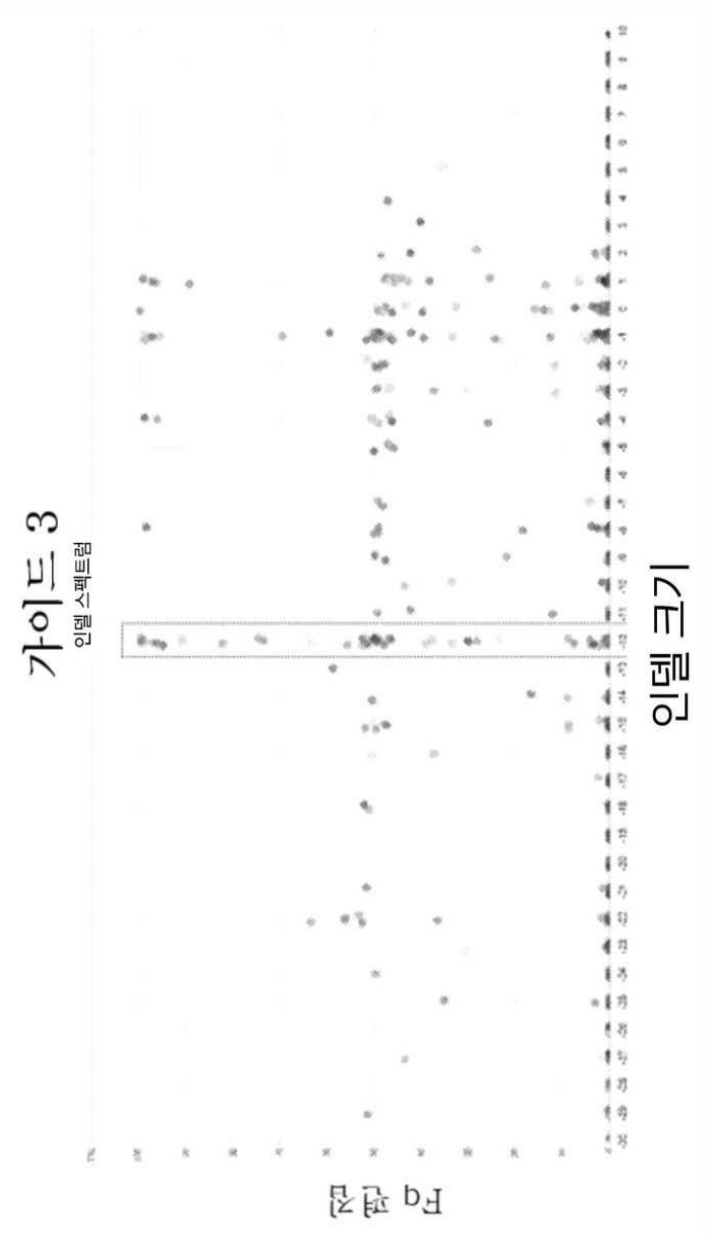
도면11e


가이드 3
편집 효율 %
100
80
60
40
20
0
A1
A6
A11
B4
B9
C2
C7
C12
D5
D10
E3
E8
F1
F6
F11
G4
G9
H2
H7
H12
BFUs
CFUs

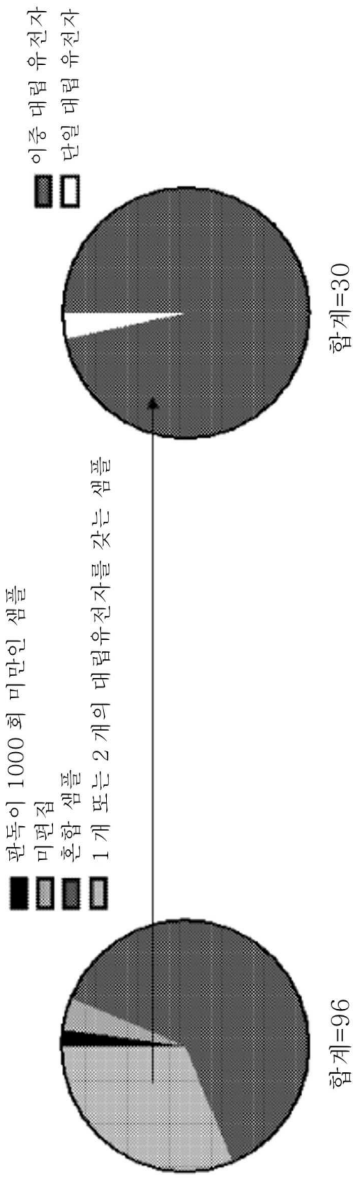
도면11f



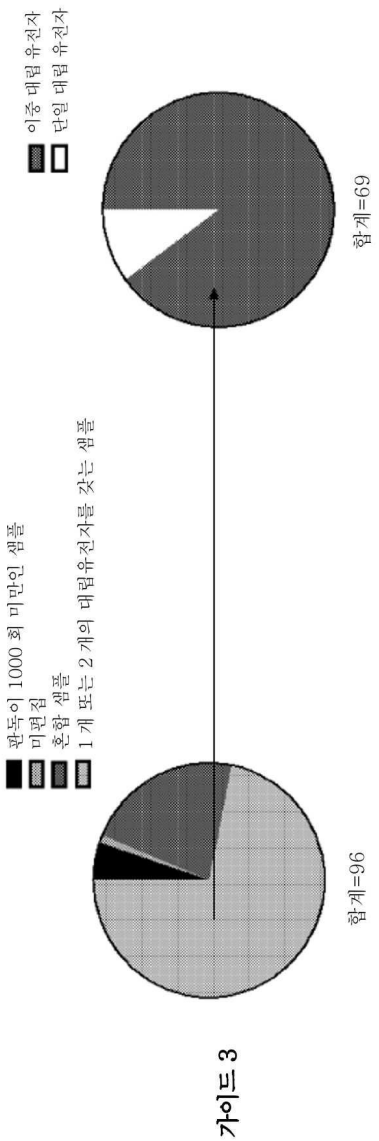
도면11g



도면11h

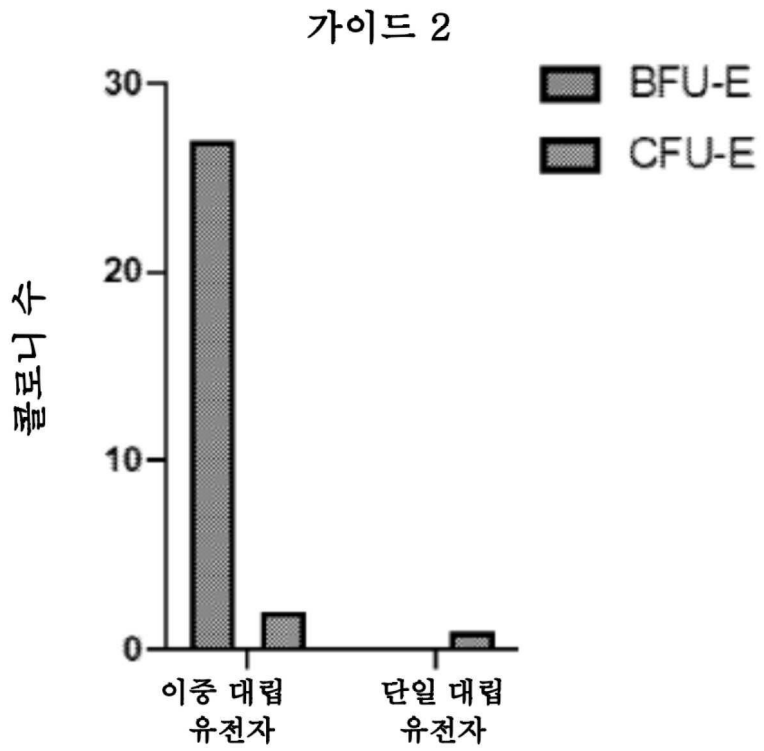

이중 대립 유전자
단일 대립 유전자
합계=30
관독이 1000 회 미만인 샘플
미편집
혼합 샘플
1 개 또는 2 개의 대립유전자를 갖는 샘플
합계=96
가이드 2

도면11i

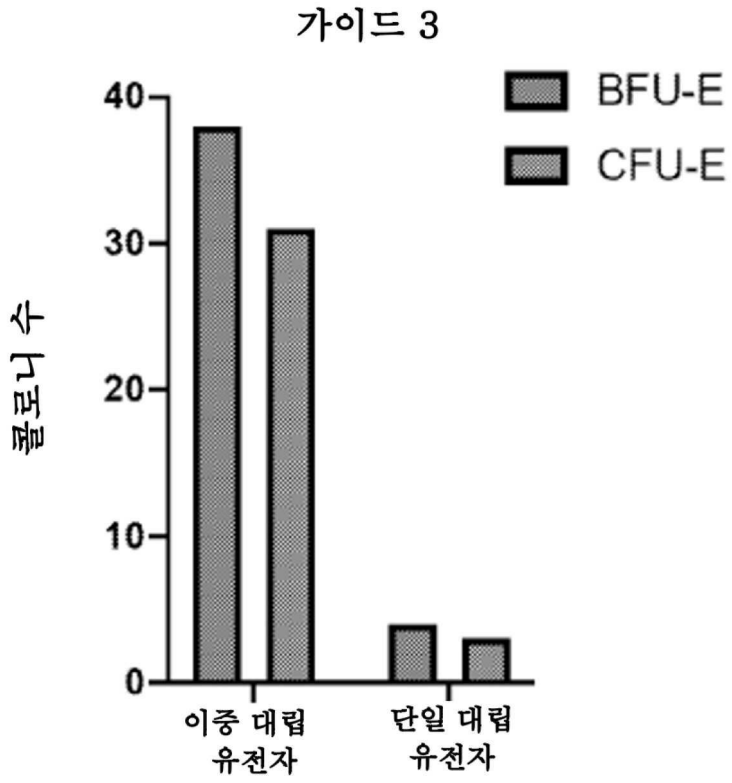

이중 대립 유전자
단일 대립 유전자
합계=69
합계=96
판독이 1000 회 미만인 샘플
미편집
혼합 샘플
1 개 또는 2 개의 대립유전자를 갖는 샘플

가이드 3

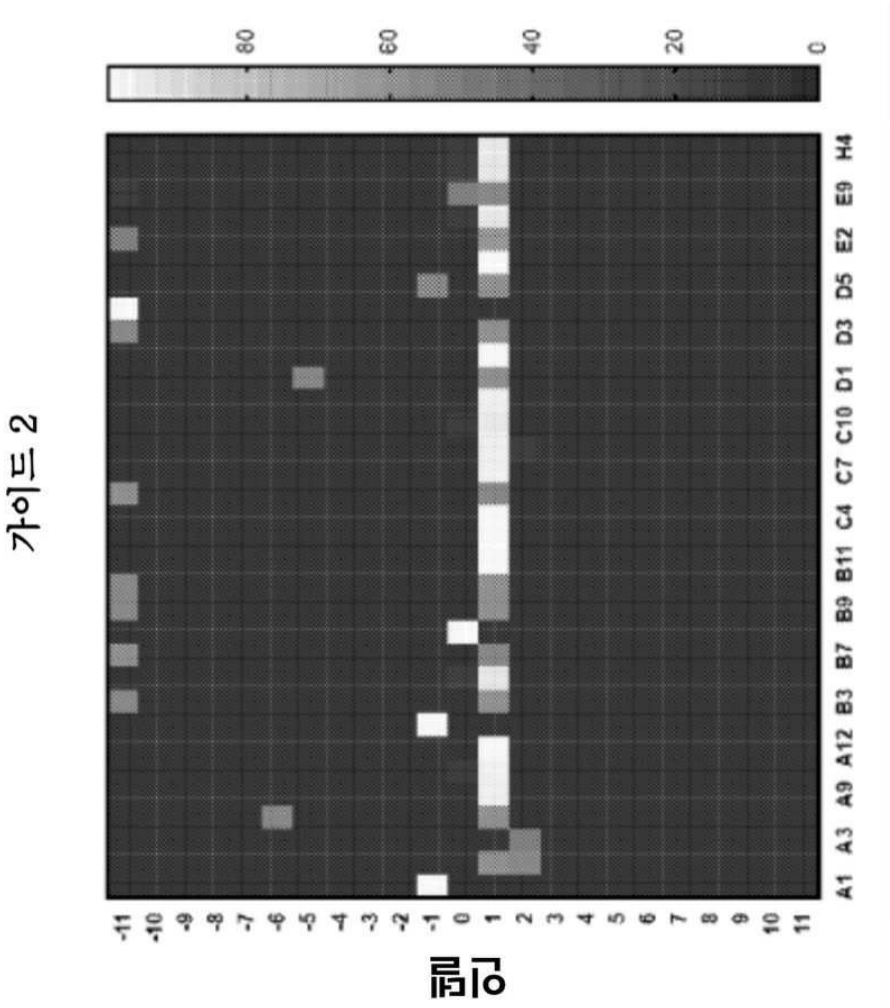
도면11j



도면11k

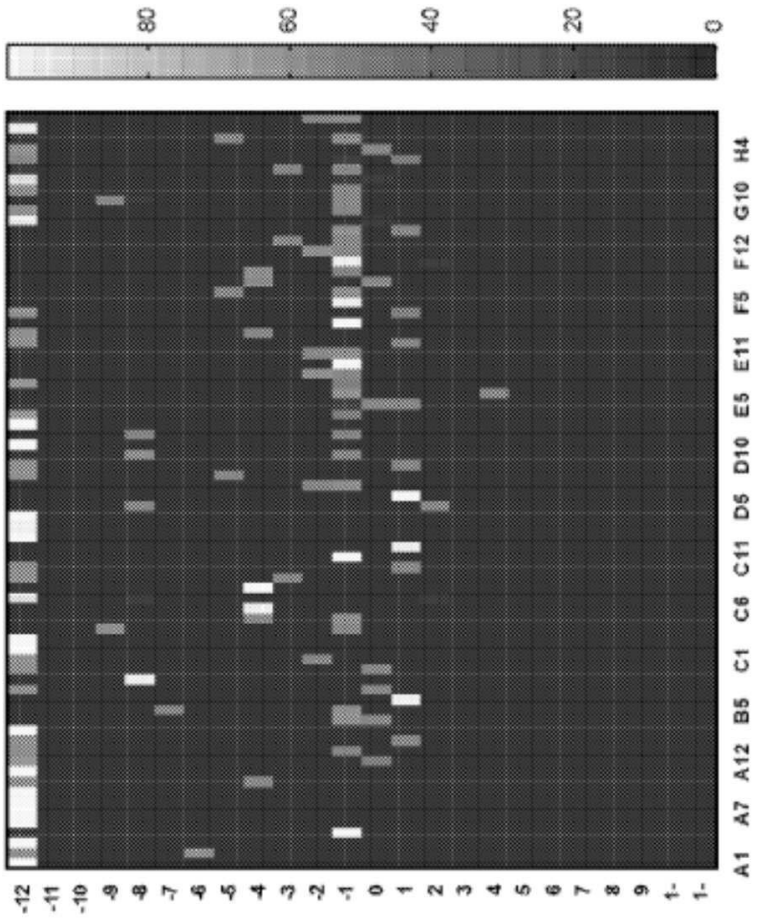


도면111

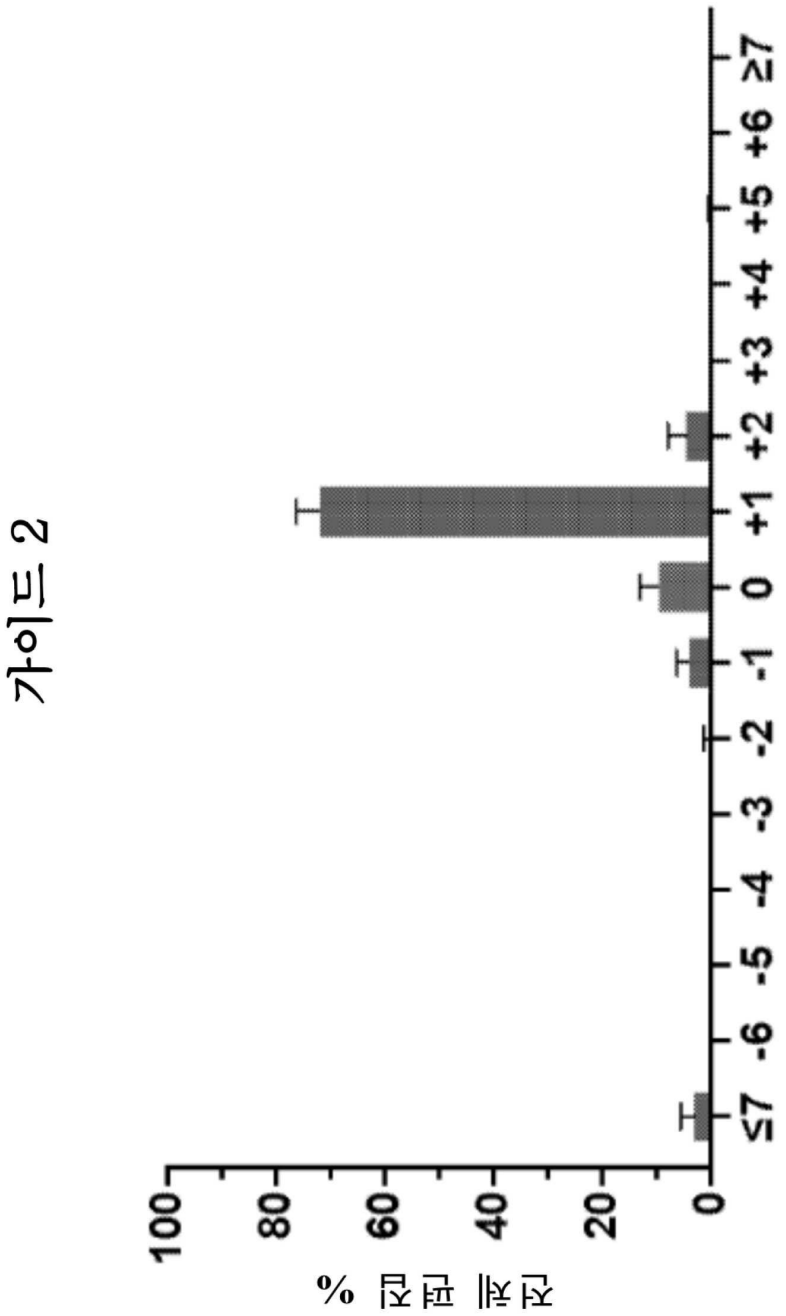

가이드 2
80
60
40
20
0
A1 A3 A9 A12 B3 B7 B9 B11 C4 C7 C10 D1 D3 D5 E2 E9 H4
-11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
위치

