



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월19일

(11) 등록번호 10-2770787

(24) 등록일자 2025년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/17 (2025.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2025.01)

A61K 39/0011 (2025.01)

(21) 출원번호 10-2023-7005926(분할)

(22) 출원일자(국제) 2018년10월29일

심사청구일자 2023년03월22일

(85) 번역문제출일자 2023년02월20일

(65) 공개번호 10-2023-0034416

(43) 공개일자 2023년03월09일

(62) 원출원 특허 10-2020-7015078

원출원일자(국제) 2018년10월29일

심사청구일자 2021년10월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/058026

(87) 국제공개번호 WO 2019/084552

국제공개일자 2019년05월02일

(30) 우선권주장

62/578,153 2017년10월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02017106528 A2*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 37 항

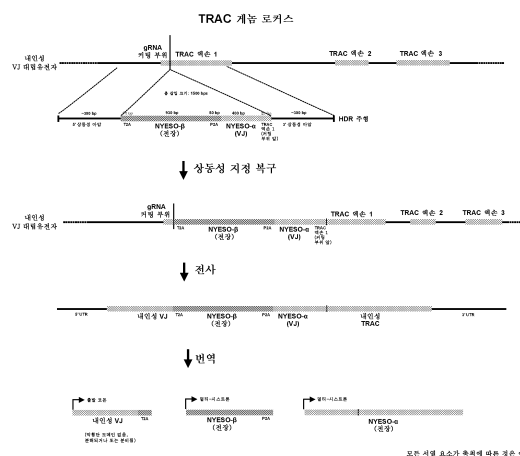
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 내인성 T 세포 수용체의 표적화된 대체

(57) 요약

본원에서는 인간 T 세포의 게놈을 편집하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이중성 T 세포 수용체 (TCR)- β 쇄 및 이중성 TCR- α 쇄는 T 세포의 게놈 중 TCR 서브유닛 불변 유전자의 엑손 1 내로 삽입된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 5/0637 (2025.01)
A61K 2039/5156 (2025.01)
A61K 2039/5158 (2025.01)
C12N 2510/02 (2013.01)

(72) 발명자

마르쑹, 알렉산더

미국 94607 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층 더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 내

푸이그 소스, 크리스티나

미국 94607 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층 더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 내

리바스, 안토니

미국 94607 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층 더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아 내

(56) 선행기술조사문헌

W02017156484 A1
W02016069282 A1
Mol Ther Oncolytics.,5:105-115(2017.5.17.)
US201500164954 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

내인성 T 세포 수용체 알파 서브유닛 불변 유전자 (TRAC), 및

내인성 T 세포 수용체 베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)

중 하나 또는 둘 다 내로 비-바이러스에 의해 삽입된 적어도 하나의 이종성(heterologous) 유전자를 포함하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 변형된 1차 인간 T 세포로서,

여기서 적어도 하나의 이종성 유전자는 암에 의해 발현되는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-특이적 수용체를 코딩하며, 적어도 하나의 핵산 서열의 크기는 적어도 500 bp인 것인, 변형된 1차 인간 T 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 변형된 인간 T 세포가 바이러스 벡터를 포함하지 않는 것인 T 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 적어도 하나의 핵산 서열의 크기가 적어도 1.5 kb인 T 세포.

청구항 4

제1항에 있어서, 적어도 하나의 핵산 서열이 T 세포 수용체 알파 서브유닛 불변 유전자 (TRAC)의 엑손 또는 T 세포 수용체 베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)의 엑손 내로 비-바이러스에 의해 삽입되는 것인 T 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 적어도 하나의 이종성 유전자가 (a) 이종성 인간 T 세포 수용체 알파 (TCR- α) 쉐의 유전자의 가변 영역 및 (2) 이종성 인간 T 세포 수용체 베타 (TCR- β) 쉐의 유전자의 가변 영역 중 적어도 하나를 포함하는 것인 T 세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 적어도 하나의 이종성 유전자가 (1) a) 이종성 T 세포 수용체 알파 (TCR- α) 쉐의 가변 영역 또는 b) 이종성 TCR- α 쉐의 가변 영역 및 불변 영역, 및 (2) a) 이종성 T 세포 수용체 베타 (TCR- β) 쉐의 가변 영역 또는 b) 이종성 TCR- β 쉐의 가변 영역 및 불변 영역 중 적어도 하나를 포함하는 것인 T 세포.

청구항 7

제6항에 있어서, 이종성 유전자가 (1) a) 이종성 TCR- α 쉐의 가변 영역 또는 b) 이종성 TCR- α 쉐의 가변 영역 및 불변 영역, 및 (2) a) 이종성 TCR- β 쉐의 가변 영역 또는 b) 이종성 TCR- β 쉐의 가변 영역 및 불변 영역 각각을 포함하는 것인 T 세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 이종성 TCR- α 쉐 및 이종성 TCR- β 쉐에 대한 하나 이상의 코딩 서열이 링커 서열 또는 멀티시스트론성 요소에 의해 연결되는 것인 T 세포.

청구항 9

제8항에 있어서, 링커 서열이 절단되어 이종성 TCR- α 쉐 유전자 및 이종성 TCR- β 쉐 유전자를 생성하는 절단 가능한 링커 서열인 T 세포.

청구항 10

제8항에 있어서, 이중성 유전자가 TCR- α 채 및 이중성 TCR- β 채를 코딩하며, 여기서 이중성 유전자는 TRAC 내로 삽입되는 것인 T 세포.

청구항 11

제1항에 있어서, 적어도 하나의 이중성 유전자가 내인성 TRAC 내로 비-바이러스에 의해 삽입되며, 여기서 적어도 하나의 이중성 유전자는 (1) a) 이중성 TCR- α 채의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- α 채의 가변 영역 및 불변 영역, 및 (2) a) 이중성 TCR- β 채의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- β 채의 가변 영역 및 불변 영역 각각을 포함하며,

이중성 TCR- α 채 및 이중성 TCR- β 채는 절단되어 이중성 TCR- α 채 및 이중성 TCR- β 채를 생성하는 절단가능한 링커 서열에 의해 작동가능하게 연결되며, 이중성 TCR- α 채 및 이중성 TCR- β 는 암에 의해 발현되는 표적 항원을 인식하는 항원-특이적 T 세포 수용체 (TCR)를 형성하는 것인 T 세포.

청구항 12

제1항에 있어서, 적어도 하나의 이중성 유전자의 발현이 내인성 프로모터의 제어 하에 있는 것인 T 세포.

청구항 13

제1항에 있어서, 변형된 인간 T 세포가 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포인 T 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포가 이펙터 T 세포 또는 나이브 T 세포인 T 세포.

청구항 15

제1항에 있어서, 1차 인간 T 세포가 암을 갖는 대상체로부터 획득되며, 적어도 하나의 이중성 유전자를 포함하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하도록 변형되는 것인 T 세포.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 복수의 1차 인간 T 세포를 포함하는 세포의 집단.

청구항 17

내인성 T 세포 수용체 알파 서브유닛 불변 유전자 (TRAC), 및

내인성 T 세포 수용체 베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)

중 하나 또는 둘 다 내로 적어도 하나의 이중성(heterologous) 유전자를 포함하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하는 변형된 1차 인간 T 세포로서, 여기서 적어도 하나의 이중성 유전자는 암에 의해 발현되는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항원-특이적 수용체를 코딩하며, 적어도 하나의 핵산 서열의 크기가 적어도 500 bp이고, T 세포가 적어도 하나의 핵산 서열을 T 세포로 도입하기 위한 바이러스 벡터를 포함하지 않는 것인, 변형된 1차 인간 T 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 변형된 1차 인간 T 세포가 바이러스 벡터를 포함하지 않는 것인 T 세포.

청구항 19

제17항에 있어서, 적어도 하나의 핵산 서열의 크기가 적어도 1.5 kb인 T 세포.

청구항 20

제17항에 있어서, 적어도 하나의 핵산 서열이 T 세포 수용체 알파 서브유닛 불변 유전자 (TRAC)의 엑손 또는 T 세포 수용체 베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)의 엑손 내로 비-바이러스에 의해 삽입되는 것인 T 세포.

청구항 21

제17항에 있어서, 적어도 하나의 이중성 유전자가 (a) 이중성 인간 T 세포 수용체 알파 (TCR- α)쇄의 가변 영역 및 (b) 이중성 인간 T 세포 수용체 베타 (TCR- β)쇄의 가변 영역 중 적어도 하나를 포함하는 것인 T 세포.

청구항 22

제17항에 있어서, 적어도 하나의 이중성 유전자가 (1) a) 이중성 T 세포 수용체 알파 (TCR- α)쇄의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 및 불변 영역, 및 (2) a) 이중성 T 세포 수용체 베타 (TCR- β)쇄의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 및 불변 영역 중 적어도 하나를 포함하는 것인 T 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, 이중성 유전자가 각각의 (1) a) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 및 불변 영역, 및 (2) a) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 것인 T 세포.

청구항 24

제23항에 있어서, 이중성 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 쇄에 대한 하나 이상의 코딩 서열이 링커 서열 또는 멀티 시스템성 요소에 의해 연결되는 것인 T 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 링커 서열이 절단되어 이중성 TCR- α 쇄 유전자 및 이중성 TCR- β 쇄 유전자를 생성하는 절단 가능한 링커 서열인 T 세포.

청구항 26

제24항에 있어서, 이중성 유전자가 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 쇄를 코딩하며, 여기서 이중성 유전자는 TRAC 내로 삽입되는 것인 T 세포.

청구항 27

제17항에 있어서, 적어도 하나의 이중성 유전자가 내인성 TRAC 내로 비-바이러스에 의해 삽입되며, 여기서 적어도 하나의 이중성 유전자는 각각의 (1) a) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 및 불변 영역, 및 (2) a) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 또는 b) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하며,

이중성 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 쇄는 절단되어 이중성 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 쇄를 생성하는 절단가능한 링커 서열에 의해 작동가능하게 연결되며, 이중성 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 는 암에 의해 발현되는 표적 항원을 인식하는 항원-특이적 T 세포 수용체 (TCR)를 형성하는 것인 T 세포.

청구항 28

제17항에 있어서, 적어도 하나의 이중성 유전자의 발현이 내인성 프로모터의 제어 하에 있는 것인 T 세포.

청구항 29

제17항에 있어서, 변형된 인간 T 세포가 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포인 T 세포.

청구항 30

제29항에 있어서, CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포가 이펙터 T 세포 또는 나이브 T 세포인 T 세포.

청구항 31

제17항에 있어서, 1차 인간 T 세포가 암을 갖는 대상체로부터 획득되며, 적어도 하나의 이중성 유전자를 포함하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하도록 변형된 것인 T 세포.

청구항 32

제17항 내지 제31항 중 어느 한 항의 복수의 1차 인간 T 세포를 포함하는 세포의 집단.

청구항 33

제1항 내지 제15항 및 제17항 내지 제31항 중 어느 한 항의 T 세포를 포함하는, 표적 항원을 발현하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 1차 인간 T 세포가 암을 갖는 대상체로부터 수득되며, 변형된 1차 인간 T 세포를 대상체에 투여하기 전에 적어도 하나의 이중성 유전자를 포함하는 적어도 하나의 핵산 서열을 포함하도록 변형되는 것인 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 암에 의해 발현되는 표적 항원을 특이적으로 결합하는 수용체를 코딩하는 적어도 하나의 이중성 유전자의 발현을 허용하는 조건 하에서 변형된 인간 T 세포가 배양되는 것인 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 변형된 인간 T 세포를 확장시키는데 효과적인 조건 하에서 변형된 인간 T 세포가 추가로 배양되는 것인 조성물.

청구항 37

제33항에 있어서, 수용체를 발현하는 변형된 인간 T 세포가 정제되는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

선행 관련 출원

본 출원은 2017년 10월 27일에 출원된 미국 가출원 번호 62/578,153의 이익을 주장하며, 이 가출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

배경 기술

T 세포는 성장하고 있는 입양 세포 치료제 분야에서 가장 활발하게 연구되는 세포 유형이다. T 세포는 최소의 부작용을 갖고 고도로 특이적인 반응을 할 수 있는 그의 T 세포 수용체 (TCR)의 표적과 특이적으로 상호작용한다. 이러한 고도로 효과적이고, 특이적인 반응은 원하는 특이성을 갖는 새로운 수용체를 T 세포 내로 삽입함으로써 신규한 항원 및 표적에 대해 이루어지도록 조작될 수 있다. 그러나, 완전히 새로운 유형의 수용체를 개발하는데 많은 시간이 소요되고, 고가의 비용이 들며, 이는 신체가 자연적으로 내인성 T 세포 레퍼토리의 발생을 통해 거의 모든 가능한 항원성 표적에 결합하는 TCR을 생산한다는 사실을 활용하지도 못한다. 인간 T 세포를 수득할 수 있고, 그의 내인성 TCR을 원하는 항원 특이성을 갖는 TCR로 대체할 수 있는 능력은 입양 T 세포 요법의 개발 및 적용에서 혁신적인 것이 될 수 있다.

발명의 내용

본 개시내용은 인간 T 세포의 게놈을 편집하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 이중성 TCR은 T 세포의 게놈 중 표적화된 영역 내로 삽입될 수 있고, 이로써, 이중성 TCR은 내인성 TCR 프로모터의 제어 하에 있게 된다는 것을 발견하게 되었다. 본원에 제공된 방법 및 조성물을 이용하여 인간 T 세포 중 내인성 TCR을 원하는 항원 특이성을 갖는 이중성 TCR로 대체시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포의 게놈 중 표적화된 영역은 친연 T 세포 수용체 로커스이다.

일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 T 세포의 게놈을 편집하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 인간 T 세포에서 T 세포 수용체 (TCR)-서브유닛 불변 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) TCR 서브유닛 쇄가 TCR 서브유닛의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 것인 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇄; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇄의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함하며,

여기서 내인성 TCR 서브유닛이 TCR-알파 (TCR- α) 서브유닛인 경우, 제1 이중성 TCR 서브유닛 쌍은 이중성 TCR-베타 (TCR- β) 서브유닛 쌍이고, 제2 이중성 TCR 서브유닛 쌍은 이중성 TCR- α 서브유닛 쌍이며, 여기서 내인성 TCR 서브유닛이 TCR- β 서브유닛인 경우, 제1 이중성 TCR 서브유닛 쌍은 이중성 TCR- α 서브유닛 쌍이고, 제2 이중성 TCR 서브유닛 쌍은 이중성 TCR- β 서브유닛 쌍인 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 인간 T 세포에서 TCR 알파 서브유닛 불변 유전자 (TRAC)의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- β 쌍; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- α 쌍의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함한다.

[0006] 일부 실시양태에서, 방법은 인간 T 세포에서 TCR-베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- α 쌍; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- β 쌍의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함한다.

[0007] 일부 실시양태에서, 핵산은 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 T 세포 내로 도입함으로써 삽입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 핵산을 포함하는 비-바이러스 벡터를 T 세포 내로 도입함으로써 삽입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 T 세포 내로 (a) TCR- α 서브유닛 불변 유전자 (TRAC)의 엑손 1 내의 표적 영역을 절단하여 T 세포의 게놈 중에 삽입 부위를 생성하는 표적화된 뉴클레아제; 및 (b) 핵산 서열을 도입함으로써 T 세포 내로 도입함으로써 삽입되며, 여기서 핵산 서열은 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 삽입 부위 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 T 세포 내로 (a) TCR- β 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)의 엑손 1 내의 표적 영역을 절단하여 T 세포의 게놈 중에 삽입 부위를 생성하는 표적화된 뉴클레아제; 및 (b) 핵산 서열을 도입함으로써 T 세포 내로 도입함으로써 삽입되며, 여기서 핵산 서열은 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 삽입 부위 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산의 5' 말단 및 3' 말단은 표적 영역에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산의 5' 말단 및 3' 말단은 삽입 부위에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화된 뉴클레아제는 삽입 부위에 이중 가닥 파단을 도입한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 이중 가닥으로 또는 단일 가닥 핵산으로서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA 주형으로서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 선형 핵산으로서 세포 내로 도입된다.

[0008] 일부 실시양태에서, 제1 자기-절단 펩티드 및 제2 자기-절단 펩티드는 동일하거나 또는 상이한 바이러스 2A 펩티드이다.

[0009] 일부 실시양태에서, 표적화된 뉴클레아제는 RNA-가이드된 뉴클레아제 도메인, 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) 및 메가TAL로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, RNA-가이드된 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제이고, 방법은 세포 내로 TRAC의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제, 가이드 RNA 및 핵산은 리보핵단백질 복합체 (RNP)-DNA 주형 복합체로서 세포 내로 도입되며, 여기서 RNP-DNA 주형 복합체는 (i) Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제, 및 가이드 RNA를 포함하는 RNP; 및 (ii) DNA 주형을 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 복합체 중 RNP 대 DNA 주형의 몰비는 약 3:1 내지 약 100:1이다. 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체는 약 20°C 내지 25°C의 온도에서 약 10 내지 약 30분 동안 RNP를 DNA 주형과 함께 인큐베이션함으로써 형성된다. 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체를 세포 내로 도입하기 전에 RNP-DNA 주형 복합체 및 세포를 혼합한다. 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체는 적어도 2개의 구조적으로 상이한 RNP 복합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 RNP 복합체는 구조적으로 상이한 가이드 RNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 구조적으로 상이한 RNP 복합체는 각각 Cas9 니카제를 포함하고, 구조적으로 상이한 가이드 RNA는 표적 영역의 반대 가닥에 하이브리드화한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 도입은 전기천공을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 약 1×10^5 내지 약 2×10^6 개 T 세포의 집단 내로 도입된다. 일부 예에서, 표적화된 뉴클레아제 및 DNA 주형은 약 1×10^5 내지 약 2×10^6 개 T 세포의 집단 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 DNA 주형은 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 DNA 주형은 비-바이러스 주형이다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 DNA 주형은 각각 항원 특이적 T 세포 수용체의 이중성 TCR- β 쌍의 가변 영역, 및 항원 특이적 T 세포 수용체의 이중성 TCR- α 쌍의 가변 영역의 고유한 조합을 코딩한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포, 이펙터 T 세포, 또는 나이브 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는

이펙터 T 세포이며, 여기서 이펙터 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 이펙터 T 세포이며, 여기서 이펙터 T 세포는 $CD4^+$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포는 $CD4^+CD8^+$ T 세포이다.