도면11m

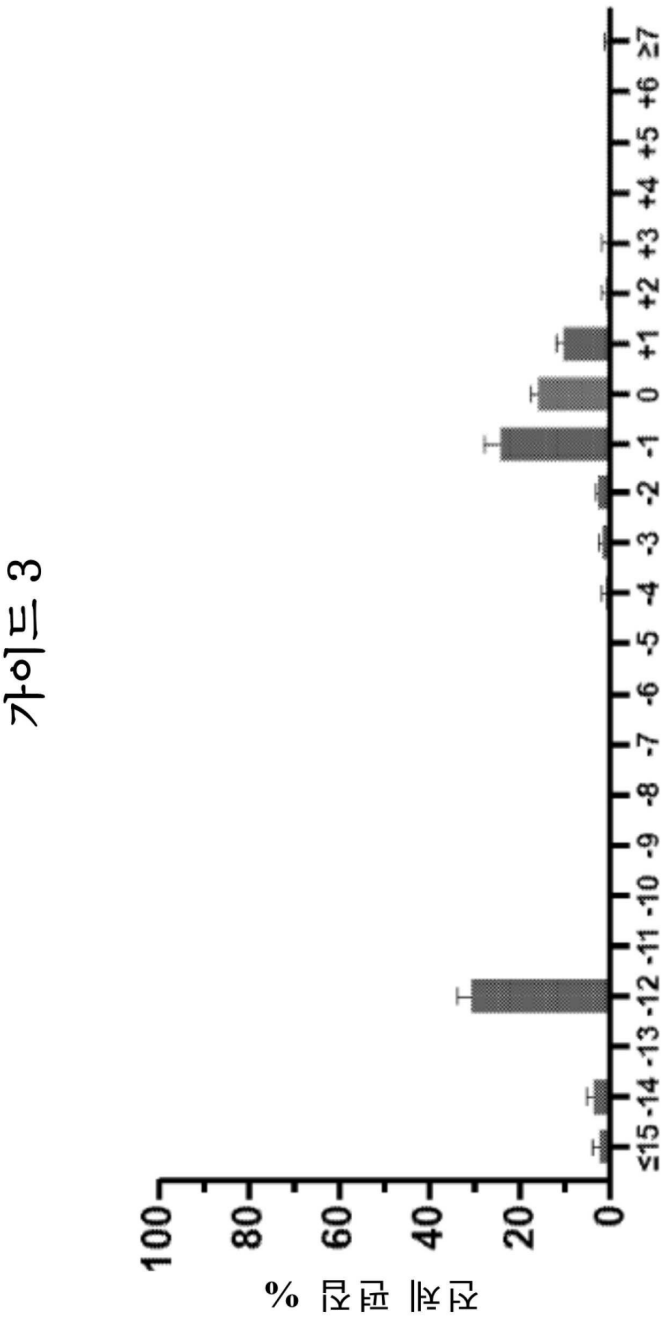
가이드 3


80
60
40
20
0
A1
A7
A12
B5
C1
C6
C11
D5
D10
E5
E11
F5
F12
G10
H4
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
1-
1-

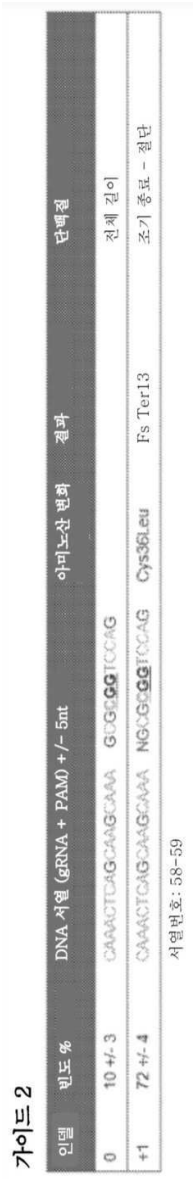
도면11n



도면11o



도면11p



가이드 2

인델	빈도 %	DNA 서열 (gRNA + PAM) +/- 5nt	아미노산 변화	결과	판별줄
0	10 +/- 3	CAAACTCAGCAAGCAAA GGGGGTCCAG			전체 길이
+1	72 +/- 4	CAAACTCAGCAAGCAAA NGGGGGTCCAG	Cys36Leu	Fs Ter13	조기 종료 - 절단

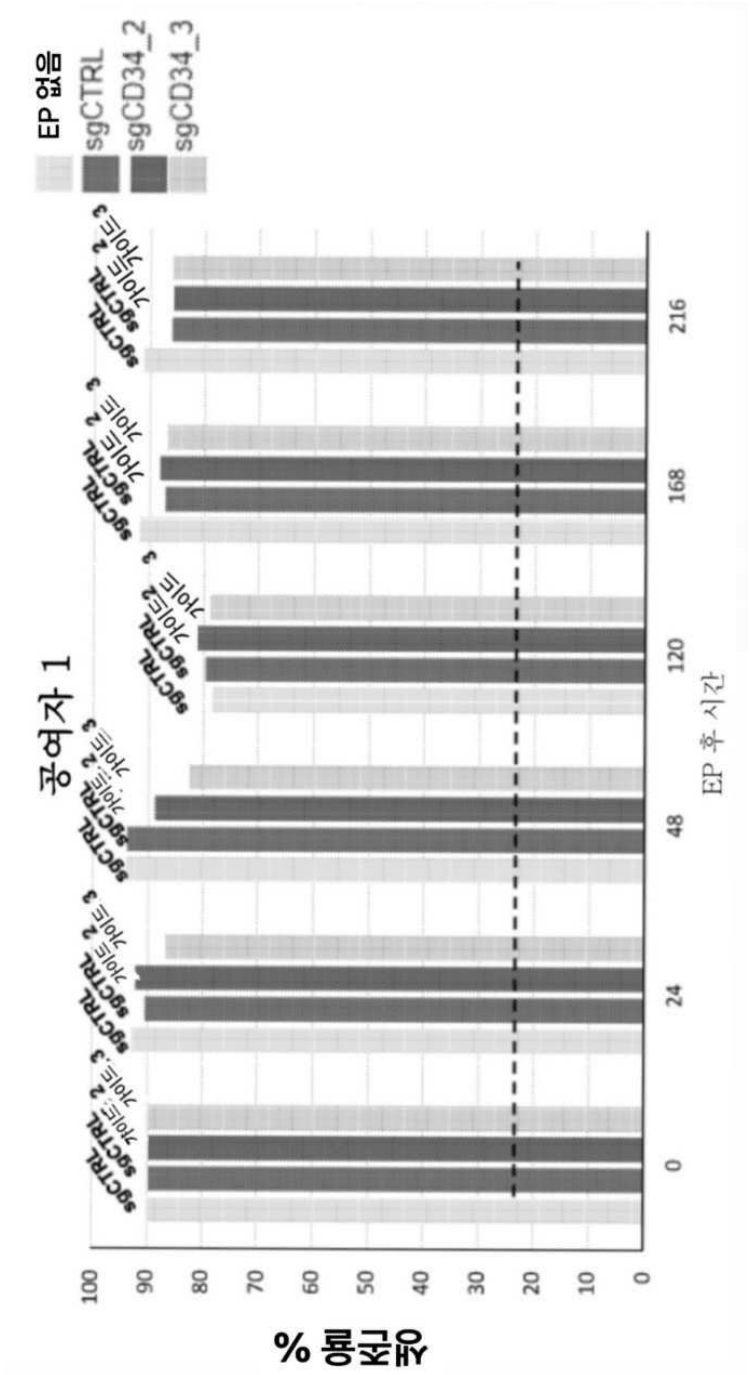
서열번호: 58-59

도면11q

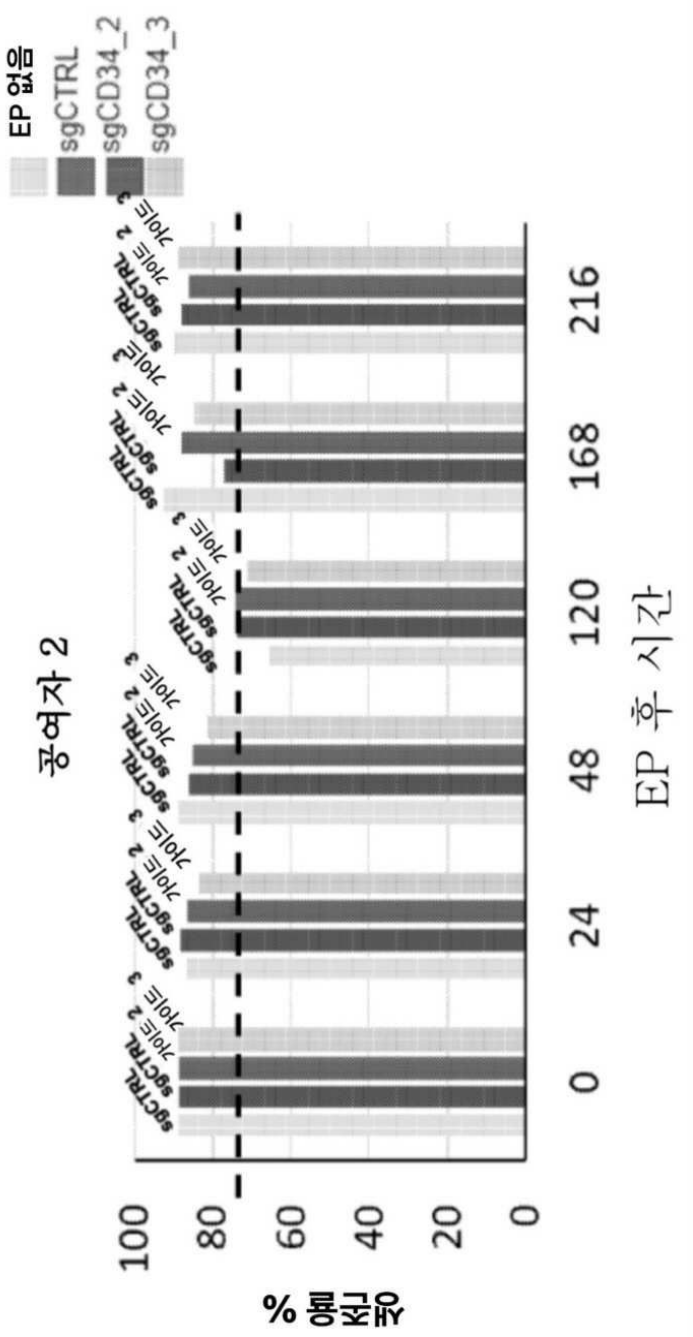
가이드 3

인델	빈도 %	DNA 서열 (gRNA + PAM) +/- 5nt	아미노산 변화	결과	단백질
0	16 +/- 1	GTGCAGGCTGGTACTTC CAAGGGTACTA			전체 길이
-1	24 +/- 3	GTGCAGG-CTGGTACTT- CAAGGGTACTA	Gly83Glu	Fs Ter30	조기 종료 - 절단
-12	31 +/- 3	GTGCA---------- CAAGGGTACTA 서열번호: 60-62	Gly83Arg	결실 Pro79, Ser80, Thr81, Leu82 프레임의 나머지	전체 길이

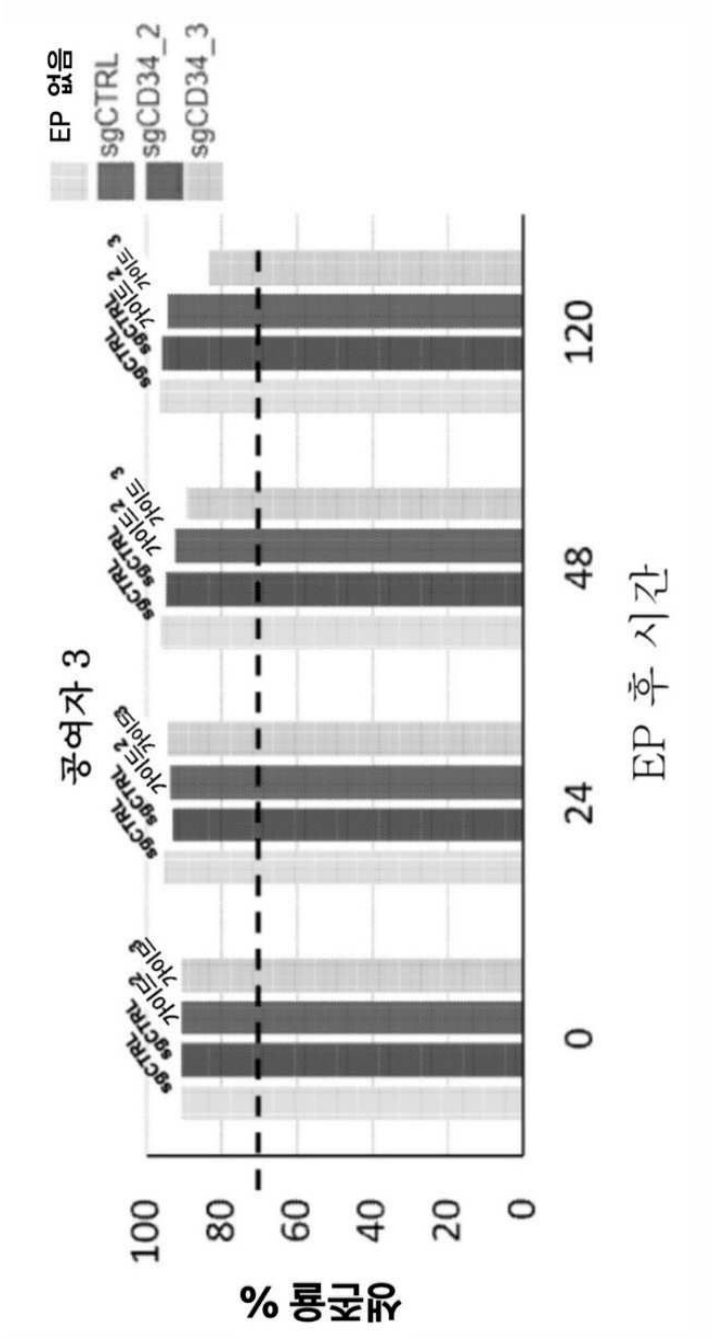
도면12a


EP 없음
sgCTRL
sgCD34_2
sgCD34_3
공여자 1
% 생존율
EP 후 시간
0
24
48
120
168
216
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

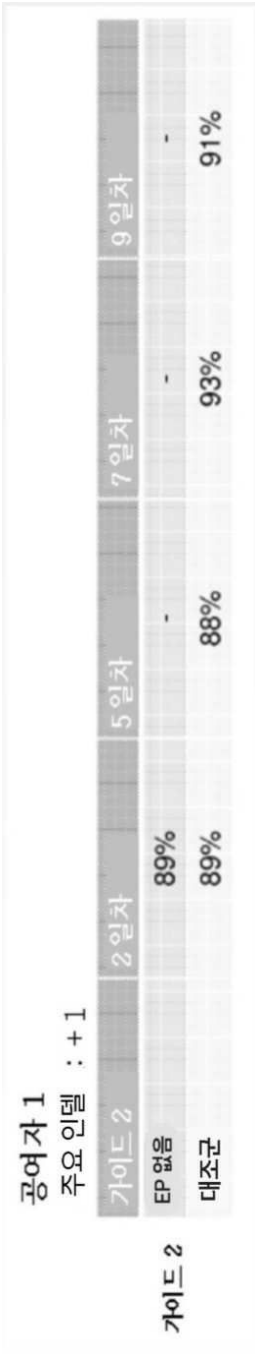
도면12b


EP 없음
sgCTRL
sgCD34_2
sgCD34_3
공여자 2
생존율 %
100
80
60
40
20
0
0
24
48
120
168
216
EP 후 시간

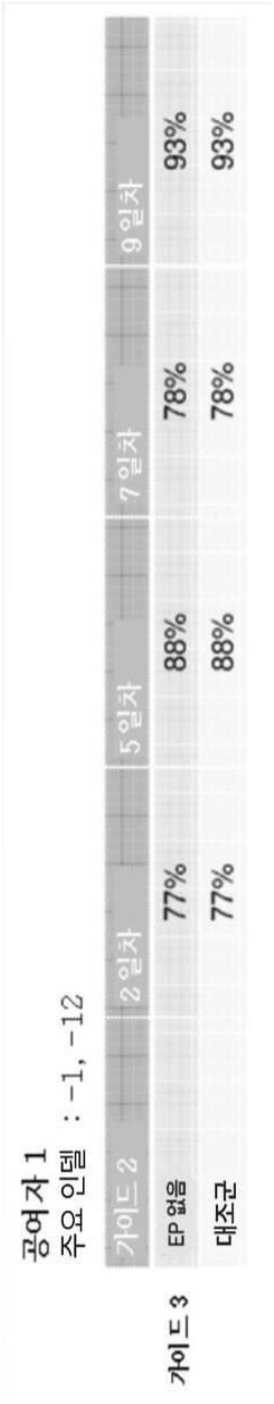
도면12c


EP 없음
sgCTRL
sgCD34_2
sgCD34_3
공여자 3
% 생존율
100
80
60
40
20
0
0
24
48
120
EP 후 시간

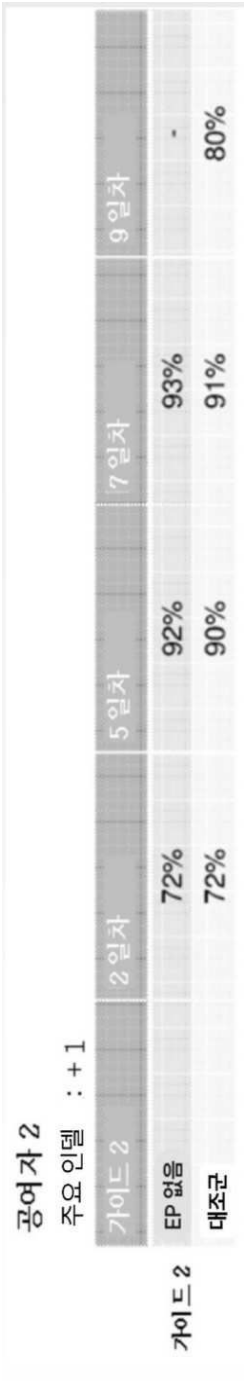
도면12d



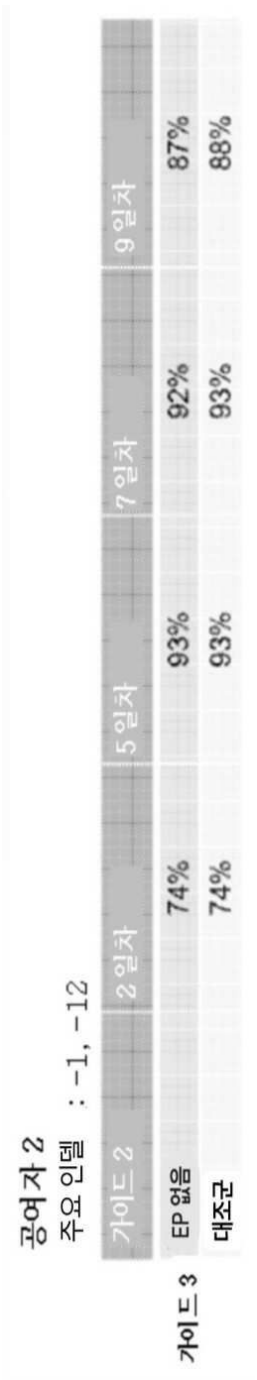
도면12e


공여자 1
주요 인델 : -1, -12
가이드 2
2 일차
5 일차
7 일차
9 일차
EP 없음
77%
88%
78%
93%
대조군
77%
88%
78%
93%
가이드 3

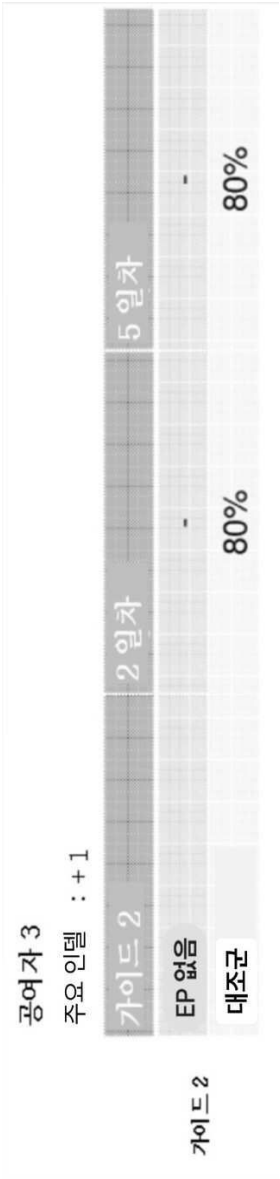
도면12f


공여자 2
주요 인델 : + 1
가이드 2
2 일차
5 일차
7 일차
9 일차
가이드 2
EP 없음
72%
92%
93%
-
대조군
72%
90%
91%
80%

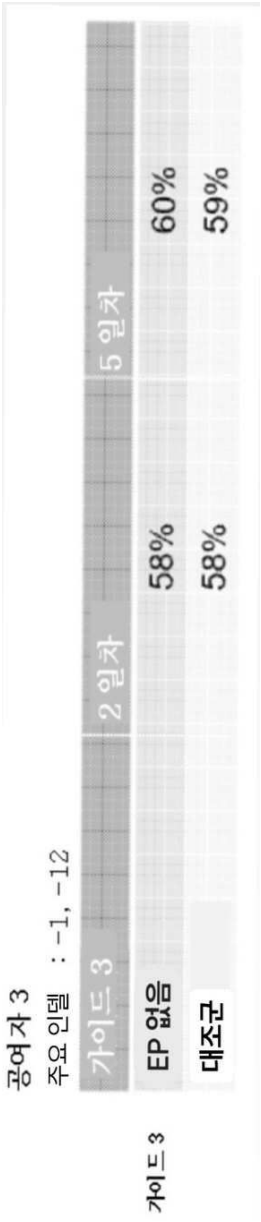
도면12g


공여자 2
주요 인델 : -1, -12
가이드 2
2 일차
5 일차
7 일차
9 일차
가이드 3
EP 없음
74%
93%
92%
87%
대조군
74%
93%
93%
88%