[0012] 일부 실시양태에서, 방법은 T 세포를 이중성 TCR- β 채 및 이중성 TCR- α 채의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하여 항원-특이적 T 세포 수용체를 형성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 변형된 T 세포를 변형된 세포의 집단을 확장시키는데 효과적인 조건 하에서 배양하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포를 정제하는 것을 추가로 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 인간 T 세포에서 TCR 알파 서브유닛 불변 유전자 (TRAC)의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 항원 특이적 T 세포 수용체의 이중성 TCR- α 채; 및 (iii) 내인성 TCR 알파 서브유닛의 엑손 1의 N-말단 부분을 코딩하는 제1 핵산 서열을 삽입하는 것; 및 (b) 인간 T 세포에서 TCR 베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 항원 특이적 T 세포 수용체의 이중성 TCR- β 채; 및 (iii) 내인성 TCR 베타 서브유닛의 엑손 1의 N-말단 부분을 코딩하는 제2 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함하는, 인간 T 세포의 게놈을 편집하는 방법을 제공한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 핵산 서열은 제1 및/또는 제2 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 T 세포에 도입함으로써 삽입된다. 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 핵산 서열은 제1 및/또는 제2 핵산을 포함하는 비-바이러스 벡터를 T 세포에 도입함으로써 삽입된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 핵산은 (a) TRAC의 엑손 1에 제1 삽입 부위, 및 TCR 베타 서브유닛 불변 유전자 (TRBC)의 엑손 1에 제2 삽입 부위를 생성하는 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제; 및 (b) 제1 핵산 서열; 및 (c) 제2 핵산 서열을 도입함으로써 T 세포에 삽입되며, 여기서 제1 핵산 서열은 TRAC의 엑손 1 중 제1 삽입 부위 내로 삽입되고, 제2 핵산 서열은 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 TRBC의 엑손 1 중 제2 삽입 부위 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA 주형으로서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 선형 DNA 주형으로서 세포 내로 도입된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 서열의 5' 말단 및 3' 말단은 TRAC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 서열의 5' 말단 및 3' 말단은 TRAC 유전자의 엑손 1 내의 제1 삽입 부위에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 서열의 5' 말단 및 3' 말단은 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 서열의 5' 말단 및 3' 말단은 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 제2 삽입 부위에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제는 제1 및 제2 삽입 부위에 이중 가닥 과단을 도입한다. 일부 실시양태에서, 제1 자기-절단 펩티드 및 제2 자기-절단 펩티드는 동일하거나 또는 상이한 바이러스 2A 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제는 RNA-가이드된 뉴클레아제 도메인, 전사 활성인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) 또는 메가TAL로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0017] 일부 실시양태에서, RNA-가이드된 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제이고, 방법은 세포 내로 TRAC의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 제1 가이드 RNA, 및 TRBC의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 제2 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제, 제1 가이드 RNA 및 제1 핵산은 리보핵단백질 복합체 (RNP)-DNA 주형 복합체로서 세포 내로 도입되며, 여기서 RNP-DNA 주형 복합체는 (i) Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제, 및 제1 가이드 RNA를 포함하는 RNP; 및 (ii) 제1 DNA 주형을 포함한다. 일부 실시양태에서, Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제, 제2 가이드 RNA, 및 제2 핵산은 RNP-DNA 주형 복합체로서 세포 내로 도입되며, 여기서 RNP-DNA 주형 복합체는 (i) Cpf1 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제, 및 제2 가이드 RNA를 포함하는 RNP; 및 (ii) 제2 DNA 주형을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 복합체 중 RNP 대 DNA 주형의 몰비는 약 3:1 내지 약 100:1이다. 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체는 약 20°C 내지 25°C의 온도에서 약 10 내지 약 30분 동안 RNP를 DNA 주형과 함께 인큐베이션함으로써 형성된다. 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체는 적어도 2개의 구조적으로 상이한 RNP 복합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 구조적으로 상이한 RNP 복합체는 각각 Cas9 니카제를 포함하고, 구조적으로 상

이한 가이드 RNA는 표적 영역의 반대 가닥에 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 도입은 전기천공을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 핵산은 약 1×10^5 내지 약 2×10^6 개 T 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제 및 제1 및 제2 핵산은 약 1×10^5 내지 약 2×10^6 개 T 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 제1 DNA 주형은 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 제1 DNA 주형은 항원 특이적 T 세포 수용체의 TCR- α 쇄의 상이한 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 제2 DNA 주형은 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 제2 DNA 주형은 항원 특이적 T 세포 수용체의 TCR- β 쇄의 상이한 가변 영역을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포, 이펙터 T 세포, 또는 나이브 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 이펙터 T 세포이며, 여기서 이펙터 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 이펙터 T 세포이며, 여기서 이펙터 T 세포는 $CD4^+$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포는 $CD4^+CD8^+$ T 세포이다.

[0021] 일부 실시양태에서, 방법은 T 세포를 이중성 TCR- β 쇄 및 이중성 TCR- α 쇄의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하여 항원-특이적 T 세포 수용체를 형성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 T 세포를 이중성 TCR- β 쇄 및 이중성 TCR- α 쇄의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양하여 항원-특이적 T 세포 수용체를 형성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 변형된 T 세포를 변형된 세포의 집단을 확장시키는 데 효과적인 조건 하에서 배양하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포를 정제하는 것을 추가로 포함한다.

[0022] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 변형된 T 세포로서, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 T 세포 수용체 (TCR)- β 쇄의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR 알파 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 통합되는 것인 변형된 T 세포를 제공한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 변형된 T 세포로서, a) N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 서열, (ii) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역, 및 (iii) 내인성 TCR- α 쇄의 N-말단 부분을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 b) N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 서열, (ii) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역, 및 (iii) 내인성 TCR- β 쇄의 N-말단 부분을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 통합되고, 제2 핵산 서열은 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 통합되는 것인 변형된 T 세포를 추가로 제공한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, a) 대상체로부터 T 세포를 수득하는 단계; b) 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 T 세포를 변형시키는 단계로서, 여기서 T 세포 수용체는 대상체에서 종양-특이적 항원을 인식하는 것인 단계; 및 c) 대상체에게 변형된 T 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 추가로 제공한다.

[0025] 이중성 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 쇄를 발현하도록 T 세포를 변형시키기 위해 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여 인간 감마 델타 ($\gamma\delta$) T 세포를 또한 편집할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 방법은 인간 T 세포에서 T 세포 수용체 감마 서브유닛 불변 (TRGC) 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- α 의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함한다.

[0026] 다른 실시양태에서, 방법은 핵산 삽입 시, 이중성 TCR- β 및 TCR- α 서열을 코딩하는 핵산은 내인성 TCR- γ 프로모터의 제어 하에 있도록, 인간 T 세포에서 T 세포 수용체 감마 서브유닛 불변 (TRGC) 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 전장 이중성 TCR- α 쇄; 및 (v) 정지 코돈을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함한다.

[0027] 다른 실시양태에서, 방법은 인간 T 세포에서 T 세포 수용체 감마 서브유닛 불변 (TRGC) 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- δ 쇄의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- γ 쇄의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- γ 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함한다. 또한, 인간 T 세포에서 TRAC 유전자의 엑손 1 내의

표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- γ 쌍의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- δ 쌍의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함하는, 인간 T 세포의 게놈을 편집하는 방법을 또한 제공한다. 다른 실시양태에서, 방법은 핵산 삽입 시, 이중성 TCR- γ 및 TCR- δ 서열이 내인성 TCR- α 프로모터의 제어 하에 있도록, 인간 T 세포에서 T 세포 수용체 감마 서브유닛 불변 (TRAC) 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이중성 TCR- γ 쌍의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 전장 이중성 TCR- δ 쌍; 및 (v) 정지 코돈을 코딩하는 핵산 서열을 삽입하는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0028]

본 출원은 하기 도면을 포함한다. 도면은 조성물 및 방법의 특정 실시양태 및/또는 특징을 예시하고, 조성물 및 방법의 임의의 설명(들)을 보충하기 위한 것으로 의도된다. 서면 설명이 그러한 경우임을 분명하게 명시하지 않는 한, 본 도면이 조성물 및 방법의 범주를 제한하지 않는다.

도 1a는 상동성 지정 복구를 통한, N-말단에서 C-말단으로, (i) T2A 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 전장 (즉, 가변 영역 및 불변 영역)의 이중성 TCR- β 쌍 (NYESO- β); (iii) P2A 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- α 쌍의 가변 영역 (NYESO- α); 및 (v) 내인성 TCR 알파 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단일 비-바이러스 DNA 주형의 T 세포 내로의 삽입을 도시한 개략도이다. 상동성 지정 복구를 통한 TRAC 유전자의 엑손 1에의 DNA 주형 삽입 후, DNA 주형을 전사시키고, 번역시켜 NY-ESO-1 흑색종 신생항원을 인식하는 항원-특이적 TCR을 형성하는 전장 NYESO- β 쌍 및 전장 NYESO- α 쌍을 제조하였다.

도 1b는 TCR- β 로커스 (TRBC1 또는 TRBC2)에서의 단일 비-바이러스 DNA 주형의 삽입을 도시한 개략도이다. 주형은 상동성 지정 복구를 통한 T 세포 내의, N-말단에서 C-말단으로, (i) T2A 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 전장 (즉, 가변 영역 및 불변 영역) 이중성 TCR- α 쌍 (NYESO- α); (iii) P2A 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- β 쌍의 가변 영역 (NYESO- β); 및 (v) 내인성 TCR 베타 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

도 2는 (a) N-말단에서 C-말단으로, (i) P2A 자기-절단 펩티드 서열, (ii) 항원 특이적 T 세포 수용체의 TCR- α 쌍의 가변 영역 (NYESO- α); 및 (iii) 내인성 TCR- α 서브유닛의 엑손 1의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 비-바이러스 DNA 주형; 및 (b) N-말단에서 C-말단으로, (i) T2A 자기-절단 펩티드 서열, (ii) 항원 특이적 T 세포 수용체의 TCR- β 쌍의 가변 영역; 및 (iii) 내인성 TCR- β 서브유닛의 엑손 1의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 DNA 주형을 삽입함으로써 수행된, 내인성 T 세포 α 및 T 세포 β 수용체 쌍 둘다의 동시 대체를 도시한 개략도이다.

도 3a는 T 세포 수용체의 폴리클로날 라이브러리를 형성하기 위한 T 세포에서의 이중성 (TCR)- β 쌍 및 TCR- α 쌍의 삽입을 도시한 개략도이다. N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 전장 (예를 들어 가변 영역 및 불변 영역) 이중성 T 세포 수용체 (TCR)- β 쌍; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- α 쌍의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR 알파 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 다중의 상이한 DNA 주형, 예를 들어, 비-바이러스 DNA 주형을 동시에 전기천공하여 원하는 TCR 서열의 합성 T 세포 레퍼토리를 포함하는 T 세포의 집단을 생성하였다.

도 3b는 앞서 공지된 TCR 서열로부터, 또는 관심 내인성 T 세포 집단에서의 천연 레퍼토리로부터, 예를 들어, 대상체로부터의 T 세포 레퍼토리의 디자인을 제시하는 개략도이다. 예를 들어, TCR은 종양 침윤 림프구에 의해 발현되는 TCR, 자가면역 질환의 부위에서의 자가반응성 T 세포에 의해 발현되는 TCR, 또는 병원체 반응성 T 세포로부터의 TCR일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

도 4a는 이중성 NYESO TCR로 전기천공된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 FACS 분석을 제시한다. 2명의 건강한 인간 혈액 공여자로부터의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 상기 기재된 바와 같이, 이중성 NYESO- α 및 이중성 NYESO- β 를 포함하는 비-바이러스 구축물로 전기천공하였다. 전기천공 후 4일째, 세포를 통합된 NYESO-특이적 TCR에 의해 인식되는 펩티드를 함유하는 형광 표지된 MHC-펩티드 트라머로 염색하였다.