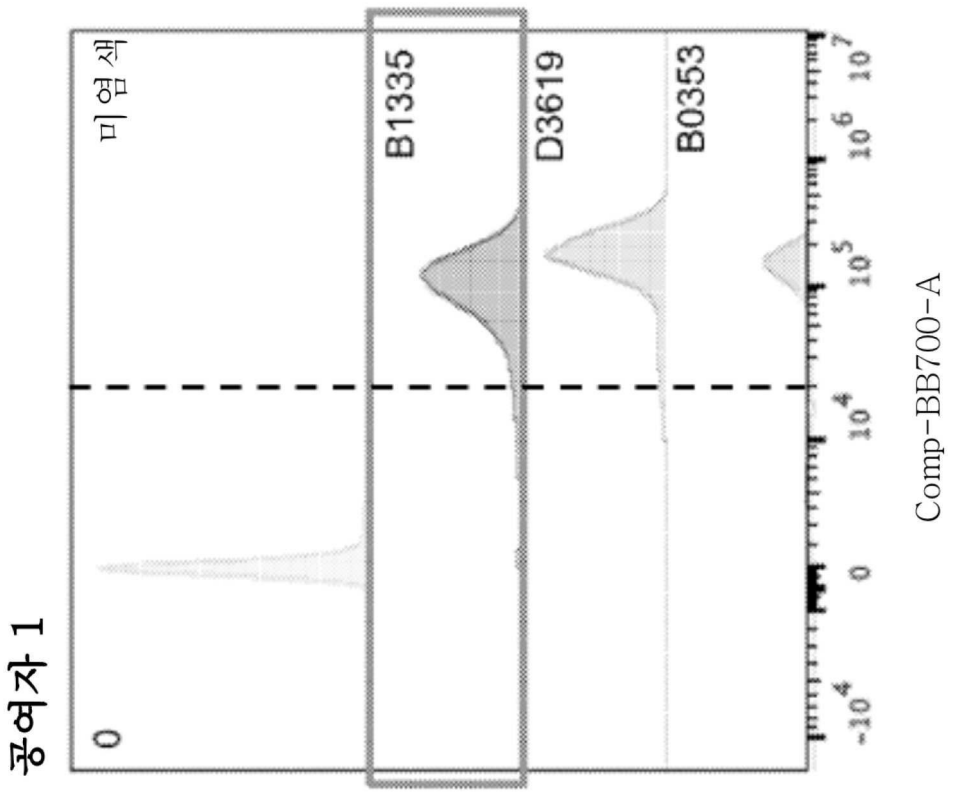
도면12h



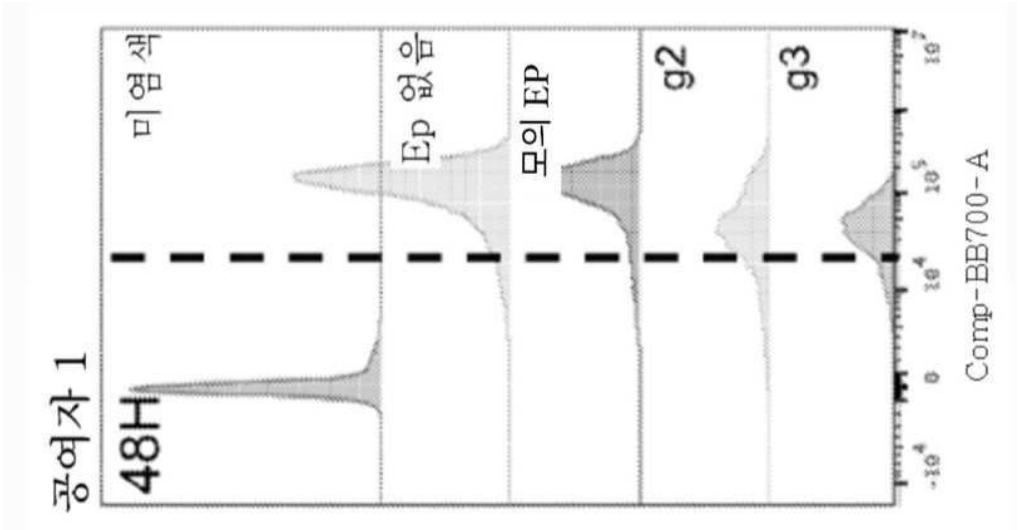
도면12i



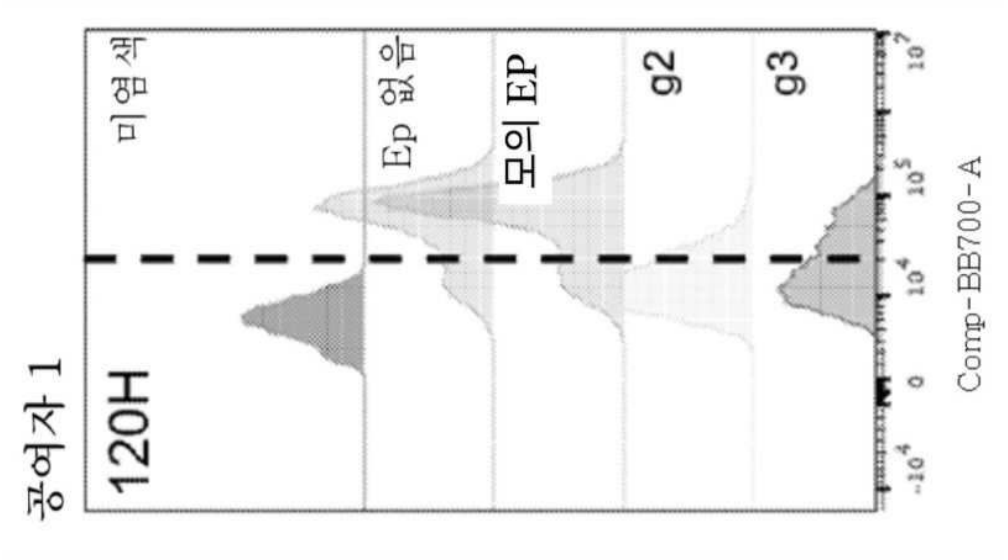
도면12j


공여자 1
0
미염색
B1335
D3619
B0353
Comp-BB700-A

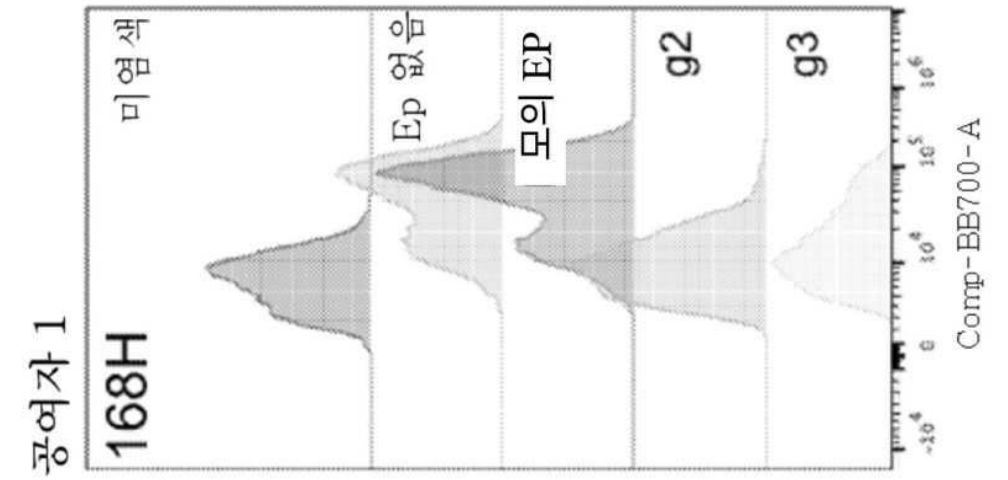
도면12k


공여자 1
48H
미염색
Ep 없음
모의 EP
g2
g3
Comp-BB700-A

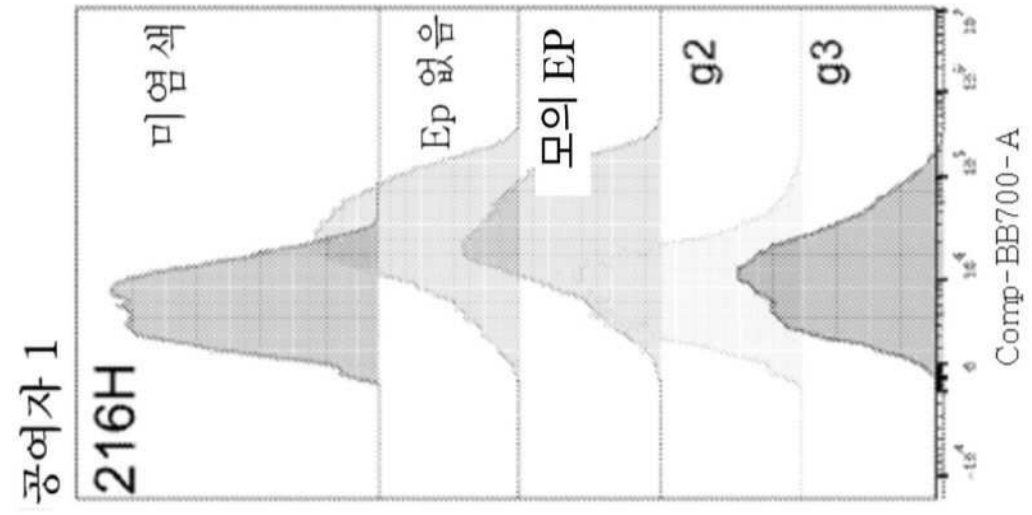
도면121



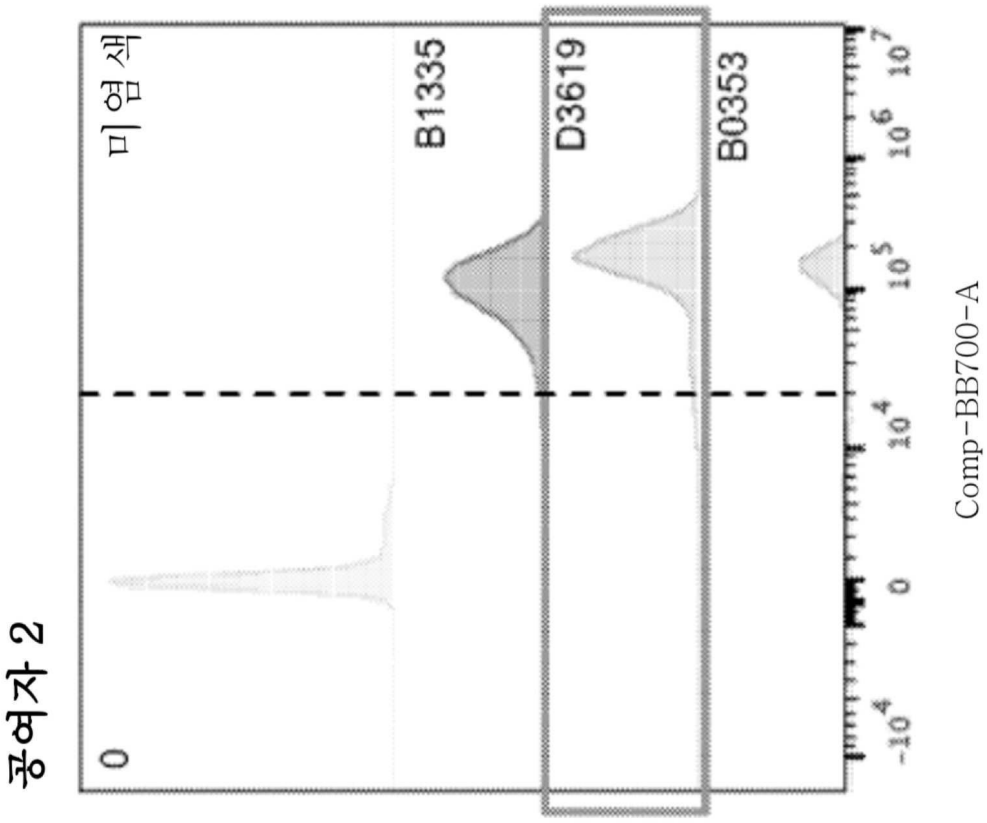
도면12m



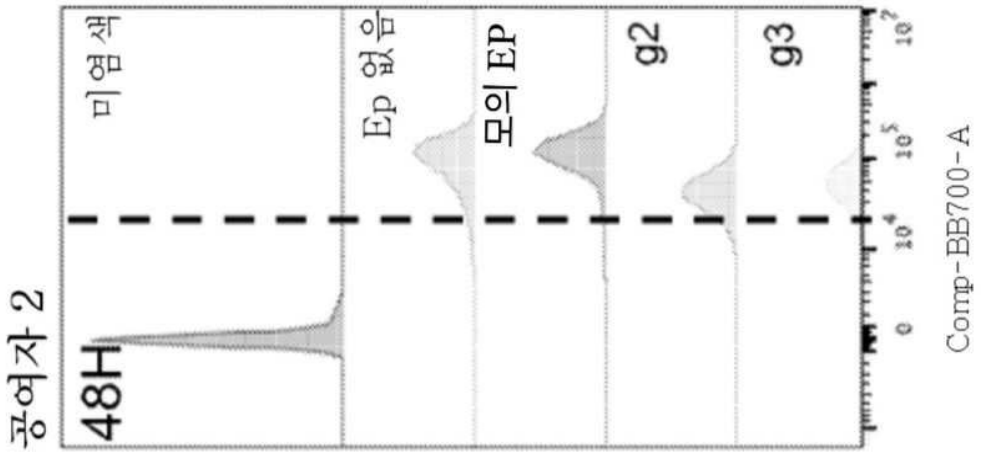
도면12n



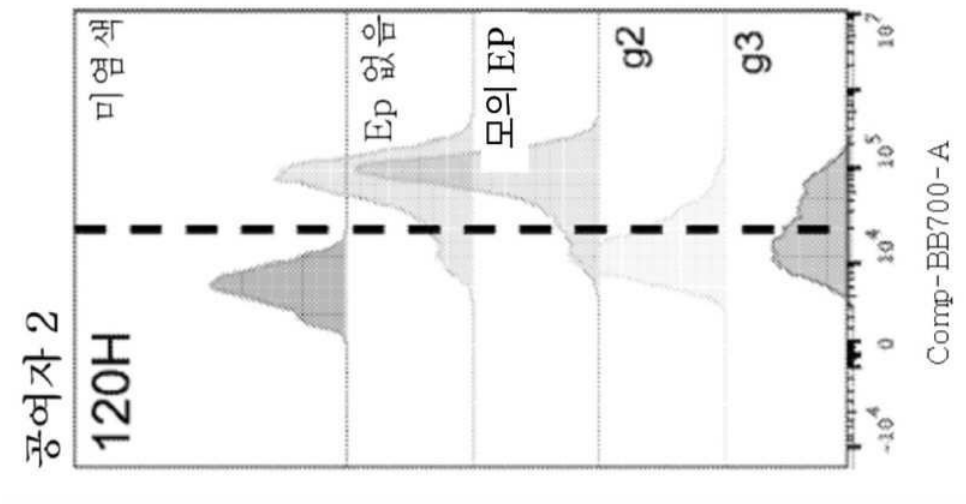
도면12o


공여자 2
0
미염색
B1335
D3619
B0353
Comp-BB700-A

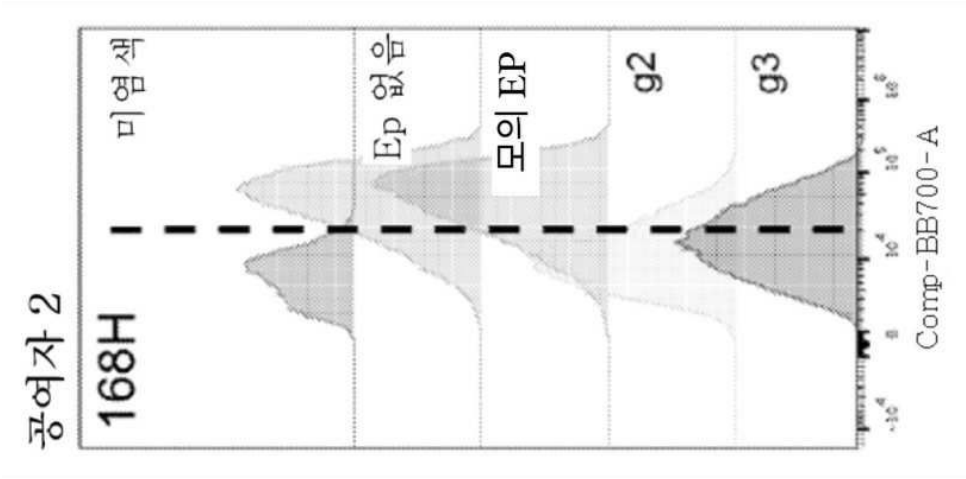
도면12p


공여자 2
48H
미염색
Ep 없음
모의 EP
g2
g3
Comp-BB700-A

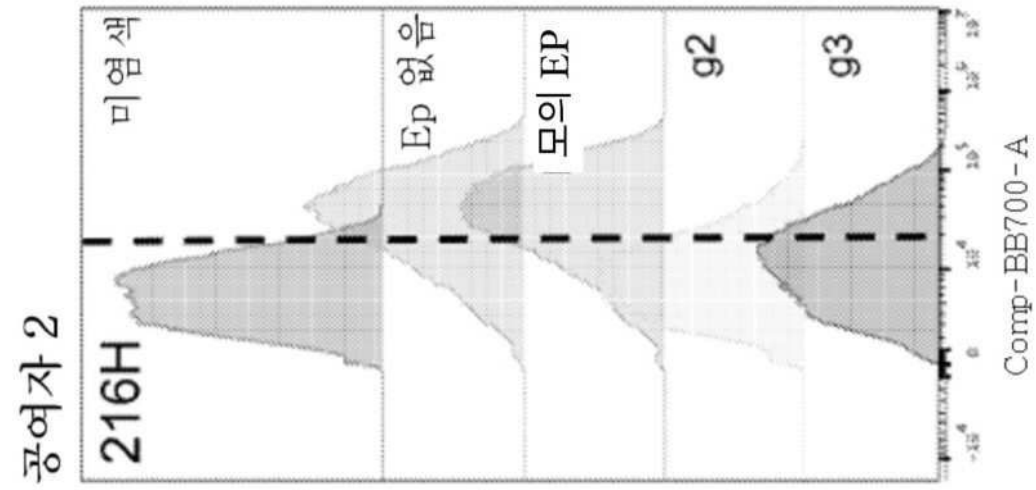
도면12q



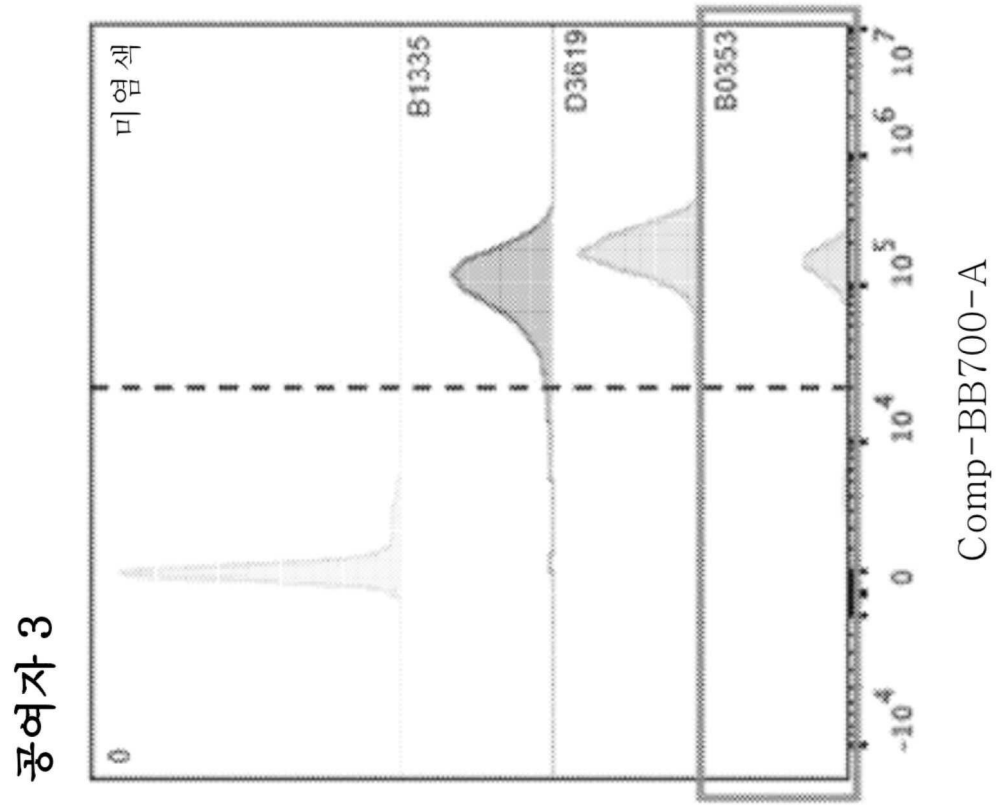
도면12r



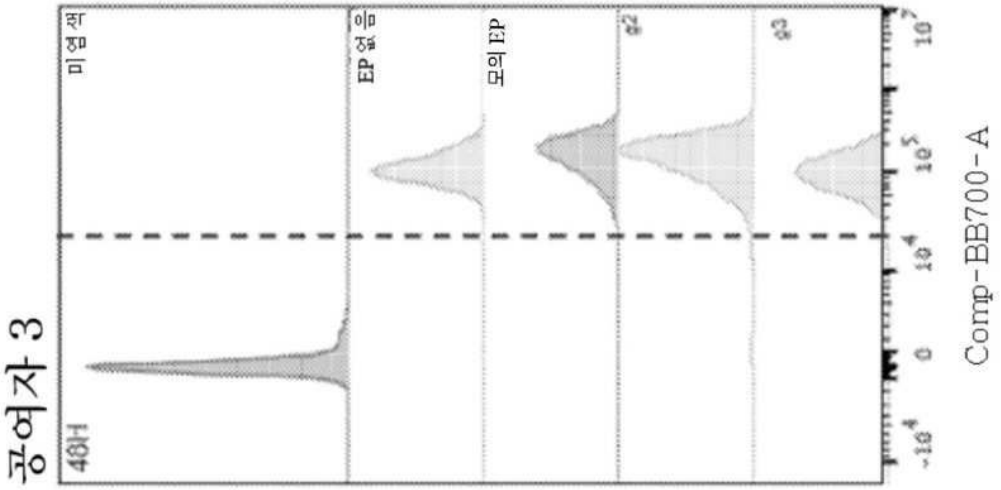
도면12s



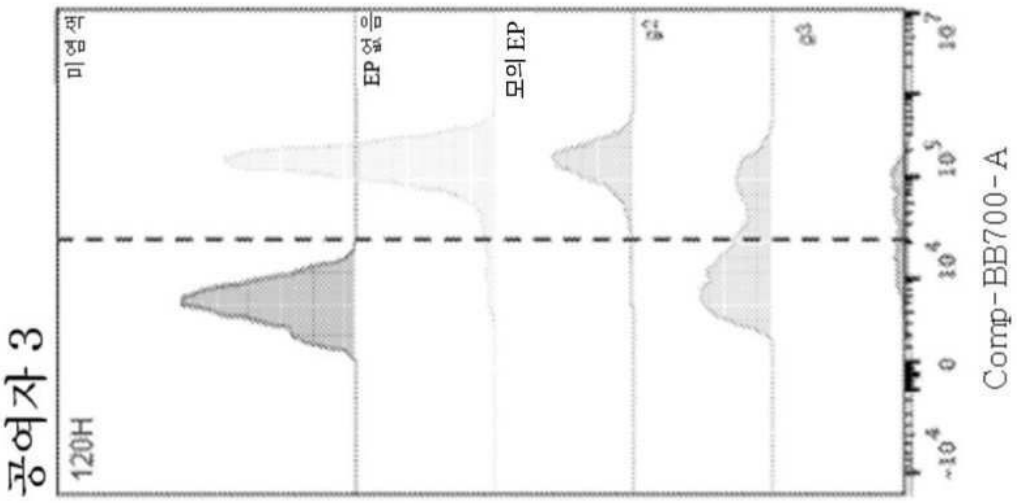
도면12t


공여자 3
미 염색
B1335
D3619
B0353
0
-10^4
0
10^4
10^5
10^6
10^7
Comp-BB700-A

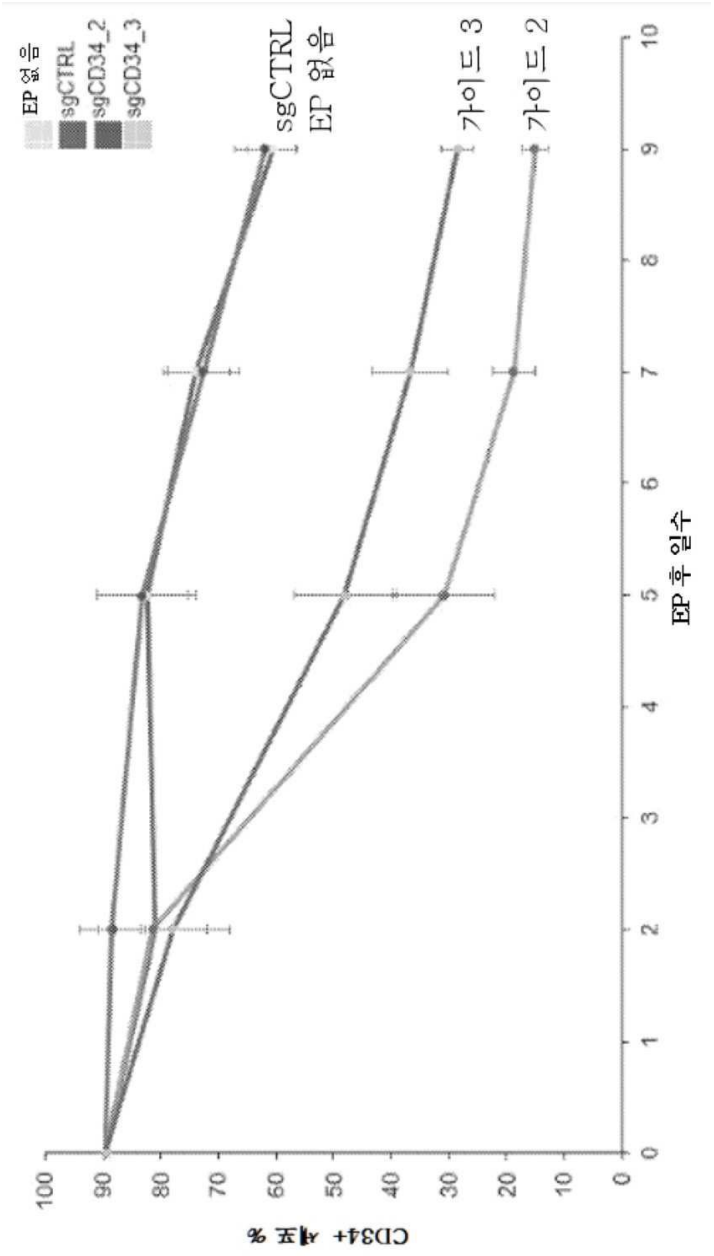
도면12u


공여자 3
48H
미 염색
EP 염색
모의 EP
ϕ2
ϕ3
-10^4
0
10^4
10^5
10^7
Comp-BB700-A

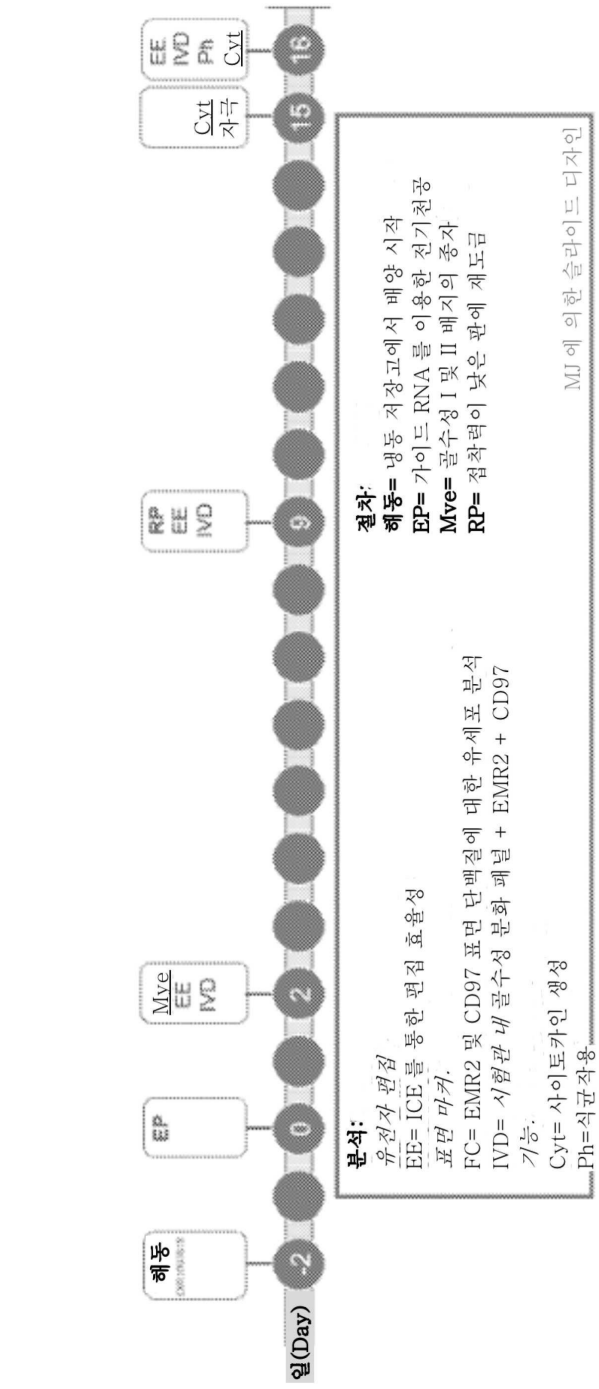
도면12v



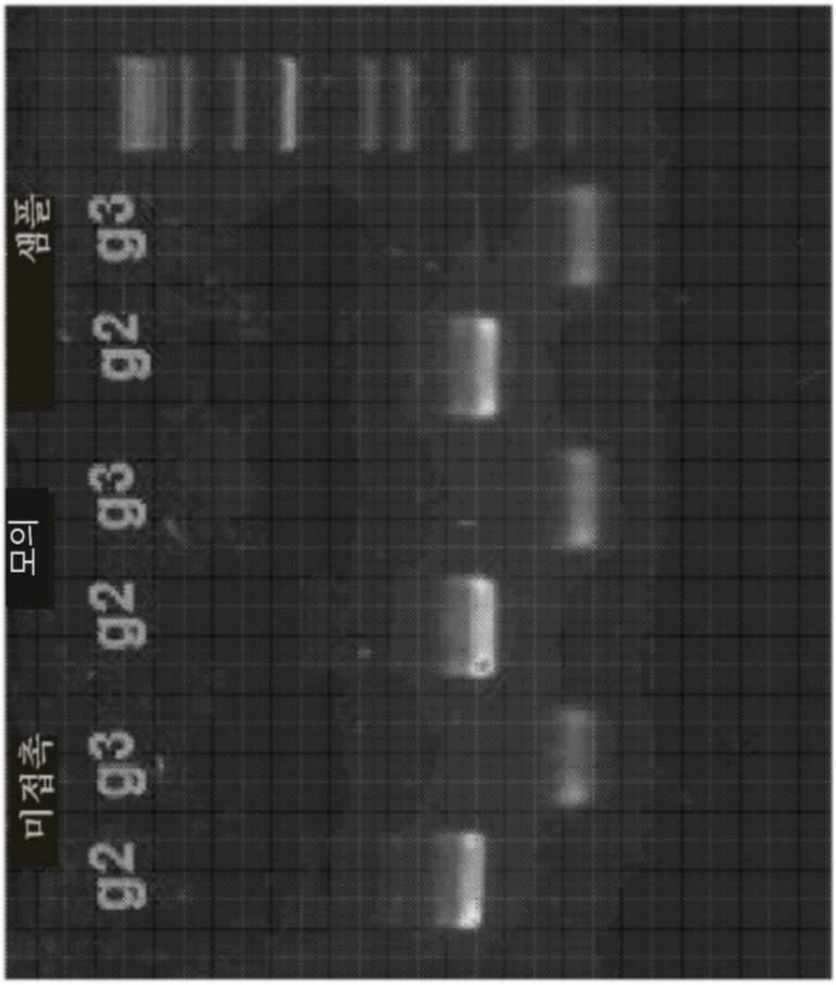
도면12w


EP 없음
sgCTRL
sgCD34_2
sgCD34_3
sgCTRL
EP 없음
가이드 3
가이드 2
CD34+ 세포 %
EP 후 일수
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

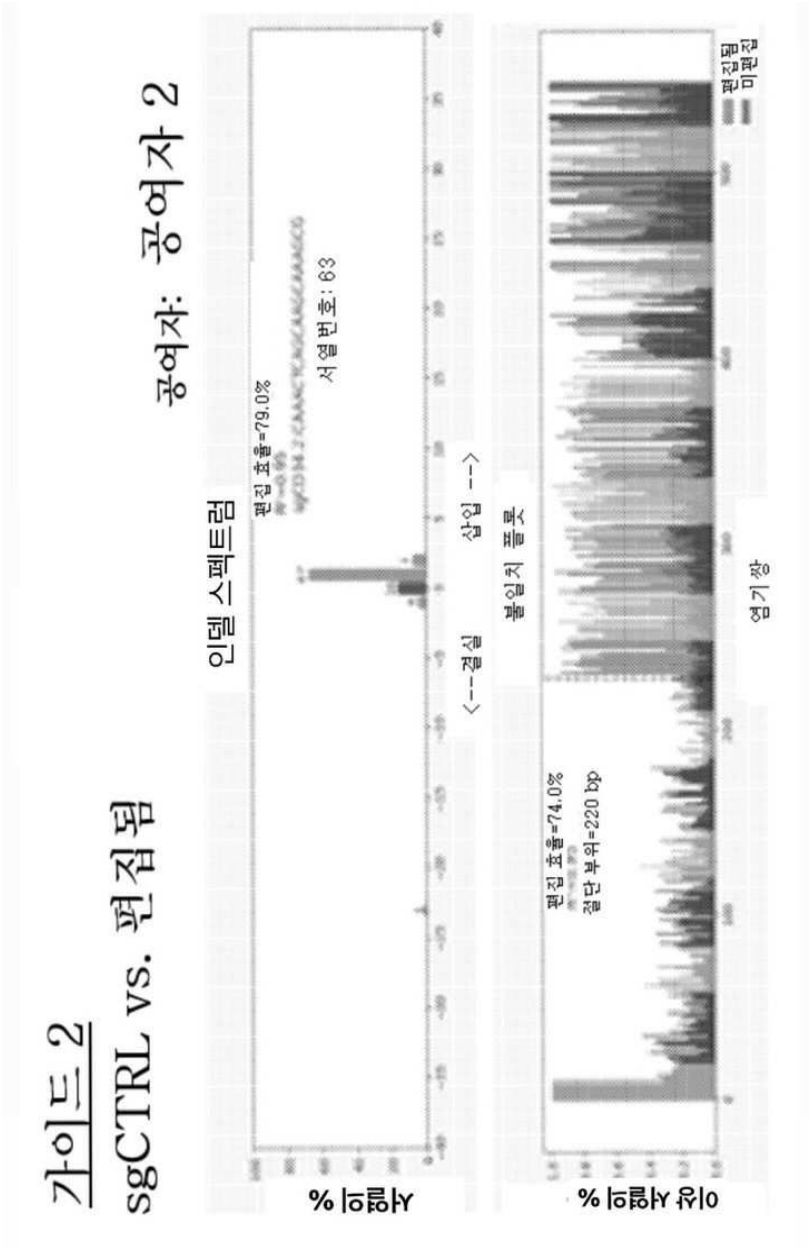
도면13a


일(Day)
-2
0
2
9
15
16
해동
EP
Mve
EE
IVD
RP
EE
IVD
Cyt
자극
EE
IVD
Ph
Cyt
분석:
유전자 편집
EE= ICE 를 통한 편집 효율성
표면 마커.
FC= EMR2 및 CD97 표면 단백질에 대한 유세포 분석
IVD= 시험관 내 골수성 분화 패널 + EMR2 + CD97
기능;
Cyt= 사이토카인 생성
Ph=식균작용
절차:
해동= 냉동 저장고에서 배양 시작
EP= 가이드 RNA 를 이용한 전기천공
Mve= 골수성 I 및 II 베지의 종자
RP= 접착력이 낮은 판에 재도금
MJ 에 의한 슬라이드 디자인

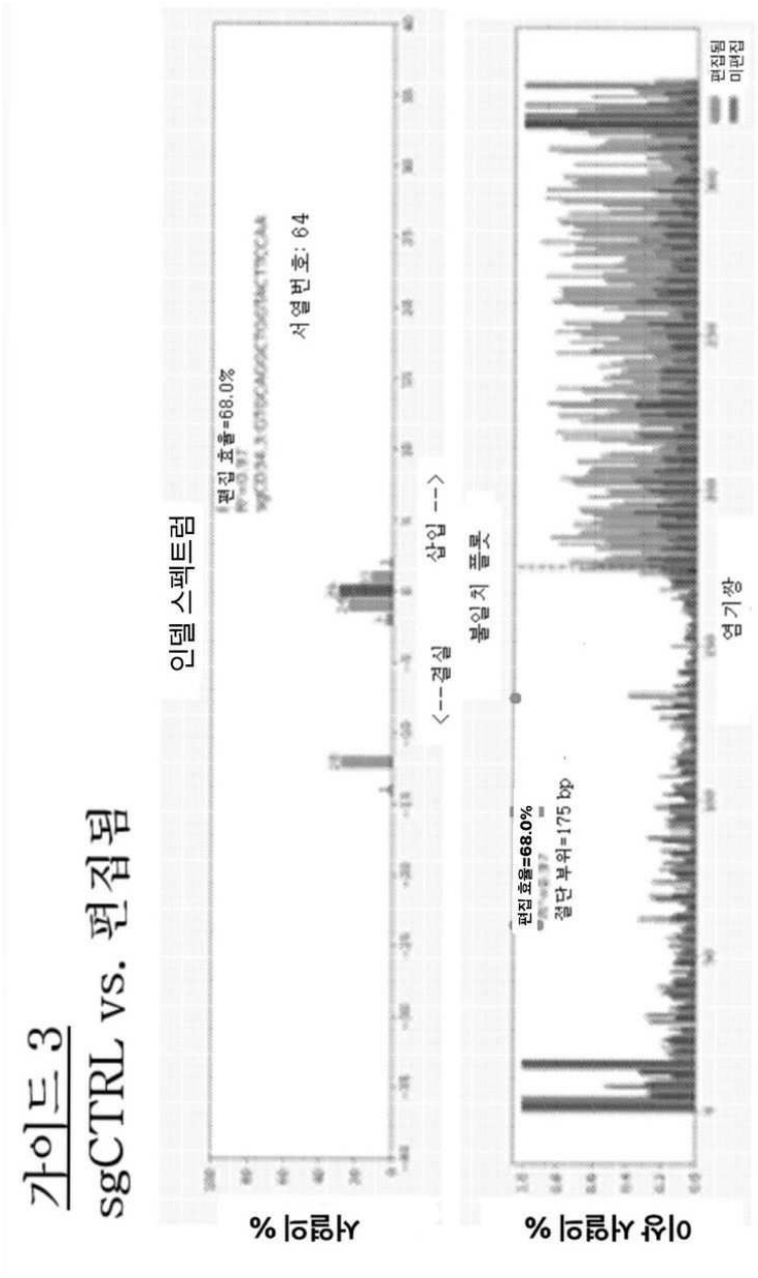
도면13b



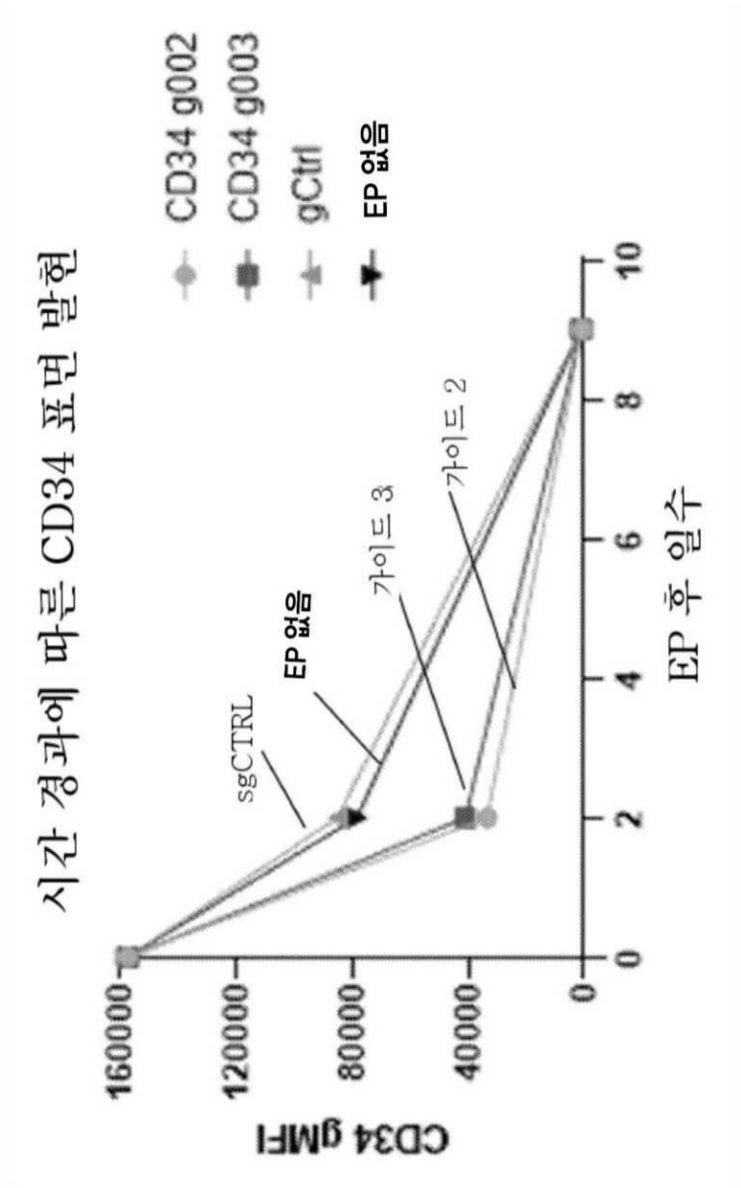
도면13c


가이드 2
sgCTRL vs. 편집됨
공여자: 공여자 2
인델 스펙트럼
편집 효율=79.0%
서열 번호: 63
<--- 결실
삽입 --->
서열의 %
불일치 플롯
편집 효율=74.0%
잘단 부위=220 bp
이상 서열의 %
염기 쌍
편집됨
미편집