도 4b는 이중성 NYESO TCR로 전기천공된 CD8⁺ T 세포의 FACS 분석을 제시한다. 건강한 인간 혈액 공여자로부터의 CD8⁺ T 세포를 상기 기재된 바와 같이, 이중성 NYESO- α 및 이중성 NYESO- β 를 포함하는 비-바이러스 DNA 구축물로 전기천공하였다. 전기천공 후 4일째, 세포를 통합된 NYESO-특이적 TCR에 의해 인식되는 펩티드를 함유

하는 형광 표지된 MHC-텍스트라머로 염색하였다.

도 5는 이중성 NYESO TCR로 전기천공된 $CD8^+$ 세포의 FACS 분석이다. 세포를 도 3 및 4에서와 같이 처리하였고, NYESO MHC-텍스트라머를 이용한 항원 특이적 염색 대비로 (모든 잠재적 인간 TCR에 결합하는 항체를 이용한) TCR 발현에 대한 염색을 추가로 수행하였다. 내인성 TCR의 상동성 지정 대체가 없는 대부분의 T 세포에서, TRAC 엑손 1 gRNA에 의한 커팅 및 비-상동성 말단 연결에 의한 작은 삽입 결실 돌연변이 (indel)의 도입에 기인하여 내인성 TCR은 녹아아웃되었다. 예상대로, NYESO 양성 세포는 거의 모두 TCR 발현에 대해서도 양성이었다.

도 6a는 시험관내 세포 사멸 검정법에서 이중성 NYESO TCR을 함유하는 1차 인간 T 세포가 암 세포를 사멸시킨다는 것을 제시한다.

도 6b는 사멸시키는, 이중성 NYESO TCR을 함유하는 인간 T 세포를 사용하는 시험관내 세포 사멸 검정법으로부터의 단일 시점으로부터의 결과를 제시한다.

도 7a-f는 비-바이러스 TCR 대체가 이루어진 T 세포의 생체내 기능성을 제시한다. (a) 생체내 인간 항원 특이적 종양 이중이식편 모델의 다이어그램. (b) 5×10^6 개 벌크 비-바이러스에 의해 표적화된 T 세포 전달 후 2일째 ($\sim 10\%$ TCR+ NYESO-1+, $\sim 10\%$ TCR+ NYESO-1-, 및 $\sim 80\%$ TCR- NYESO-1-), NY-ESO-1+ 비-바이러스에 의해 편집된 T 세포는 비장 대비 종양에 우선적으로 축적되었다. 4명의 인간 T 세포 공여자 각각에 대하여 마우스 $n=5$. (c) 5×10^6 개 벌크 비-바이러스에 의해 표적화된 CFSE 표지된 T 세포 전달 후 10일째, NYESO-1 TCR+ 세포는 TCR- 또는 TCR+NYESO-1- T 세포보다 더욱 큰 증식을 보였고, 비장에서보다 종양에서 더욱 큰 증식 (CFSE 낮음)을 보였다. 전달 후 10일째, 종양에서 TCR- 및 TCR+NYESO- T 세포를 찾기 어려웠다. (d) 도 8f에 요약된 데이터에 대한 종축 방향 종양 부피 트랙. (e, f) 본 실험에서, T 세포 전달 후 17일째 (d), 비-바이러스에 의해 TCR 대체된 세포는 더욱 큰 NY-ESO-1 TCR 발현 및 고갈 마커의 더 낮은 발현을 보이는 것으로 나타났다. 렌티바이러스에 의해 형질도입된 세포 및 비-바이러스 TCR 대체된 세포 전달 둘 다, 24일째 종양 부담의 유의적인 감소를 보였다. 본 실험 모델에서, 비-바이러스 TCR 대체는 렌티바이러스 형질도입과 비교하였을 때, 추가 감소를 보였다 (도 8f).

도 8a는 TCR 대체가 이루어진 $CD8^+$ T 세포에서의 항원-특이적 시토카인 생산 및 탈과립화를 제시한다.

도 8b는 TCR 대체가 이루어진 $CD8^+$ T 세포에 의한 항원-특이적 표적 세포 사멸을 제시한다.

도 8c는 종양 마우스 이중이식편 모델의 개략도이다.

도 8d는 입양 세포 요법을 위한 내인성 TCR의 비-바이러스 대체의 확장가능성을 제시한다.

도 8e는 생체내에서 NY-ESO-1 TCR+ T 세포가 종양으로 우선적으로 국재화된다는 것을 제시한다.

도 8f는 비-바이러스에 의해 또는 렌티바이러스에 의해 변형된 NY-ESO-1 TCR+ 또는 비히클 단독 (염수)의 입양 전달 후의 종양 성장을 제시한다. $n=2$ (a, b) 독립된 건강한 공여자, 여기서 기술상 삼중으로 수행된 것의 평균 및 표준 편차 (a, b). 5마리 (e) 또는 7마리의 마우스 (f)에서 $n=6$ (d) 또는 $n=2$ (e, f) 독립된 건강한 공여자, 여기서 평균 및 표준 편차 (d-f). $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ (홈-시닥(Holm-Sidak) 다중 비교 검정과 함께 2원 ANOVA).

도 9a는 게이팅된 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포에서의 NY-ESO-1 특이적 TCR의 레트로바이러스 전달 또는 비-바이러스 TCR 대체 이후의 TCR 쌍형성오류 분석을 제시한다. TCR의 레트로바이러스 전달과 비교하였을 때, 비-바이러스 TCR 대체를 통해 TCR 쌍형성오류는 감소된다. 신규 TCR의 바이러스에 의한 도입 시, 감염된 세포는 잠재적으로는 적어도 4개의 상이한 TCR (신규 TCR- α + 신규 TCR- β ; 신규 TCR- α + 내인성 TCR- β ; 내인성 TCR- α 및 신규 TCR- β ; 내인성 TCR- α + 내인성 TCR- β)을 발현하게 될 것이다. MHC-펩티드 다량체 (NYSEO)를 포함하는 신규의 도입된 TCR (VB13.1)에서의 특이적인 베타 쇄에 대한 염색은 잠재적인 쌍형성에 오류가 있는 TCR들 (VB13.1+ NYESO-; 내인성 TCR- α + 신규 TCR- β) 중 하나를 주로 발현한 세포 대비로 도입된 TCR (VB13.1+ NYESO+; 신규 TCR- α + 신규 TCR- β)을 주로 발현한 세포 사이의 구별에 의해 TCR 쌍형성오류의 대략적인 예측 값을 제공할 수 있다.

도 9b-9c는 전체 신규 TCR의 TRAC로의 표적화 (도 9b, 또는 가능하게는 TCR- β 의 멀티플렉스화된 녹아웃), 전체 신규 TCR의 *TRBC1/2*로의 표적화 (도 9c)에 의한 TCR 대체, 또는 *TRAC*로의 신규 TCR- α 및 *TRBC1/2*로의 신규 TCR- β 를 이용한 멀티플렉스화된 대체를 제시한다.

도 9d는 기능성 시토카인 생산이, 게이팅된 CD8+ T 세포와 유사하게 게이팅된 CD4+ T 세포에서 항원 노출 후 선택적으로 관찰되었다는 것을 제시한다 (도 8a).

도 9e는 6명의 건강한 혈액 공여자로 이루어진 코호트에 걸쳐 CD8+ 및 CD4+ T 세포 둘 다에서 전기천공 후 4일째에 비-바이러스 TCR 대체가 일관되게 관찰되었다는 것을 제시한다.

도 9f는 추가로 6명의 건강한 혈액 공여자로 이루어진 제2 코호트에서, 각 공여자로부터의 1억개의 T 세포가 NY-ESO-1 TCR 대체 HDR 주형 및 온-타겟 gRNA/Cas9로 전기천공되었다 (도 8d)는 것을 제시한다. NY-ESO-1 TCR+인 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 백분율은 전기천공 후 확장 10일 동안에 걸쳐 일관된 것으로 나타났다.

도 9g는 비-바이러스 게놈 표적화 후 확장 10일 동안에 걸쳐, CD8+ T 세포가 CD4+ T 세포에 비해 증식상 약간의 이점을 나타내었다는 것을 제시한다.

도 9h는 명시된 흑색종 세포주와 명시된 분류된 T 세포 집단을 1:5 T 세포 대 암 세포 비로 공동-인큐베이션하였을 때의 결과를 제시한다. 공동-인큐베이션 후 72시간째, 자동 현미경 검사 (여기서 핵 RFP가 암 세포를 마킹함)에 의해 퍼센트 암 세포 전면생장률을 기록하였다. 레트로바이러스 형질도입에 의해, 또는 비-바이러스 녹인 내인성 TCR 대체에 의해, NY-ESO-1 항원 특이적 TCR을 발현하는 T 세포 둘 다, NY-ESO-1 및 HLA-A*0201 클래스 I MHC 대립유전자 둘 다를 발현하는 표적 암 세포주에서만 오직 강건한 표적 세포 사멸을 보였다.

도 9i는 NY-ESO-1+ HLA-A*0201+ A375 암 세포주의 표적 세포 사멸을 위한 온/오프 타겟 gRNA 및 온/오프 타겟 HDR 주형 매트릭스 사용 결과를 제시한다 (오프-타겟 gRNA 및 HDRT는 RAB11A-GFP 융합 단백질 녹인에 대해 특이적이었음). 온-타겟 gRNA 뿐만 아니라, 온-타겟 HDR 주형 둘 다를 갖는 세포만이 표적 세포 사멸을 보였다.

도 9j는 벌크 T 세포 편집된 집단으로부터의 분류된 NY-ESO-1+ TCR+ 세포 (온-타겟 gRNA, 온-타겟 HDR 주형)가 표적 암 세포 사멸에 대하여 강력한 용량 반응 효과를 나타내었다는 것을 제시한다. 48시간 이내에 2:1 및 그 초과 T 세포 대 암 세포 비가 표적 암 세포의 거의 완전한 사멸을 보였다. 144시간까지, 1:16 미만의 T 세포 대 암 세포 비는 강건한 표적 세포 사멸의 증거를 보여주었다.