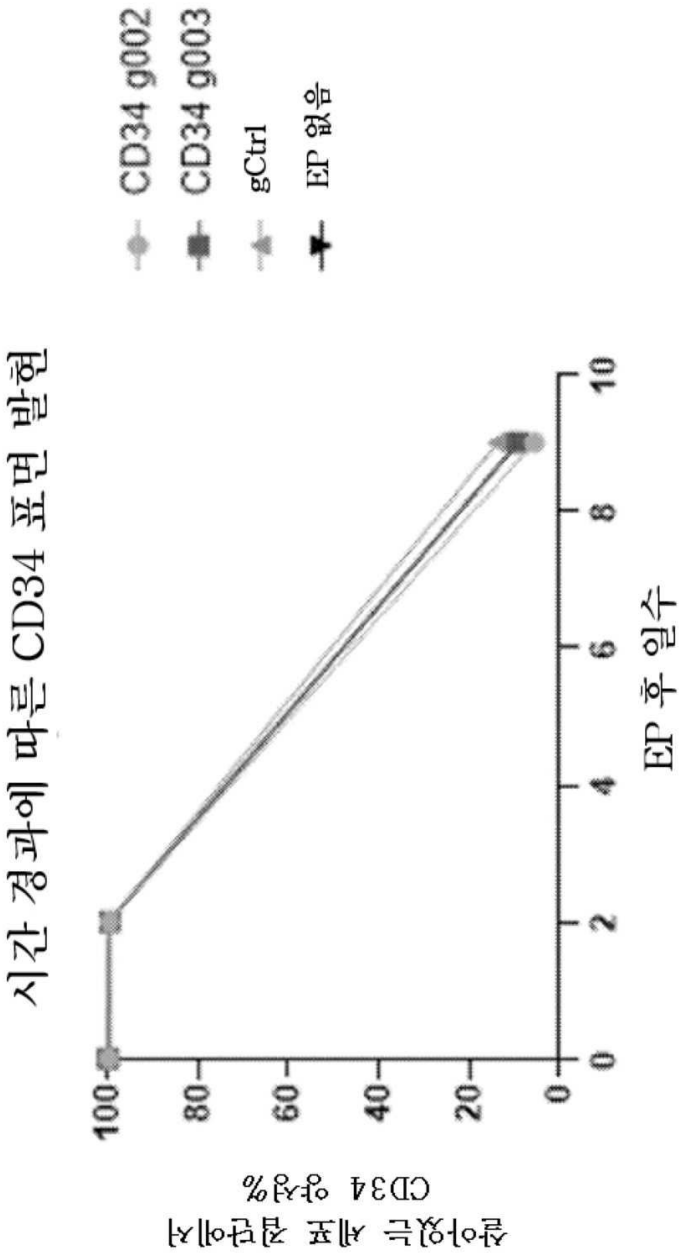
도면13d


가이드 3
sgCTRL vs. 편집 됨
인델 스펙트럼
편집 효율=68.0%
서열 번호: 64
<--결실
삽입 -->
서열의 %
불일치 플롯
편집 효율=68.0%
결단 부위=175 bp
염기쌍
이상 서열의 %
편집됨
미편집

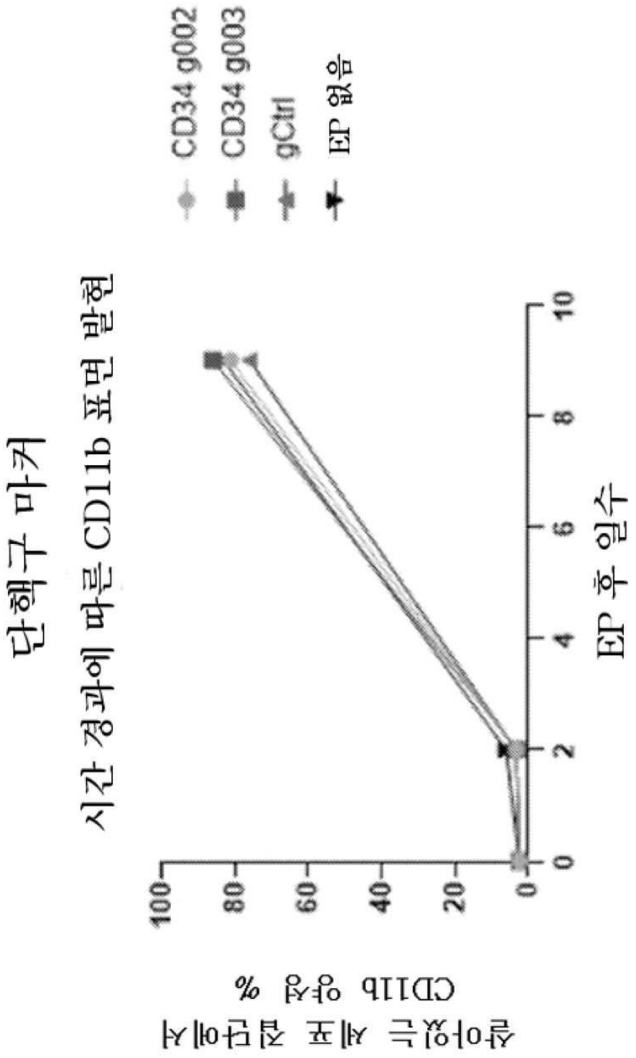
도면13e


시간 경과에 따른 CD34 표면 발현
CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
CD34 gMFI
160000
120000
80000
40000
0
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수
sgCTRL
EP 없음
가이드 3
가이드 2

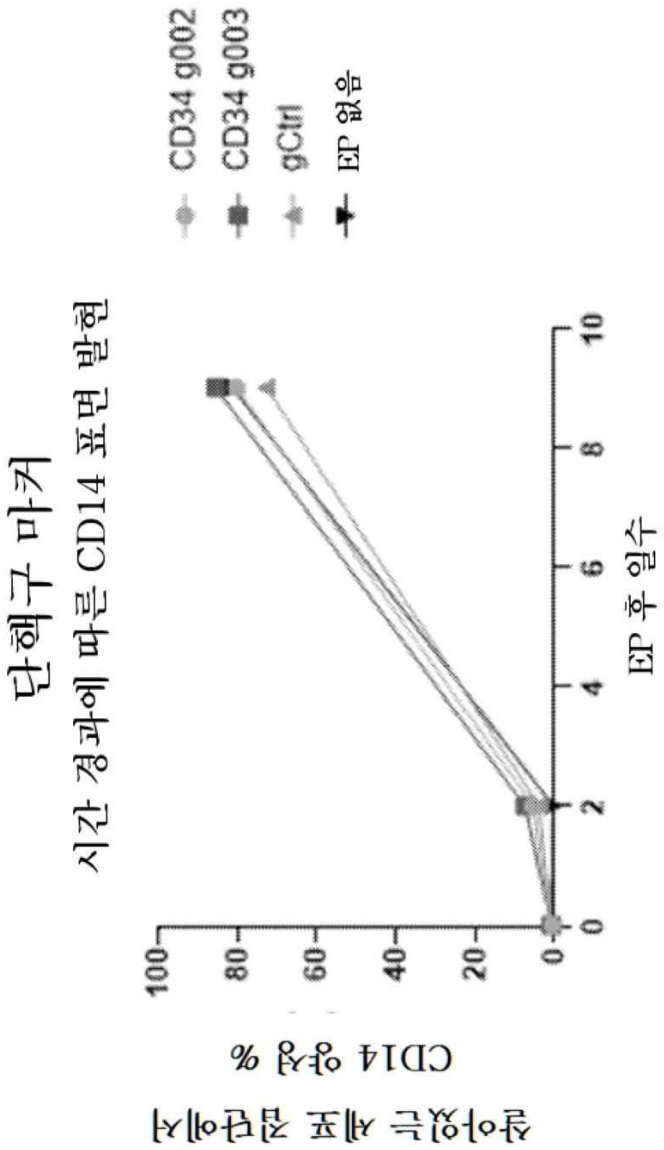
도면13f


CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
시간 경과에 따른 CD34 표면 발현
살아있는 세포 집단에서 CD34 양성%
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수

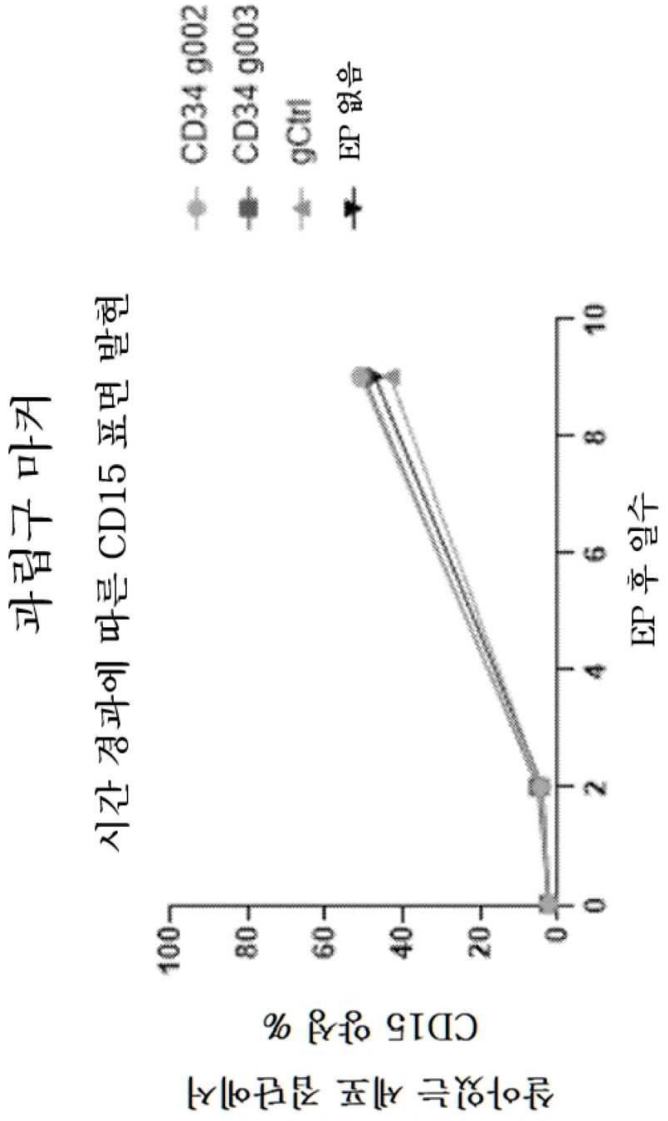
도면13g


단핵구 마커
시간 경과에 따른 CD11b 표면 발현
CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
살아있는 세포 집단에서
CD11b 양성 %
EP 후 일수
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
8
10

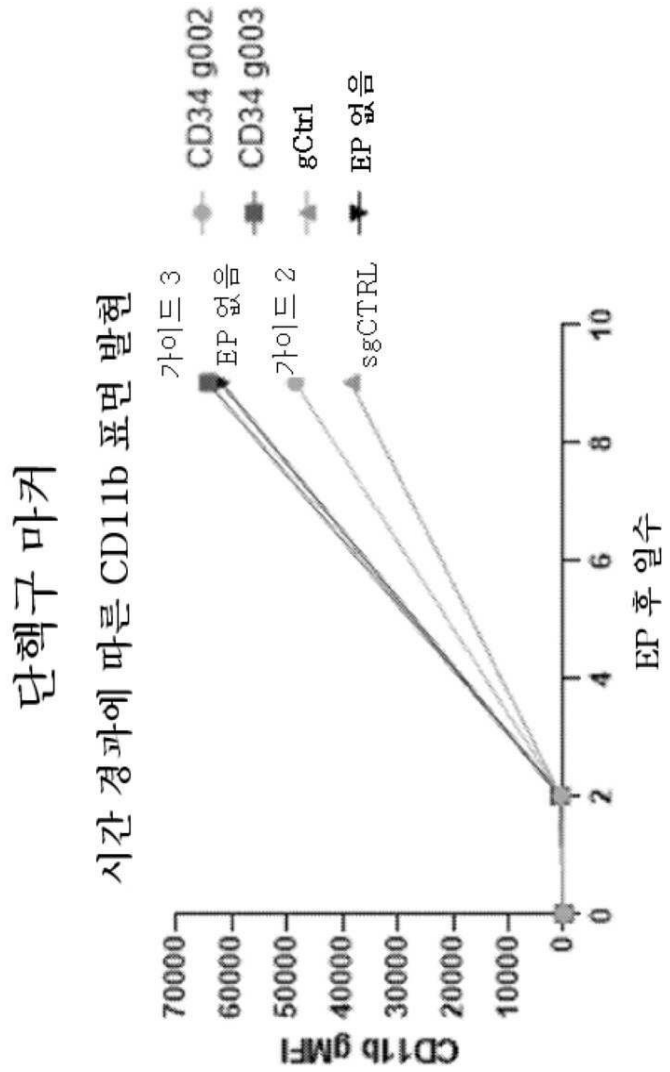
도면13h


CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
단핵구 마커
시간 경과에 따른 CD14 표면 발현
살아있는 세포 집단에서
CD14 양성 %
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수

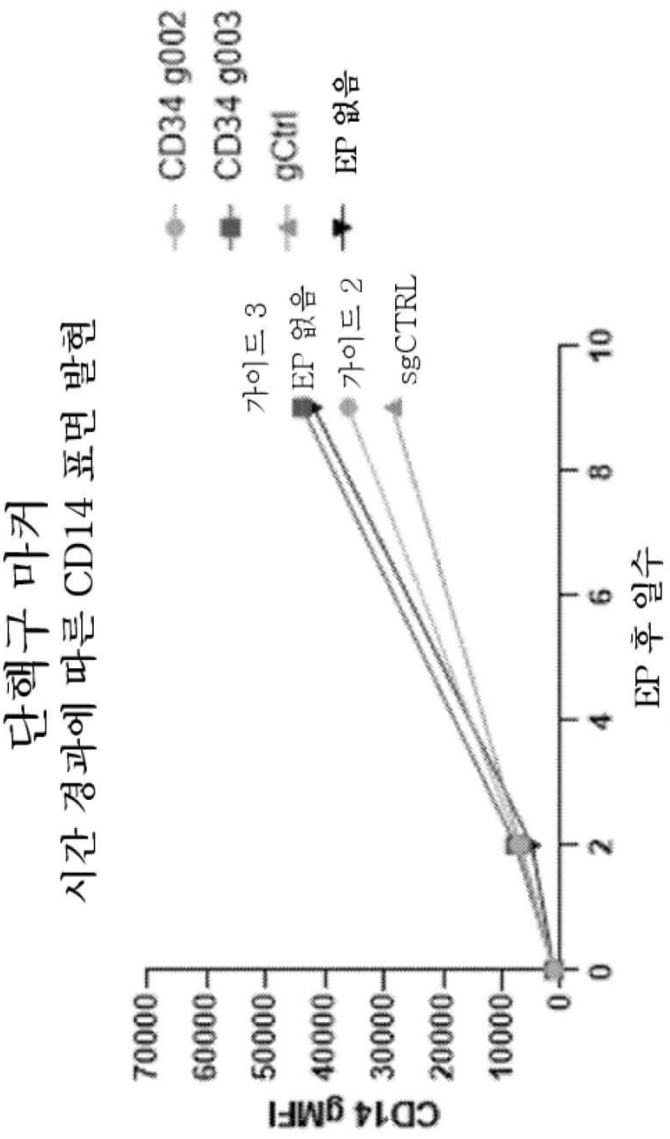
도면13i


과립구 마커
시간 경과에 따른 CD15 표면 발현
CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
살아있는 세포 집단에서
CD15 양성 %
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수

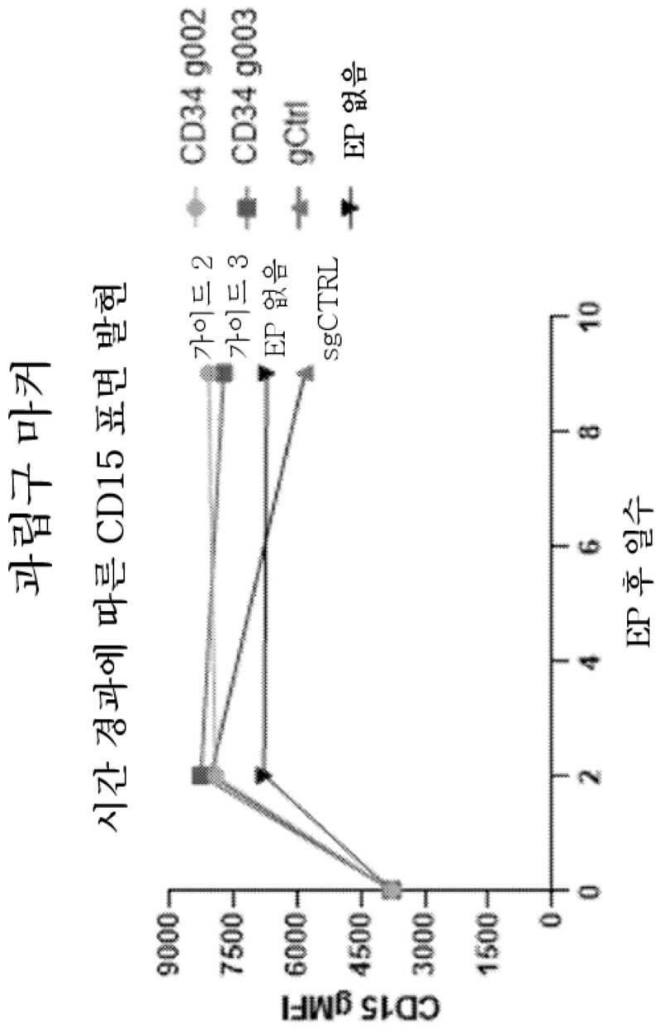
도면13j


단핵구 마커
시간 경과에 따른 CD11b 표면 발현
CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
가이드 3
EP 없음
가이드 2
sgCTRL
CD11b gMFI
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수