도 9k는, 비-바이러스 TCR 대체 후 유세포 분석법에 의해 관찰된 바, 비-바이러스 TCR 대체 T 세포에 의한 표적 세포 사멸은 특이적으로 NY-ESO-1-인식 TCR+ 세포 집단에 기인하였다는 것을 제시한다. 벌크 편집된 T 세포 집단을 시작으로 (이들 모두 온-타겟 gRNA 및 HDR 주형으로 전기천공된 것임), 본 발명자들은 별개로 3개의 세포 집단을 분류하였다: NY-ESO-1+TCR+ 세포 (비-바이러스에 의해 대체된 TCR), NY-ESO-1-TCR- 세포 (TCR 녹아웃) (회색), 및 NY-ESO-1-TCR+ 세포 (그의 천연 TCR은 유지하였지만, NY-ESO 특이적 녹인 TCR은 갖지 않은 것). 오직 분류된 NY-ESO-1+ TCR+ 집단만이 표적 세포 사멸을 보였다 (4:1 T 세포 대 암 세포 비). n=2 (a,d) 또는 n=3 (b,c) 독립된 건강한 공여자로부터 1명의 대표적인 공여자, 여기서 기술상 삼중으로 수행된 것의 평균 및 표준 편차 (d). n=6 독립된 건강한 공여자의 평균 및 표준 편차 (e,f) 또는 n=2 독립된 건강한 공여자에 대한 기술상 4회에 걸쳐 반복 수행된 것의 평균 및 표준 편차 (i-k)가 제시되어 있다. n=2 독립된 건강한 공여자에 대한 평균 및 개별 값 (h).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 정의

[0030] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 달리 명백하게 지시되지 않는 한, 복수의 지칭대상을 포함한다.

[0031] "핵산" 또는 "뉴클레오타이드"라는 용어는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 달리 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 자연적으로 발생된 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열 뿐만 아니라, 명백하게 명시된 서열을 암시적으로 포함한다. 구체적으로, 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 생성함으로써 축중성 코돈 치환이 달성될 수 있다 ([Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)]; 및 [Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]).

[0032] "유전자"라는 용어는 폴리펩티드 쇄를 생산하거나, 또는 그를 코딩하는데 관여하는 DNA의 세그먼트를 지칭할 수

있다. 이는 코딩 영역의 선행 및 후속 영역 (리더 및 트레일러) 뿐만 아니라, 개별 코딩 세그먼트 (엑손) 사이의 개입 서열 (인트론)을 포함할 수 있다. 대안적으로, "유전자"라는 용어는 비-번역된 RNA, 예컨대 rRNA, tRNA, 가이드 RNA (예를 들어, 단일 가이드 RNA), 또는 마이크로 RNA를 생산하거나, 또는 그를 코딩하는데 관여하는 DNA 세그먼트를 지칭할 수 있다.

[0033] "치료하는"이란, 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터, 예컨대 완해; 차도; 증상의 감소 또는 질환 상태를 환자가 더 견딜 수 있게 하는 것; 변성 또는 감퇴 속도 저속화; 또는 변성의 최종 지점을 덜 쇠약하게 만드는 것을 비롯한, 질환, 병태 또는 장애의 치료 또는 호전 또는 예방에 있어서의 임의의 성공 지표를 지칭한다.

[0034] "프로모터"는 핵산의 전사를 지시하는 하나 이상의 핵산 제어 서열로서 정의된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 프로모터는 전사의 출발 부위 근처에 필요한 핵산 서열, 예컨대, 폴리머라제 II형 프로모터의 경우, TATA 요소를 포함한다. 프로모터는 또한 임의적으로, 원위 인핸서 또는 리프레서 요소를 포함하며, 이는 전사의 출발 부위로부터 수천개 정도로 많은 염기 쌍에 위치할 수 있다.

[0035] 핵산은, 핵산이 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되어 있을 때, "작동가능하게 연결"되어 있는 것이다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는 그가 서열의 전사에 영향을 준다면, 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 것이거나; 또는 리보솜 결합 부위는 그가 번역을 촉진시키도록 배치되어 있다면, 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 것이다.

[0036] "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 상기 용어는 전장 단백질을 비롯한, 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결된 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.

[0037] 본원에서 사용되는 바와 같이, "상보적" 또는 "상보성"이라는 용어는 뉴클레오티드 또는 핵산 사이의 특이적 염기 쌍형성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 및 제한 없이, 가이드 RNA와 TRAC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 사이의 염기 쌍형성이 기재된다. 상보적 뉴클레오티드는 일반적으로 A 및 T (또는 A 및 U), 및 G 및 C이다. 본원에 기재된 가이드 RNA는 T 세포에서 TRAC 유전자의 엑손 1 내의 게놈 서열에 완벽하게 상보적 또는 실질적으로 상보적인 (예를 들어, 1-4개의 미스매치를 갖는) 서열, 예를 들어, DNA 표적화 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, 대상체란 개체를 의미할 수 있다. 예를 들어, 대상체는 포유동물, 예컨대 영장류, 및 더욱 구체적으로 인간이다. 상기 용어는 특정 연령 또는 성별을 지시하지는 않는다. 따라서, 남성이든 또는 여성이든 상관 없이, 성인 및 신생아 대상체가 포함되는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 환자 또는 대상체는 상호교환적으로 사용될 수 있고, 질환 또는 장애를 앓는 대상체를 지칭할 수 있다.

[0039] "CRISPR/Cas" 시스템은 외래 핵산에 대항한 방어를 위한 광범위한 부류의 박테리아 시스템을 지칭한다. CRISPR/Cas 시스템은 광범위한 유박테리아 및 고세균 유기체에서 발견된다. CRISPR/Cas 시스템은 타입 I, II 및 III 서브타입을 포함한다. 야생형 타입 II CRISPR/Cas 시스템은 외래 핵산을 인식하고 절단하기 위해 가이드 및 활성화 RNA와 복합체화되는 RNA-매개 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9를 이용한다. 가이드 RNA 및 활성화 RNA 둘 다의 활성을 갖는 가이드 RNA도 또한 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 경우에서, 상기 이중 활성 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA (sgRNA)로서 지칭된다.

[0040] Cas9 상동체는 하기 분류학 군의 박테리아를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 광범위한 유박테리아에서 발견된다: 악티노박테리아(*Actinobacteria*), 아쿠이피카에(*Aquificae*), 박테로이데테스-클로로비(*Bacteroidetes-Chlorobi*), 클라미디아에-베루코마이ক্র로비아(*Chlamydiae-Verrucomicrobia*), 클로로플렉시(*Chloroflexi*), 시아노박테리아(*Cyanobacteria*), 피르미쿠테스(*Firmicutes*), 프로테오박테리아(*Proteobacteria*), 스피로카에테스(*Spirochaetes*) 및 써모토가에(*Thermotogae*). 예시적인 Cas9 단백질은 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질이다. 추가의 Cas9 단백질 및 그의 상동체는, 예를 들어, 문헌 [Chylinski, *et al.*, RNA Biol. 2013 May 1; 10(5): 726-737; Nat. Rev. Microbiol. 2011 June; 9(6): 467-477]; [Hou, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24; 110(39):15644-9]; [Sampson *et al.*, Nature. 2013 May 9; 497(7448):254-7]; 및 [Jinek, *et al.*, Science. 2012 Aug 17; 337(6096):816-21]에 기재되어 있다. 본원에 제공된 Cas9 뉴클레아제 중 임의의 변이체는 숙주 세포에서 효율적인 활성 또는 증강된 안정성을 위해 최적화될 수 있다. 따라서, 조작된 Cas9 뉴클레아제가 또한 고려된다.

[0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, "Cas9"라는 용어는 RNA-매개 뉴클레아제 (예를 들어, 박테리아 또는 고세균 기원의 것, 또는 그로부터 유래된 것)를 지칭한다. 예시적인 RNA-매개 뉴클레아제로는 상기 Cas9 단백질 및 그의

상동체를 포함한다. 다른 RNA-매개 뉴클레아제로는 Cpf1 (예를 들어, 문헌 [Zetsche *et al.*, Cell, Volume 163, Issue 3, p759-771, 22 October 2015] 참조) 및 그의 상동체를 포함한다. 유사하게, 본원에서 사용되는 바와 같이, "Cas9 리보핵단백질" 복합체라는 용어 등은 Cas9 단백질과 crRNA (예를 들어, 가이드 RNA 또는 단일 가이드 RNA)의 복합체, Cas9 단백질과 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA)의 복합체, Cas9 단백질과 가이드 RNA의 복합체, 또는 그의 조합 (예를 들어, Cas9 단백질, tracrRNA 및 crRNA-가이드 RNA를 함유하는 복합체)을 지칭한다. 본원에 기재된 실시양태 중 임의의 것에서, Cas9 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제로 치환될 수 있다는 것을 이해한다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, 세포의 게놈의 편집의 맥락에서 "편집"이라는 어구는 표적 게놈 영역에서 게놈의 서열에 있어서의 구조적 변화를 유도하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 편집은 뉴클레오티드 서열을 세포의 게놈 내로 삽입하는 형태를 취할 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩할 수 있다. 상기 편집은 표적 게놈 영역 내에서 이중 가닥 과단, 또는 반대 가닥 상의 한 쌍의 단일 가닥 Nick을 유도하고, 표적 게놈 영역을 플랭킹함으로써 수행될 수 있다. 표적 게놈 영역에서 또는 표적 게놈 영역 내에서 단일 또는 이중 가닥 과단을 유도하는 방법은 표적 게놈 영역으로 지시되는 Cas9 뉴클레아제 도메인 또는 그의 유도체, 및 가이드 RNA 또는 가이드 RNA 쌍의 사용을 포함한다.