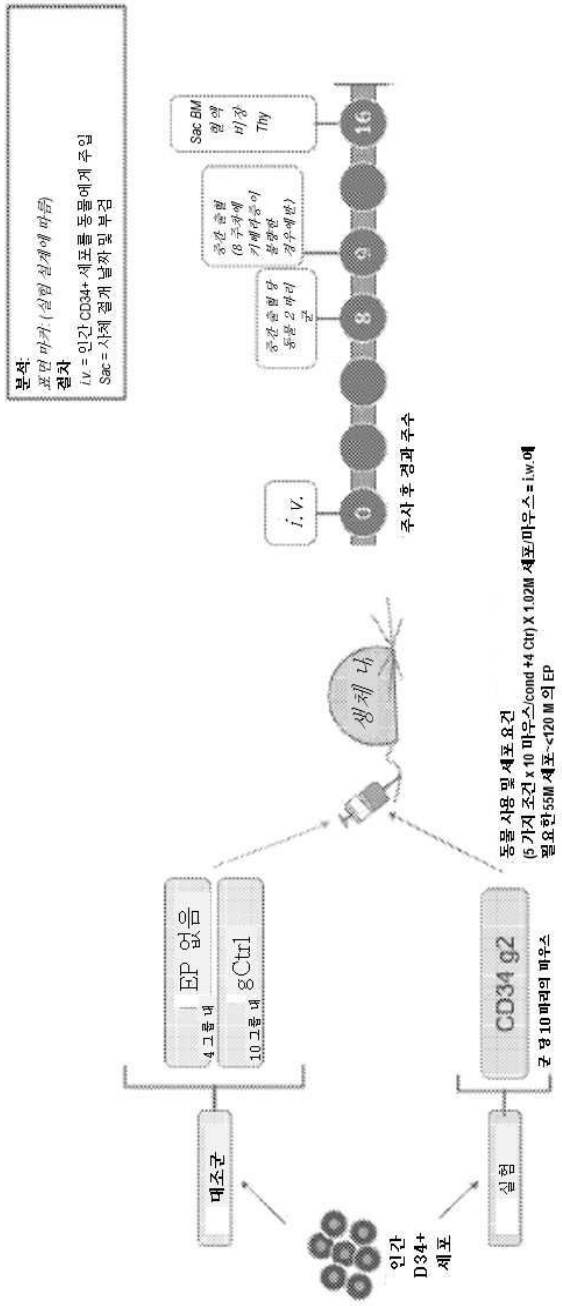
도면13k


단핵구 마커
시간 경과에 따른 CD14 표면 발현
CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
가이드 3
EP 없음
가이드 2
sgCTRL
CD14 gMFI
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수

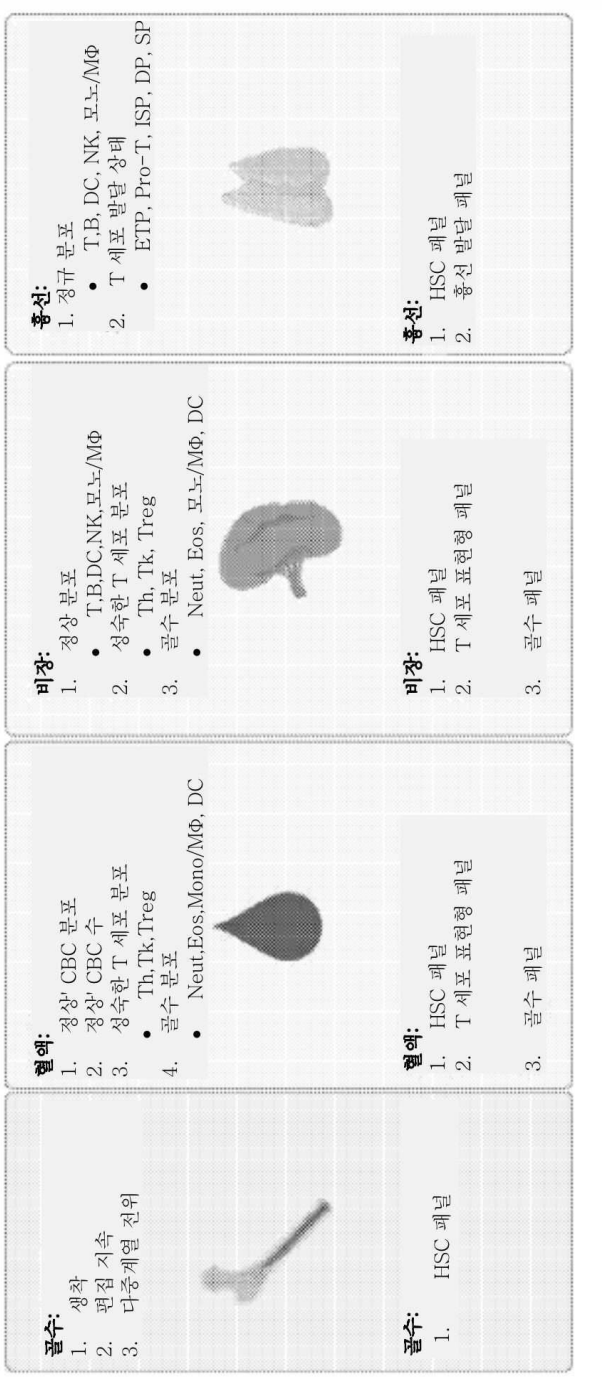
도면131


과립구 마커
시간 경과에 따른 CD15 표면 발현
CD34 g002
CD34 g003
gCtrl
EP 없음
가이드 2
가이드 3
EP 없음
sgCTRL
CD15 gMFI
9000
7500
6000
4500
3000
1500
0
0
2
4
6
8
10
EP 후 일수

도면14a


분석:
표현 마커 (실험 설계에 따름)
결과
iv = 인간 CD34+ 세포를 동물에게 주입
Sac = 시체 결과 날짜 및 부검
Sac BM
혈액
비장
Thy
종간 출혈
(6 주째에
키메라증이
불량한
경우에만)
종간 출혈 량
동물 2 마리
굳
i. V.
0
8
9
16
주사 후 경과 주수
생체 나
동물 사용 및 세포 요건
(5 가지 조건 x 10 마우스/cond +4 Ctr) X 1.02M 세포/마우스 = iw.예
필요 한 55M 세포~<120 M 의 EP
EP 없음
4 그룹 내
gCtrl
10 그룹 내
CD34 g2
군 당 10 마리의 마우스
대조군
실험
인간
D34+
세포

도면14b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> VOR BIOPHARMA INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR CD34 MODIFICATION

<130> V0291.70020WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 63/132,852

<151> 2020-12-31

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

caaagcgcgg tccagccccg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

caaactcagc aagcaaagcg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

gtgcaggctg gtacttccaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

cattgccatg ttgagacaca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

ataaactgag gttatcacag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

cggggctgga ccgcgctttg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

cgctttgctt gctgagtttg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

ttggaagtac cagcctgcac 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

tgtgtctcaa catggcaatg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

ctgtgataac ctcagtttat 20

<210> 11

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

caaagcgcgg uccagccccg 20

<210> 12

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

caaacucagc aagcaaagcg 20

<210> 13

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

gugcaggcug guacuuccaa 20

<210> 14

<211> 20

<212> RNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

cauugccaug uugagacaca 20

<210> 15

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

auaaacugag guuaucacag 20

<210> 16

<211> 385

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Met Leu Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Gly
1 5 10 15

Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met Ser
20 25 30

Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly Thr
35 40 45

Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr Pro
50 55 60

Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly Asn
65 70 75 80

Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser Thr
85 90 95

Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln Ser
100 105 110

Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val Ser
115 120 125

Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val Ser
130 135 140

Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys Pro
145 150 155 160
Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile Lys
165 170 175
Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu Glu
180 185 190
Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly Glu
195 200 205

Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp Ala
210 215 220
Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg Pro
225 230 235 240
Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser Lys
245 250 255
Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly Ile
260 265 270

Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser Gln
275 280 285
Lys Thr Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu Leu Ala Val Leu
290 295 300
Gly Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn Arg Arg Ser Trp Ser Pro Thr
305 310 315 320
Gly Glu Arg Leu Gly Glu Asp Pro Tyr Tyr Thr Glu Asn Gly Gly Gly
325 330 335

Gln Gly Tyr Ser Ser Gly Pro Gly Thr Ser Pro Glu Ala Gln Gly Lys
340 345 350
Ala Ser Val Asn Arg Gly Ala Gln Glu Asn Gly Thr Gly Gln Ala Thr
355 360 365
Ser Arg Asn Gly His Ser Ala Arg Gln His Val Val Ala Asp Thr Glu
370 375 380
Leu
385

<210> 17

<211> 7969

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

agtgtcttcc actcggtgcg tctctctagg agccgcgcgg gaaggatgct ggtccgcagg 60

ggcgcgcgcg cagggcccag gatgccgcgg ggctggaccg cgctttgctt gctgagtttg 120

ctgccttctg ggttcatgag tcttgacaac aacggtactg ctaccccaga gttacctacc 180

cagggaacat tttcaaatgt ttctacaaat gtatcctacc aagaaactac aacacctagt 240

acccttggaa gtaccagcct gcaccctgtg tctcaacatg gcaatgaggc cacaacaaac 300

atcacagaaa cgacagtcaa attcacatct acctctgtga taacctcagt ttatggaaac 360

acaaactctt ctgtccagtc acagacctct gtaatcagca cagtgttcac caccccagcc 420

aacgtttcaa ctccagagac aaccttgaag cctagcctgt cacctggaaa tgtttcagac 480

ctttcaacca ctagcactag ccttgcaaca tctcccacta aaccctatac atcatcttct 540

cctatcctaa gtgacatcaa ggcagaaatc aaatgttcag gcatcagaga agtgaaattg 600

actcagggca tctgcctgga gcaaaataag acctccagct gtgcggagtt taagaaggac 660

aggggagagg gcctggcccg agtgctgtgt ggggaggagc aggctgatgc tgatgctggg 720

gcccaggtat gctccctgct ccttgcccag tctgaggtga ggcctcagtg tctactgctg 780

gtcttggcca acagaacaga aatttccagc aaactccaac ttatgaaaaa gcaccaatct 840

gacctgaaaa agctggggat cctagatttc actgagcaag atgttgcaag ccaccagagc 900

tattcccaaa agaccctgat tgcactggtc acctcgggag ccctgctggc tgtcttgggc 960

atcactggct atttcctgat gaatcgccgc agctggagcc ccacaggaga aaggctgggc 1020

gaagaccctt attacacgga aaacggtgga ggccagggct atagctcagg acctgggacc 1080

tcccctgagg ctcagggaaa ggccagtgtg aaccgagggg ctcaggaaaa cgggaccggc 1140

caggccacct ccagaaacgg ccattcagca agacaacacg tggtggctga taccgaattg 1200

tgactcggct aggtggggca aggctgggca gtgtccgaga gagcacccct ctctgcatct 1260

gaccacgtgc tacccccatg ctggaggtga catctcttac gcccaaccct tccccactgc 1320

acacacctca gaggctgttc ttggggccct acaccttgag gaggggcagg taaactcctg 1380

tcctttacac attcggctcc ctggagccag actctggtct tctttgggta aacgtgtgac 1440

gggggaaagc caaggtctgg agaagctccc aggaacaatc gatggccttg cagcactcac 1500

acaggacccc cttcccctac cccctcctct ctgccgcaat acaggaaccc ccaggggaaa 1560

gatgagcttt tctaggctac aattttctcc caggaagctt tgatttttac cgtttcttcc 1620

ctgtattttc tttctctact ttgaggaaac caaagtaacc ttttgcacct gctctcttgt 1680

aatgatatag ccagaaaaac gtgttgcctt gaaccacttc cctcatctct cctccaagac 1740

actgtggact tggtcaccag ctcctccctt gttctctaag ttccactgag ctccatgtgc 1800

cccctctacc atttgcagag tcctgcacag ttttctggct ggagcctaga acaggcctcc 1860

caagttttag gacaaacagc tcagttctag tctctctggg gccacacaga aactcttttt 1920

gggctccttt ttctccctct ggatcaaagt aggcaggacc atgggaccag gtcttggagc 1980

tgagcctctc acctgtactc ttccgaaaaa tcctcttcct ctgaggctgg atcctagcct 2040

tatcctctga tctccatggc ttcctcctcc ctcctgccga ctcctgggtt gagctgttgc 2100

ctcagtcccc caacagatgc ttttctgtct ctgcctccct caccctgagc cccttccttg 2160

ctctgcaccc ccatatggtc atagcccaga tcagctccta acccttatca ccagctgcct 2220

cttctgtggg tgacccaggt ccttgtttgc tgttgatttc tttccagagg ggttgagcag 2280

ggatcctggt ttcaatgacg gttggaaata gaaatttcca gagaagagag tattgggtag 2340

atatttttc tgaatacaaa gtgatgtgtt taaatactgc aattaaagtg atactgaaac 2400

acatctgtta tgtgactctg tcttagctgg gtgtgtctgc atgcaagagt gacaccctcc 2460

attagaccta gctagactgt gcagtgatgt ggtggggagg accagccagg gaagagggag 2520

cacctcagca gacacaggca ccagccagga tgctaaggac ctttagccaa gtctgccaac 2580

tattctcctc catggggaga ggaaacatcc atttccagtg gtagaaaggc agacccgaat 2640

gtaccaggga gcttccaaat ggagggtggt atgttgggtt cttaggagct gtacccttca 2700

tgaacaccct tctgagaaga ggagcatgct gatcactgct gcaaaatatg caaaacaaag 2760

ggaaggggca atgtcctgtg cacccttat tatcaggcca ccccctccc cagcccccca 2820

ggtcagagta gacacagtga aggactatgt ggggactgtt gttctagaga cctggcagcc 2880

aactcaggga gggggctggt ttccaccctc aagattaaga cagcagccta attaaaaaaa 2940

aaatctgtaa gcatgtacct ccccccagct tccaaaacaa cccccacccc acccctacca 3000

ggccatagga agttggggag ggagtgctga ggagctccag gaaacactcc caagtgtgtc 3060

gacagtggca gaggcagttg gggccaaaca aaggttgatt cttccattct tatctccata 3120

aagccagacc tttcccttca gcactcctcc acccccatct ccttcttgct tttctccaac 3180

tcctctaatc ataggttctt ccctaggaca gaggggaggc gaaatgatga ggttcagagt 3240

cttccctcaa aggcgatggc tgccttgagg gttggagcaa aggatgatga gcaaaagacg 3300

atggtaatca gtagggaagt ccagcccact tgcatctagt tgcacatctt gccttgagag 3360

taatccagtg agggtctgtc ccagctagga catcaagtag gaggggtggg ttcagggttc 3420
agattcctag gaaatatggg aggagaggaa aaggcaactt ggatgcacct ccagcttcag 3480
gcctagcaac ctgcaatgca tctcaccctg agtttgctgg aatgtgtatg tatgctttgg 3540
gaggaagggc tgtgtgtgta ttgcggggtg gggtggggca gctggttccc tctgacagct 3600
ggacagcttg ccctgaagaa tttgcctgct ttctggaaaa atccaacttt cccaccgtgg 3660
gcctgagcgt cctggtacag caatggcgcc acctgctggc cttattgagg tcctactgct 3720
cagcctcagc tcaatcgcct ccatgttggg cttctctccc tggctgcccc accctctagt 3780

ccaatttctc ttgtacacaa agctcatata actatagaac gtcactgttg aagagaactt 3840
taaagataca tttaattaaa ctcccttatg gtatagttaa agacaaacta aggctcagag 3900
aagggaggtg gcttgcccaa tcacccagaa ttccaaagtc ctgaatctgt agttttccct 3960
tccatcatat catcctactc ttctgccgag tcctccgtgt tactccagtt ggatgtcatg 4020
aagccagtgt ggcagtgtga agataggttt gggacttcac ttctggagca tttcatcaac 4080
ataagctatc ctaggcctgg ccagccaagc aggtcctgga ggagccccag gacaaagatc 4140
acaggaggcc atgaggttcg gcttcttcgg cgcccacagt gagcccagga aaattagctg 4200

tagggtatta cactgttgac tatggagagc atatctggaa ttatcttcag ccagattttc 4260
atctgaatgg ataaatggga ataccatcta agtccagata aatagatcac ttccatctca 4320
tcccttctag gtagattaat cccacacttc ctcttcacac aaaaccagta ataggtcatc 4380
gattttgtgc aacaggatgc tgcttctctt cctaaagccc ccatcgaaga ggcttccagc 4440
caccattcaa tcattcatca agtcttatga tgtgccagac actgcgcgaa atgtgccaga 4500
acatctgtta tgtgccagac actgttcttg agactgggga tacagcaaac actcatgaag 4560
cttataattc tagcagaaga ggacagtaaa caatgtcatc tcagtaagta tatacatgtg 4620