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산, 또는 핵산을 포함하는 복합체, 예를 들어, RNP-DNA 주형 복합체를 도입하는 맥락에서 "도입하는"이라는 어구는 세포 외부에서 세포 내부로의 핵산 서열 또는 the RNP-DNA 주형 복합체의 전위를 지칭한다. 일부 경우에서, 도입하는이란, 세포 외부에서 세포의 핵 내부로의 핵산 또는 복합체의 전위를 지칭한다. 전기천공, 나노와이어 또는 나노튜브와의 접촉, 수용체 매개 내재화, 세포 침투 펩티드를 통한 전위, 리포솜 매개 전위 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 상기 전위의 다양한 방법이 고려된다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이종성"이라는 어구는 인간 T 세포에서 자연적으로는 발견되지 않는 핵산 서열 또는 폴리펩티드를 지칭한다. "이종성 서열"이라는 용어는 자연상 주어진 T 세포에서는 보통 발견되지 않는 서열을 지칭한다. 따라서, 이종성 뉴클레오티드 또는 단백질 서열은 (a) 그의 숙주 세포에 대해 외래일 수 있거나 (즉, 세포에 대해 외인성이거나); (b) 숙주 세포에서 자연적으로 발견되지만 (즉, 내인성이지만), 세포에서 비자연적인 양 (즉, 숙주 세포에서 자연적으로 발견되는 양보다 더 많거나 더 적은 양)으로 존재할 수 있거나; 또는 (c) 숙주 세포에서 자연적으로 발견되지만, 그의 천연 로커스를 벗어나 위치할 수 있다.

[0045] 본원에서 사용되는 바와 같이, 1차 세포와 관련하여 "1차"라는 어구는 형질전환되지 않거나, 또는 불멸화되지 않은 세포를 지칭한다. 상기 1차 세포는 제한된 횟수만큼 배양, 계대배양 또는 계대접종될 수 있다 (예를 들어, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20회 배양). 일부 경우에서, 1차 세포는 시험관내 배양 조건에 맞도록 적합화된다. 일부 경우에서, 1차 세포는 유기체, 시스템, 기관 또는 조직으로부터 단리되고, 임의적으로 분류되고, 배양 또는 계대배양 없이 직접 사용된다. 일부 경우에서, 1차 세포는 자극, 활성화 또는 분화된다. 예를 들어, 1차 T 세포는 CD3, CD28 효능제, IL-2, IFN- γ 또는 그의 조합과의 접촉 (예를 들어, 그의 존재 하에서의 배양)에 의해 활성화될 수 있다.

[0046] 본원에서 사용되는 바와 같이, "T 세포"라는 어구는 T 세포 수용체 분자를 발현하는 림프계 세포를 지칭한다. T 세포는 인간 알파 베타 ($\alpha\beta$) T 세포 및 인간 감마 델타 ($\gamma\delta$) T 세포를 포함한다. T 세포는 나이브 T 세포, 자극된 T 세포, 1차 T 세포 (예를 들어, 배양되지 않은 T 세포), 배양된 T 세포, 불멸화된 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 자연 살해 T 세포, 그의 조합, 또는 그의 하위 집단을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. T 세포는 CD4⁺, CD8⁺, 또는 CD4⁺ 및 CD8⁺일 수 있다. T 세포는 헬퍼 세포, 예를 들어, T_H1, T_H2, T_H3, T_H9, T_H17, 또는 T_{PH} 유형의 헬퍼 세포일 수 있다. T 세포는 세포독성 T 세포일 수 있다. 조절 T 세포는 FOXP3⁺ 또는 FOXP3⁻일 수 있다. T 세포는 알파/베타 T 세포 또는 감마/델타 T 세포일 수 있다. 일부 경우에서, T 세포는 CD4⁺CD25^고CD127^저 조절 T 세포일 수 있다. 일부 경우에서, T 세포는 1형 조절 (Tr1), T_H3, CD8+CD28⁻, Treg17, 및 Qa-1 제한된 T 세포, 또는 그의 조합 또는 하위 집단으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조절 T 세포이다. 일부 경우에서, T 세포는 FOXP3⁺ T 세포이다. 일부 경우에서, T 세포는 CD4⁺CD25^저CD127^고 이펙터 T 세포이다. 일부 경우에서, T 세포는 CD4⁺CD25^저CD127^고CD45RA^고CD45RO⁻ 나이브 T 세포이다. T 세포는 유전적으로 조작된 재조합 T 세포일 수 있다. 일부 경우에서, 재조합 T 세포는 재조합 (예를 들어, 이종성) T 세포 수용체를 갖는다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같이, "TCR 수용체"라는 용어는 항원에 대한 반응으로 T 세포의 활성화에서 작용하는 2

개의 TCR 서브유닛 쇠 (예를 들어 TCR- α 및 TCR- β , TCR γ 및 TCR δ)로 이루어진 이중이량체이다. T 세포에서 발현되었을 때, TCR 수용체의 각 TCR 서브유닛 쇠는 TCR 서브유닛 쇠를 세포막에 부착시키는 불변 영역, 및 예를 들어, 제1 TCR 서브유닛 쇠 (예를 들어, TCR- α) 및 제2 TCR 서브유닛 쇠 (예를 들어, TCR- β) 쇠가 이중이량체 TCR 수용체를 형성할 때, 항원 인식 및 결합에서 작용하는 가변 영역을 함유한다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, "비-상동성 말단 연결" 또는 NHEJ라는 용어는 DNA 가닥의 커팅된 또는 닉킹된 말단이 상동 주형 핵산을 필요로 하지 않으면서, 직접 라이게이션되는 세포성 프로세스를 지칭한다. NHEJ는 복구 부위에서 하나 이상의 뉴클레오타이드의 부가, 결실, 치환 또는 그의 조합으로 이어질 수 있다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, "상동성 지정 복구" 또는 HDR라는 용어는 DNA 가닥의 커팅된 또는 닉킹된 말단이 상동성 주형 핵산으로부터의 중합에 의해 복구되는 세포성 프로세스를 지칭한다. 따라서, 원래 서열은 주형의 서열로 대체된다. 상동성 주형 핵산은 게놈 내의 다른 곳 (자매 염색분체, 상동성 염색체, 또는 동일하거나 상이한 염색체 상의 반복된 영역)에 있는 상동성 서열에 의해 제공될 수 있다. 대안적으로, 외인성 주형 핵산을 도입하여, 표적 부위에서 서열의 특이적 HDR-유도된 변이를 수득할 수 있다. 이러한 방식으로, 특이적 돌연변이가 커팅 부위에 도입될 수 있다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단일 가닥 DNA 주형 또는 이중 가닥 DNA 주형은 예를 들어, HDR에 의한 T 세포의 게놈을 편집하기 위한 주형으로서 세포에 의해 사용될 수 있는 DNA 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 일반적으로, 단일 가닥 DNA 주형 또는 이중 가닥 DNA 주형은 표적 부위에 대해 적어도 하나의 상동성 영역을 갖는다. 일부 경우에서, 단일 가닥 DNA 주형 또는 이중 가닥 DNA 주형은 표적 커팅 부위 또는 삽입 부위에 삽입되는 이중성 서열을 함유하는 영역을 플랭킹되는 2개의 상동성 영역, 예를 들어, 5' 말단 및 3' 말단을 갖는다.

[0051] 본 발명의 상세한 설명

[0052] 하기 설명은 본 발명의 조성물 및 방법의 다양한 측면 및 실시양태를 언급한다. 특별한 실시양태가 상기 조성물 및 방법의 범주를 정의하도록 의도되지 않는다. 오히려, 그러한 실시양태는 적어도 개시된 조성물 및 방법의 범주 내에 포함되는 다양한 조성물 및 방법의 비-제한적인 예를 제공할 뿐이다. 본 설명은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 관점에서 판독되어야 하는 바; 통상의 기술자에게 널리 공지된 정보가 반드시 포함되는 것은 아니다.

[0053] 본원에서는 인간 T 세포의 게놈을 편집하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 이중성 TCR이 T 세포의 게놈 중 표적화된 영역 내로 삽입될 수 있고, 이로써, 이중성 TCR은 내인성 TCR 프로모터의 제어 하에 있게 된다는 것을 본 발명자들은 발견하게 되었다. 본원에 제공된 방법 및 조성물을 사용하여 원하는 항원 특이성을 갖는 변형된 T 세포를 제조할 수 있다. 이러한 변형된 T 세포는 대상체에서 예를 들어, 암, 자가면역 질환 또는 감염을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0054] 일부 실시양태에서, 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역 및 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열은 T 세포의 게놈 중 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역 및 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열은 T 세포의 게놈 중, TRBC 유전자의 엑손 1 내로, 예를 들어, TRBC1 또는 TRBC2의 엑손 1 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 상동성 지정 복구를 통해, 또는 다르게는 본원에 기재된 바와 같이 도입된다.

[0055] 일부 실시양태에서, (a) T 세포 수용체의 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 (b) 항원 특이적 T 세포 수용체의 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역을 코딩하는 제2 핵산 서열은 각각 TRAC 유전자의 엑손 1 및 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 상동성 지정 복구를 통해, 또는 다르게는 본원에 기재된 바와 같이 도입된다.

[0056] 변형된 인간 T 세포를 제조하는 방법

[0057] T 세포의 게놈을 편집하는 방법은 인간 T 세포에서 T 세포 수용체 (TCR)-서브유닛 불변 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로 핵산 서열 또는 구축물을 삽입하는 것을 포함하는 인간 T 세포의 게놈을 편집하는 방법을 포함한다. 핵산 구축물은 순차적으로 N-말단에서 C-말단으로, TCR 서브유닛 쇠가 TCR 서브유닛 쇠의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 것인 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠, 및 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇠의 가변 영역을 코딩한다. 구축물은 추가로 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠의 가변 영역에 선행하는 제1 자기-절단 펩티드, 및 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠와 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇠 사이의 제2 자기-절단 펩티드를 코딩한다. 일부 방법에서, 내인성 TCR 서브유닛이 TCR-알파 (TCR- α) 서브유닛인 경우, 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠는 이중성 TCR-베타 (TCR- β) 서브유닛 쇠이고, 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇠는 이중성 TCR- α 서브유닛 쇠이다. 일부 방법에서, 내

인성 TCR 서브유닛이 TCR- β 서브유닛인 경우, 제1 이중성 TCR 서브유닛쇄는 이중성 TCR- α 서브유닛쇄이고, 제2 이중성 TCR 서브유닛쇄는 이중성 TCR- β 서브유닛쇄이다.