ttttcaggat tgagagctat gaaaaacata aaatatattg agaataatgg ttggtatttt 4680
acatatggtg gttactttta gaaaaataac agtggagagc acagcttcac ttgaatgaag 4740
tggagaagca ggttgtatgc caagctggga gagattatcc cacacagggg aaaggacaag 4800
tgcaaagccc tatgatgaaa agctgccaag tgcagaaagc ctcagatggc agggggcaag 4860
atggccatga ggttgtgtca gtgagtgggg gtggggagag gcaggaggtc agactacatg 4920
gggccttttt agttgtagat tgggaagcca ctggagggtt ttgagcagag aagtcatatc 4980
atctgcttta tgttttaaaa ggatcatgct ggctgctgag tagagaatag aggttgaggg 5040

ataagaaagt agaaggagac cgtagcaaga agaacgatca tggctgggag caggtgatca 5100

tattggcagt gatgagatca agcagaattc aaaaagtggt ttcaaagtag aggtaacagg 5160

acttgctcag tctatttatt tcttcaaata ataatcatat ttacaatgat agtagctaac 5220

agtttttgag tgcttactgt atgaaaattg agatatggtg ccaatattta aatagcatat 5280

tttacttaac attcacagaa accctgtgaa gtaggttcta ttatctcaga aaaagaaact 5340

gaaactcaga gaataacaag ggactgtgtt acgtgcacag tggcagaggc aaagatgaat 5400

aggatgtgag tttatttgaa ccccaaatgt ttaaatcttg gggataatac aacacacatt 5460

taaacaaaga agcaagaaaa aaaatgcaca acagaaagtg agaaataaca cgaggaaaga 5520

ctaaatgaag tgctttgtat ctagatgtgg gcaggaccct ttccagctga gaagatctga 5580

gactgggtca tgaacaggtg gtttctgagt gggtcctgta aaaatgaata cgattttgat 5640

gatagtaatg agtaaggaca tttgagactg atagaagagt acatacaata tgtagtgatg 5700

gggaaagata aggtactgtc aaaggacaat gtgttttctg gtatgacaga gaagtagaat 5760

gtgttaaggg aagccgagta ccagaaagat ccgggtgtca cagtttgtgt agggtgttta 5820

aagctaaacc acagagttta attttatcca atagaagagg agccacagaa gagtttccat 5880

ttattcatta atttattcat ttattcaaaa aatatttgag tgcttattat aagccaggta 5940

ctatgccagg cacctgggat aagacatagt cccttctgtc aagtctttac attgggtgga 6000

tgtgggaggg acagatgaca gaacaatatg cattgagtgt aagtgctatg gtataggaag 6060

ctctgagtgg gaggggcatg gaagccgtgg aagaccatgg aaggcttccc aggagaagtg 6120

acgtctggac tgatcctttg gtcaagcagg agttaaagag gagaaaagga gagatatggg 6180

tgttcccgag agaggaagaa gccttgtccc aggagcaaag tgagggtgat tgttccagaa 6240

atgtgagtga ttcttttaag gctcaagcaa agcatgtgat tcttctttat accttctatt 6300

tctttgctga gtgtttctgt tcttttgttt caagcatgct gcaattgctc attaaagcat 6360

gtttatgatg gctgtctgtt ttaaaattct tgtcagatgg tttcaacatc tttatcatct 6420

caatgttggc atctgttaat ggtttttttct caatcaaatt gagattttcc tggttcttgg 6480

tattaccagt gattttaatt gcatctggaa atttgggatt tatgttgaaa gactggatct 6540

tattgaaaga ttctgtttag caccctcct ttgataccac actggtgggt ccaggttccc 6600

cattcagctg ttgacacctt cagggcagag aggtgggatg gggtgaaggg ggtacctcat 6660

tattgctggc ccaggttaga agttcaggct tcccagtaga tctctgctga taccaccctg 6720

gtgccatgtc attccttgag tccaaaagtc cctcccaatt ctgccttctt ctctctacat 6780

atcggagtct ccctatgttt gacttatata taatgtccag ggtttttaga gttagttaac 6840

aggaggcata agaaaaagtg tgtccactcc atcttgtctg gaactggaag ttcaagtcga 6900

atataagaga gaggagagga aattacaagc catgagactg gagagttagg caggttctac 6960

accagctatt ctcaaagccc tcttacactc ttaaaaattt agaacttcaa agagcttttg 7020

attttgaaag ttacatctat caattattac tgtttcaaaa attaaaattg agaaaatttt 7080

atttattaat ttgtttaaaa ataacaataa ttattcaatt acatgataat gtaagtaatg 7140

cttttcttaa tgaaaaataa ttatattttc caaaacaaaa acaattagga aaaagagtgt 7200

cattgtttta gactttggta aatctctcta atatctggct gaagagaaga atgctgattc 7260

ttttttttt ttttttttt tgagacggag tctcgctctg tcacccaggc tggagtgtag 7320

tggtgtgatc tcggctcact gcaagctctg cctcccgggt tcacgccatt ctcctgcctc 7380

agcctcccaa gtagctggga ctacaggcac ccgccaccac gcccggctaa ttttttgta 7440

tttttagtag agatggggtt tcaccgtgtt agccaggctg gtctcgatct cctgacctca 7500

tgatccaccc acctcagcct cccaaagcgc tgggattaca ggtgtgagac accgcgccca 7560

gcccccgaat gctgattctt ttatctgctt ctgtattcaa tctgttgtga tatgatgggt 7620

agcctctgaa acactccact gtatacttgt gaaagaatga atgtgaaaaa ggaaaataga 7680

tttgtagtat tattattcaa attgttttga cctcagagac cacttggaaa tgttttaggg 7740

aacccccaga ggaccttgga tcatgctttg agaaccgcgg ctctagatat gttactattt 7800

cagtagcatc taagtacatg tggctgctga gcacttgtaa tgtggctagt gcaaatgaga 7860

gacaggactt ccagctatat gtaatttaat aaactcaaat ttaaaaactg gaacctcata 7920

aaatgttttg ttgttgttgt taaacatgac cttatagttt tggtaggaa 7969

<210> 18

<211> 2598

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

agtgtcttcc actcggtgcg tctctctagg agccgcgcgg gaaggatgct ggtccgcagg 60

ggcgcgcgcg cagggcccag gatgccgcgg ggctggaccg cgctttgctt gctgagtttg 120

ctgccttctg ggttcatgag tcttgacaac aacggtactg ctaccccaga gttacctacc 180

cagggaacat tttcaaatgt ttctacaaat gtatcctacc aagaaactac aacacctagt 240

acccttggaa gtaccagcct gcaccctgtg tctcaacatg gcaatgaggc cacaacaaac 300

atcacagaaa cgacagtcaa attcacatct acctctgtga taacctcagt ttatggaaac 360

acaaactctt ctgtccagtc acagacctct gtaatcagca cagtgttcac caccccagcc 420

aacgtttcaa ctccagagac aaccttgaag cctagcctgt cacctggaaa tgtttcagac 480

ctttcaacca ctagcactag ccttgcaaca tctcccacta aaccctatac atcatcttct 540

cctatcctaa gtgacatcaa ggcagaaatc aaatgttcag gcatcagaga agtgaaattg 600

actcagggca tctgcctgga gcaaaataag acctccagct gtgcggagtt taagaaggac 660

aggggagagg gcctggcccg agtgctgtgt ggggaggagc aggctgatgc tgatgctggg 720

gcccaggtat gctccctgct ccttgcccag tctgaggtga ggcctcagtg tctactgctg 780

gtcttggcca acagaacaga aatttccagc aaactccaac ttatgaaaaa gcaccaatct 840

gacctgaaaa agctggggat cctagatttc actgagcaag atgttgcaag ccaccagagc 900

tattcccaaa agaccctgat tgcactggtc acctcgggag ccctgctggc tgtcttgggc 960

atcactggct atttcctgat gaatcgccgc agctggagcc ccacaggaga aaggctggag 1020

ctggaaccct gaccactctt caggaagaaa ggagtctgca catgcagctg caccctccct 1080

ccgatccttc ctcccacctc cccctccccc ttctcccacc cctgccccca cttcctgttt 1140

gggcccctct cccatccagt gtctcacagc cctgcttacc agataatgct actttattta 1200

tacactgtct agggcgaaga cccttattac acggaaaacg gtggaggcca gggctatagc 1260

tcaggacctg ggacctcccc tgaggctcag ggaaaggcca gtgtgaaccg aggggctcag 1320

gaaaacggga ccggccaggc cacctccaga aacggccatt cagcaagaca acacgtggtg 1380

gctgataccg aattgtgact cggctaggtg gggcaaggct gggcagtgtc cgagagagca 1440

cccctctctg catctgacca cgtgctaccc ccatgctgga ggtgacatct cttacgccca 1500

acccttcccc actgcacaca cctcagaggc tgttcttggg gccctacacc ttgaggaggg 1560

gcaggtaaac tcctgtcctt tacacattcg gctccctgga gccagactct ggtcttcttt 1620

gggtaaacgt gtgacggggg aaagccaagg tctggagaag ctcccaggaa caatcgatgg 1680

ccttgcagca ctcacacagg acccccttcc cctaccccct cctctctgcc gcaatacagg 1740

aacccccagg ggaaagatga gcttttctag gctacaattt tctcccagga agctttgatt 1800

tttaccgttt cttccctgta ttttctttct ctactttgag gaaaccaaag taacctttg 1860

cacctgctct cttgtaatga tatagccaga aaaacgtgtt gccttgaacc acttccctca 1920

tctctcctcc aagacactgt ggacttggtc accagctcct cccttgttct ctaagttcca 1980

ctgagctcca tgtgcccccc ctaccatttg cagagtcctg cacagttttc tggctggagc 2040

ctagaacagg cctcccaagt tttaggacaa acagctcagt tctagtctct ctggggccac 2100

acagaaactc tttttgggct ccttttttctc cctctggatc aaagtaggca ggaccatggg 2160

accaggtctt ggagctgagc ctctcacctg tactcttccg aaaaatcctc ttcctctgag 2220

gctggatcct agccttatcc tctgatctcc atggcttcct cctccctcct gccgactcct 2280

gggttgagct gttgcctcag tcccccaaca gatgcttttc tgtctctgcc tccctcaccc 2340

tgagcccctt ccttgctctg caccccccata tggtcatagc ccagatcagc tcctaaccct 2400

tatcaccagc tgcctcttct gtgggtgacc caggtccttg tttgctgttg atttctttcc 2460

agaggggttg agcagggatc ctggtttcaa tgacggttgg aaatagaaat ttccagagaa 2520

gagagtattg ggtagatatt ttttctgaat acaaagtgat gtgtttaaat actgcaatta 2580

aagtgatact gaaacaca 2598

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

100 105

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 21
<211> 68
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic
<400> 21
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30
Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45
Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60

Ala Tyr Arg Ser
65

<210> 22
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 22
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
20 25 30
Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro 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> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 24

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnngg 25

<210> 25

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(25)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 25

ccnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnn 25

<210> 26

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 26

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nn 22

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 27

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnntt 25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(25)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 28

aannnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnn 25

<210> 29

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

tcccccaccc ctctcccggg cggaggggcc gggaagagcg cgtcctggcc aagccgagta 60

gtgtcttcca ctcggtgcgt ctctctagga gccgcgcggg aaggatgct 109

<210> 30

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

aggggtggg gagagggccc gcctcccccg cccttctcgc gcaggaccgg ttcggctcat 60

cacagaaggt gagccacgca gagagatcct cggcgcgccc ttcctacga 109

<210> 31

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

ggtccgcagg ggcgcgcgcg cagggcccag gatgccgcgg ggctggaccg cgctttgctt 60

gctgagtttg ctgcgtgagt accgcccgcg cgccgcggcc gcttggctt 109

<210> 32

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

ccaggcgtcc ccgcgcgcgc gtcccgggtc ctacggcgcc ccgacctggc gcgaaacgaa 60

cgactcaaac gacgcactca tggcgggcgc gcggcgccgg cgaaccgaa 109

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg Gly Trp Thr

1 5 10 15

Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu

20

<210> 34

<211> 109

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

cgtctcacgg agggaaggga cccctgccca acccacgcac tgccgcccac agctgcttcc 60

ccccggggcc agcgcctcac ctgggagctg acgggggtgg gaggggaag 109

<210> 35

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

gcagagtgcc tcccttccct ggggacgggt tgggtgcgtg acggcgggtg tcgacgaagg 60

ggggccccgg tcgcggagtg gaccctcgac tgcccccacc ctccccttc 109

<210> 36

<211> 109

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

ctgccaacaa ggggcagcag ggaatgttct agacgaattc tacctgaagt caggaaattg 60

catcaggtga tatcaccagg ctgatatctt taggttctga ttcttcctc 109

<210> 37

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

gacggttgtt ccccgtcgtc ccttacaaga tctgcttaag atggacttca gtcctttaac 60

gtagtccact atagtggtcc gactatagaa atccaagact aagaaggag 109

<210> 38

<211> 109

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 38

ctcgtttccc tatagcttct gggttcatga gtcttgacaa caacggtact gctaccccag 60

agttacctac ccagggaaca ttttcaaatg tttctacaaa tgtatccta 109

<210> 39

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

gagcaaaggg atatcgaaga cccaagtact cagaactgtt gttgccatga cgatggggtc 60

tcaatggatg ggtcccttgt aaaagtttac aaagatgttt acataggat 109

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

Pro Ser Gly Phe Met Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu

1 5 10 15

Leu Pro Thr Gln Gly Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr

20 25 30

<210> 41

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

ccaagaaact acaacaccta gtacccttgg aagtaccagc ctgcaccctg tgtctcaaca 60

tggcaatgag gccacaacaa acatcacagg taaaaacagc atttgtgtc 109

<210> 42

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

ggttctttga tgttgtggat catgggaacc ttcatggtcg gacgtgggac acagagttgt 60

accgttactc cggtgttgtt tgtagtgtcc atttttgtcg taaacacag 109

<210> 43

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

Gln Glu Thr Thr Thr Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro

1 5 10 15

Val Ser Gln His Gly Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr

20 25

<210> 44

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

agatcccgga gagatgctgg tgatgcttgg gtaaagcatt taggatgttt tcagaccgct 60

cccctctcca cagaggaaat tatacaagtc cctagtatta atgacttga 109

<210> 45

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

tctagggcct ctctacgacc actacgaacc catttcgtaa atcctacaaa agtctggcga 60

ggggagaggt gtctccttta atatgttcag ggatcataat tactgaact 109

<210> 46

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

ccccagaaac cgaagagatt ccatctggtc gtagataaag tcaaagtcct gtggagatta 60

tgtaagatct aagatcgaga acaaggttgt cgaactttac tcaaaccag 109

<210> 47

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

agggatggga cacgaagtaa ctgttaactc cccaaactcc cttttctgtg ttgaagtgca 60

tgcccatatc atgacctgag attttgtgta tctatgagca catgcacac 109

<210> 48

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

tccctaccct gtgcttcatt gacaattgag gggtttgagg gaaaagacac aacttcacgt 60

acgggtatag tactggactc taaaacacat agatactcgt gtacgtgtg 109

<210> 49

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

atgcacaccc atgttttggt ctcttccaga aacgacagtc aaattcacat ctacctctgt 60

gataacctca gtttatggaa acacaaactc ttctgtccag tcacagacc 109

<210> 50

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

tacgtgtggg tacaaaacca gagaaggtct ttgctgtcag tttaagtgta gatggagaca 60

ctattggagt caaatacctt tgtgtttgag aagacaggtc agtgtctgg 109

<210> 51

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr

1 5 10 15

Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln Ser Gln Thr

20 25

<210> 52

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

tctgtaatca gcacagtgtt caccacccca gccaacgttt caactccaga gacaaccttg 60

aagcctagcc tgtcacctgg aaatgtttca gacctttcaa ccactagca 109

<210> 53

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

agacattagt cgtgtcacaa gtggtggggt cggttgcaaa gttgaggtct ctgttggaac 60

ttcggatcgg acagtggacc tttacaaagt ctggaaagtt ggtgatcgt 109

<210> 54

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val Ser Thr Pro

1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val Ser Asp Leu

20 25 30

Ser Thr Thr Ser

35

<210> 55

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

ctagccttgc aacatctccc actaaaccct atacatcatc ttctcctatc ctaagtgaca 60

tcaaggtggg tgaattgggc caaaaatggc agattgcccc tcacttcat 109

<210> 56

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

gatcggaacg ttgtagaggg tgatttggga tatgtagtag aagaggatag gattcactgt 60

agttccaccc acttaacccg gtttttaccg tctaacgggg agtgaagta 109

<210> 57

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro

1 5 10 15

Ile Leu Ser Asp Ile Lys

20

<210> 58

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

caaactcagc aagcaaagcg cggtccag 28

<210> 59

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 59

caaactcagc aagcaaangc gcggtccag 29

<210> 60

<211> 28

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

gtgcaggctg gtacttccaa gggtacta 28

<210> 61

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

gtgcaggctg gtacttcaag ggtacta 27

<210> 62

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

gtgcacaagg gtacta 16

<210

> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

caaactcagc aagcaaagcg 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 64

gtgcaggctg gtagtaccaa 20