[0058]

일부 실시양태에서, TCR 서브유닛쇄의 가변 영역을 코딩하는 핵산 구축물 또는 서열은 TCR 서브유닛쇄를 코딩하는 핵산 구축물 또는 서열, 즉, TCR 서브유닛쇄, 예를 들어, 전장 TCR 서브유닛쇄의 가변 영역 및 불변 영역을 코딩하는 핵산이다. 일부 예에서, 핵산은 전장 TCR- α , TCR- β , TCR- γ , 또는 TCR- δ 서브유닛쇄를 코딩한다. 일부 예에서, 핵산 구축물 또는 서열은 제1 이중성 TCR 서브유닛쇄 (예를 들어, 전장 TCR 서브유닛쇄) 및 제2 이중성 TCR 서브유닛쇄의 가변 영역을 코딩한다. 일부 예에서, 제1 및 제2 이중성 TCR 서브유닛쇄는 상이한 것이다. 일부 예에서, 핵산 구축물은, N-말단에서 C-말단으로, 이중성, 전장 TCR- β 서브유닛쇄 및 이중성 TCR- α 서브유닛쇄의 가변 영역을 코딩한다. 다른 예에서, 핵산 구축물은, N-말단에서 C-말단으로, 이중성, 전장 TCR- α 서브유닛쇄 및 이중성 TCR- β 서브유닛쇄의 가변 영역을 코딩한다.

[0059]

T 세포의 게놈을 편집하는 방법은 인간 T 세포에서 TCR- α 서브유닛 (TRAC) 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로 핵산 서열 또는 구축물을 삽입하는 것을 포함하는 인간 T 세포의 게놈을 편집하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 영역은 TRAC 유전자의 불변 도메인의 엑손 1에 존재한다. 다른 실시양태에서, 표적 영역은 TCR- α 막형단 도메인을 코딩하는 서열 출발점 앞의 엑손 1, 엑손 2 또는 엑손 3에 존재한다. 핵산 구축물은 순차적으로, N-말단에서 C-말단으로, 이중성 T 세포 수용체 (TCR)- β 쇄의 가변 영역, 이어서, 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역을 코딩한다. 구축물은 추가로 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역에 선행하는 제1 자기-절단 펩티드, 및 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역과 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 사이의 제2 자기-절단 펩티드를 코딩한다. 구축물은 추가로 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역 뒤의 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다. TRAC 유전자 중 삽입 부위에 의존하여, 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 크기는 달라질 수 있다. 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 크기는 TRAC 엑손 1의 출발점과 표적화된 삽입 부위 사이의 내인성 TRAC 핵산 서열 중 뉴클레오타이드 개수에 의존하게 될 것이다. 예를 들어, TRAC 엑손 1의 출발점과 삽입 부위 사이의 뉴클레오타이드 개수는 25개의 뉴클레오타이드였기 때문에, 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단을 코딩하는 25개의 뉴클레오타이드가 구축물 내에 포함된, 도 1a를 참조한다. 유사하게, TRAC 엑손 1의 출발점과 삽입 부위 사이의 뉴클레오타이드 개수가 25개 미만 또는 25개 초과 사이의 뉴클레오타이드인 경우, 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 25개 미만 또는 25개 초과 뉴클레오타이드의 핵산이 구축물 내에 존재할 수 있다. 일부 예에서, 핵산 구축물은, N-말단에서 C-말단으로, 제1 자기-절단 펩티드 서열, 이중성 (즉, 가변 영역 및 불변 영역) TCR- β 서브유닛쇄 (예를 들어, 전장 TCR- β 서브유닛쇄), 제2 자기-절단 펩티드 서열, 이중성 TCR- α 서브유닛쇄의 가변 영역 및 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다. 예시적인 구축물은 도 1a에 제시된 것을 포함한다.

[0060]

T 세포의 게놈을 편집하는 방법은 또한 인간 T 세포에서 TCR- β 서브유닛 (TRBC) 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역 내로 핵산 서열 또는 구축물을 삽입하는 것을 포함하는 인간 T 세포의 게놈을 편집하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 영역은 TRBC1 또는 TRBC2 유전자의 엑손 1에 존재한다. 핵산 구축물은 순차적으로 N-말단에서 C-말단으로, 이중성 T 세포 수용체 (TCR)- α 쇄의 가변 영역, 이어서, 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역을 코딩한다. 구축물은 추가로 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역에 선행하는 제1 자기-절단 펩티드, 및 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역과 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 사이의 제2 자기-절단 펩티드를 코딩한다. 구축물은 추가로 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역 뒤의 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다. TRBC1 또는 TRBC2 중 삽입 부위에 의존하여, 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 크기는 달라질 수 있다. 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 크기는 TRBC1 또는 TRBC2 TRBC의 엑손 1의 출발점과 표적화된 삽입 부위 사이의 내인성 TRBC 핵산 서열 중 뉴클레오타이드 개수에 의존하게 될 것이다. 예를 들어, TRBC 엑손 1의 출발점과 삽입 부위 사이의 뉴클레오타이드 개수는 25개의 뉴클레오타이드였기 때문에, 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단을 코딩하는 25개의 뉴클레오타이드가 구축물 내에 포함된, 도 1b를 참조한다. 유사하게, TRBC1 또는 TRBC2 엑손 1의 출발점과 삽입 부위 사이의 뉴클레오타이드 개수가 25개 미만 또는 25개 초과 사이의 뉴클레오타이드인 경우, 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 25개 미만 또는 25개 초과 뉴클레오타이드의 핵산이 구축물 내에 존재할 수 있다. 일부 예에서, 핵산 구축물은, N-말단에서 C-말단으로, 제1 자기-절단 펩티드, 이중성 (즉, 가변 영역 및 불변 영역) TCR- α 서브유닛쇄 (예를 들어, 전장 TCR- α 서브유닛쇄), 제2 자기-절단 펩티드, 이중성 TCR- β 서브유닛쇄의 가변 영역 및 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다. 예시적인 구축물은 도 1b에 제시된 것들을 포함한다.

[0061]

자기-절단 펩티드의 예는 자기-절단 바이러스 2A 펩티드, 예를 들어, 돼지 테스코바이러스-1 (P2A) 펩티드, 토세아 아시그나 바이러스 (Thosea asigna virus) (T2A) 펩티드, 말 비염 A 바이러스 (E2A) 펩티드, 또는 구체적

바이러스 (F2A) 펩티드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 자기-절단 2A 펩티드를 통해 단일 구축물로부터 다중 유전자 생성물을 발현할 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Chng et al. "Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells," *Mabs* 7(2): 403-412 (2015)] 참조). 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 자기-절단 펩티드는 동일한 것이다. 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 자기-절단 펩티드는 상이한 것이다.

[0062] 삽입 시, 제1 자기-절단 펩티드, 이중성 전장 TCR-β쇄, 제2 자기-절단 펩티드, TCR-α쇄의 가변 영역, 및 내인성 TCR-α서브유닛의 N-말단 부분을 상기 순서대로 코딩하는 구축물은 내인성 TCR-α프로모터 및 TCR-α조절 요소의 제어 하에 있게 된다. 일단, 구축물이 T 세포의 게놈 내로 및 내인성 TCR-α프로모터의 제어 하로 도입되고 나면, T 세포는 삽입된 구축물이 융합 폴리펩티드를 코딩하는 단일 mRNA 서열로 전사될 수 있도록 허용하는 조건 하에서 배양될 수 있다. 융합 폴리펩티드는 제1 자기-절단 펩티드, 이중성 전장 TCR-β쇄, 제2 자기-절단 펩티드, 이중성 전장 TCR-α쇄, 및 내인성 TCR-α서브유닛의 N-말단 부분을 상기 순서대로 포함한다.

[0063] 유사하게, TRBC1 또는 TRBC2에서의 삽입 시, 제1 자기-절단 펩티드, 이중성 전장 TCR-α쇄, 제2 자기-절단 펩티드, TCR-β쇄의 가변 영역, 및 내인성 TCR-β서브유닛의 N-말단 부분을 상기 순서대로 코딩하는 구축물은 내인성 TCR-β프로모터 및 TCR-β조절 요소의 제어 하에 있게 된다. 일단, 구축물이 T 세포의 게놈 내로 및 내인성 TCR-β프로모터의 제어 하로 도입되고 나면, T 세포는 삽입된 구축물이 융합 폴리펩티드를 코딩하는 단일 mRNA 서열로 전사될 수 있도록 허용하는 조건 하에서 배양될 수 있다. 융합 폴리펩티드는 제1 자기-절단 펩티드, 이중성 전장 TCR-α쇄, 제2 자기-절단 펩티드, 이중성 전장 TCR-β쇄, 및 내인성 TCR-β서브유닛의 N-말단 부분을 상기 순서대로 포함한다.

[0064] 구축물을 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 삽입함으로써 TRAC 유전자의 남은 엑손 (엑손 2 및 3)은 엑손 1과 함께 스플라이싱되어 최종 mRNA 서열이 된다. 상기 mRNA 서열의 번역 결과로, 3개의 별개의 폴리펩티드 서열, 즉, 막횡단 도메인이 결여된 불활성 내인성 가변 영역 펩티드 (이는 예를 들어, 소포체에서 분해될 수 있거나, 또는 번역 후 분비될 수 있음), 전장 이중성 항원-특이적 TCR-β쇄, 및 전장 이중성 항원-특이적 TCR-α쇄로 자기-절단되는 하나의 단백질로 발현된다 (도 1a 참조). 전장 항원 특이적 TCR-β쇄 및 전장 항원-특이적 TCR-α쇄는 원하는 항원-특이성을 갖는 TCR을 형성한다.

[0065] 유사하게, 구축물을 TRBC1/2 유전자의 엑손 1 내로 삽입함으로써 TRBC1/2 유전자의 남은 엑손 (엑손 2-4)은 엑손 1과 함께 스플라이싱되어 최종 mRNA 서열이 된다. 상기 mRNA 서열의 번역 결과로, 3개의 별개의 폴리펩티드 서열, 즉, 막횡단 도메인이 결여된 불활성 내인성 가변 영역 펩티드 (이는 예를 들어, 소포체에서 분해될 수 있거나, 또는 번역 후 분비될 수 있음), 전장 이중성 항원-특이적 TCR-β쇄, 및 전장 이중성 항원-특이적 TCR-α쇄로 자기-절단되는 하나의 단백질로 발현된다. 전장 항원 특이적 TCR-β쇄 및 전장 항원-특이적 TCR-α쇄는 원하는 항원-특이성을 갖는 TCR을 형성한다.

[0066] 대안적으로, 이중성 TCR-α쇄 코딩 서열, 예를 들어, TCR-α쇄의 가변 영역을 코딩하는 서열 및 이중성 TCR-β쇄 코딩 서열, 예를 들어, TCR-β쇄의 가변 영역을 코딩하는 서열은 T 세포의 게놈 내로 삽입되며, 여기서 이중성 TCR-α쇄는 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 삽입되고, 이중성 TCR-β쇄는 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 이중성 TCR-α쇄를 코딩하는 제1 핵산 서열 또는 구축물 및 이중성 TCR-β쇄를 코딩하는 제2 핵산 서열 또는 구축물은 TRAC 유전자의 엑손 1에 이중성 TCR-α쇄를, 및 TRBC 유전자의 엑손 1에 이중성 TCR-β쇄를 삽입하는데 사용된다.

[0067] 제1 및 제2 핵산 구축물을 사용하는 방법에서, 이중성 TCR-α쇄를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 표적 영역은 TRAC 유전자의 엑손 1에 있다. 일부 실시양태에서, 이중성 TCR-β쇄를 코딩하는 핵산의 삽입을 위한 표적 영역은 내인성 TRBC1 또는 TRBC2 프로모터의 하류에 있고, TRBC1 또는 TRBC 2 유전자의 엑손 1에 위치한다. 제1 핵산은 순차적으로 N-말단에서 C-말단으로, 제1 자기-절단 펩티드, 이어서, 이중성 TCR-α쇄, 이어서, 내인성 TCR-α서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다. 제2 핵산 구축물은 순차적으로 N-말단에서 C-말단으로, 제2 자기-절단 펩티드, 이어서, 이중성 TCR-β쇄를 코딩하는 핵산, 이어서, 내인성 TCR-β서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다. 예시적인 구축물은 도 2에 제시된 것을 포함한다.

[0068] 삽입 시, 제1 자기-절단 펩티드 및 이중성 TCR-α쇄를 상기 순서대로 코딩하는 제1 구축물은 내인성 TCR-α프로모터 및 TCR-α조절 요소의 제어 하에 있게 된다. 제2 자기-절단 펩티드 및 이중성 TCR-β쇄를 상기 순서대로 코딩하는 제2 구축물은 내인성 TCR-β프로모터 및 TCR-β조절 요소의 제어 하에 있게 된다. 일단, 구축물이 T 세포의 게놈 내로 및 내인성 TCR α 및 TCR-β프로모터의 제어 하로 도입되고 나면, T 세포는 제1 구축물

및 제2 구축물이 별개의 mRNA 서열로 전사될 수 있도록 허용하는 조건 하에서 배양된다. 구축물을 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 삽입함으로써 TRAC 유전자의 남은 엑손 (엑손 2 및 3)은 엑손 1과 함께 스플라이싱되어 전장 이중성 TCR- α 쇄를 코딩하는 최종 mRNA 서열이 된다. 유사하게, 제2 구축물이 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입함으로써 TRBC 유전자의 남은 엑손 (엑손 2 및 3)은 엑손 1과 함께 스플라이싱되어 전장 이중성 TCR- β 쇄를 코딩하는 mRNA 서열이 된다.

- [0069] 제1 자기-절단 펩티드 및 전장 이중성 TCR- α 쇄를 코딩하는 mRNA 서열의 번역 결과로, 막횡단 도메인이 결합된 불활성 내인성 가변 영역 펩티드 (이는 예를 들어, 소포체에서 분해될 수 있거나, 또는 번역 후 분비될 수 있음), 및 전장 이중성 항원-특이적 TCR- α 쇄가 발현된다. 제2 자기-절단 펩티드 및 전장 이중성 TCR- β 쇄를 코딩하는 mRNA 서열의 번역 결과로, 막횡단 도메인이 결합된 불활성 내인성 가변 영역 펩티드 (이는 예를 들어, 소포체에서 분해될 수 있거나, 또는 번역 후 분비될 수 있음), 및 전장 이중성 항원-특이적 TCR- β 쇄가 발현된다. 전장 이중성, 항원 특이적 TCR- β 쇄 및 전장 이중성, 항원-특이적 TCR- α 쇄는 원하는 항원-특이성을 갖는 TCR을 형성한다.
- [0070] 본원에 제공된 방법에서, 이중성 TCR- β 쇄의 가변 영역은 가변 (V), 다양성 (D) 및 연결 (J) 대립유전자를 포함한다. 본원에 제공된 방법에서, 이중성 TCR- α 쇄의 가변 영역은 V 및 J 대립유전자를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Kuby, J., *Immunology*, 7th Ed., W.H. Freeman & Co., New York (2013)]을 참조한다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 핵산을 포함하는 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터를 도입함으로써 T 세포의 게놈 내로 삽입된다. 바이러스 벡터의 예는 아데노 연관 바이러스 (AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 인테그라제 결핍 렌티바이러스 벡터이다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 핵산 서열은 비-바이러스 전달을 통해 T 세포의 게놈 내로 삽입된다. 비-바이러스 전달 방법에서, 핵산은 네이키드 DNA일 수 있거나, 또는 비-바이러스 플라스미드 또는 벡터 내에 존재할 수 있다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 핵산은 T 세포 내로 (a) TRAC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역을 절단하여 T 세포의 게놈에 삽입 부위를 생성하는 표적화된 뉴클레아제; 및 (b) HDR에 의해 삽입 부위 내로 도입되는 핵산 서열을 도입함으로써 T 세포 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 T 세포 내로 (a) TRBC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역을 절단하여 T 세포의 게놈에 삽입 부위를 생성하는 표적화된 뉴클레아제; 및 (b) HDR에 의해 삽입 부위 내로 도입되는 핵산 서열을 도입함으로써 T 세포 내로 삽입된다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 방법은 세포 내로, TRAC 유전자의 엑손 1의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 내로, TRBC 유전자의 엑손 1의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다.
- [0075] 제1 및 제2 핵산 서열을 사용하여 이중성 TCR- α 쇄 및 이중성 TCR- β 쇄를 각각 TRAC 유전자의 엑손 1 및 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입시키는 실시양태에서, 제1 및 제2 핵산은 T 세포 내로 (a) TRAC 유전자의 엑손 1 내의 제1 삽입 부위, 및 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 제2 삽입 부위를 생성하는 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제; (b) 제1 핵산 서열; 및 (c) 제2 핵산 서열을 도입함으로써 T 세포 내로 삽입된다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 내로, TRAC 유전자의 엑손 1의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA, 및 TRBC 유전자의 엑손 1의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 핵산 서열의 5' 및 3' 말단은 각각 T 세포의 게놈 중 표적 영역, 예를 들어, TRAC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역, 또는 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오티드 서열의 길이는 약 50 내지 300개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 경우에서, 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오티드 서열, 또는 그의 부분은 게놈 서열과 적어도 80%, 90%, 95% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열의 5' 및 3' 말단은 TRAC 유전자의 엑손 1 내의 삽입 부위에서 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열의 5' 및 3' 말단은 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 삽입 부위에 플랭킹되는 게놈 서열과 상동성인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0077] 일부 경우에서, 핵산 서열은 선형 DNA 주형으로서 세포 내로 도입된다. 일부 경우에서, 핵산 서열은 이중 가닥 DNA 주형으로서 세포 내로 도입된다. 일부 경우에서, DNA 주형은 단일 가닥 DNA 주형이다. 일부 경우에서, 단일 가닥 DNA 주형은 순수한 단일 가닥 DNA 주형이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "순수한 단일 가닥 DNA"란, DNA의 다른 또는 반대 가닥이 실질적으로 결합된 단일 가닥 DNA를 의미한다. "실질적으로

결여된"이란, 순수한 단일 가닥 DNA에는, DNA의 하나의 가닥이 또 다른 가닥보다 적어도 100배 더 결여된다는 것을 의미한다. 일부 경우에서, DNA 주형은 이중 가닥 또는 단일 가닥 플라스미드 또는 미니-서클(mini-circle)이다.

[0078] 일부 실시양태에서, 표적화된 뉴클레아제는 RNA-가이드된 뉴클레아제 도메인, 전사 활성인자-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) 및 메가TAL 로 이루어진 군으로부터 선택된다 (예를 들어, 문헌 [Merkert and Martin "Site-Specific Genome Engineering in Human Pluripotent Stem Cells," *Int. J. Mol. Sci.* 18(7): 1000 (2016)] 참조). 일부 실시양태에서, RNA-가이드된 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이고, 방법은 세포 내로 T 세포의 게놈 중 표적 영역, 예를 들어, TRAC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, RNA-가이드된 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이고, 방법은 세포 내로 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 가이드 RNA를 도입하는 것을 추가로 포함한다.

[0079] 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, 가이드 RNA (gRNA) 서열은 부위-특이적 또는 표적화된 뉴클레아제와 상호작용하고, 세포의 게놈 내의 표적 핵산에 특이적으로 결합하거나, 또는 그에 하이브리드화하고, 이로써, gRNA 및 표적화된 뉴클레아제는 세포의 게놈 중 표적 핵산에 공동 국제화되는 것인 서열이다. 각 gRNA는 게놈 중의 표적 DNA 서열에 특이적으로 결합하거나, 또는 그에 하이브리드화하며, 길이가 약 10 내지 50개의 뉴클레오타이드 길이인 DNA 표적화 서열 또는 프로토스페이서 서열을 포함한다. 예를 들어, DNA 표적화 서열의 길이는 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, gRNA는 crRNA 서열 및 트랜스활성화 crRNA (tracrRNA) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 tracrRNA 서열을 포함하지 않는다.

[0080] 일반적으로, DNA 표적화 서열은 DNA 서열에 상보성을 띠도록 (예를 들어, 완벽한 상보성을 띠도록), 또는 실질적으로 상보성을 띠도록 디자인된다. 일부 경우에서, DNA 표적화 서열은 다중 유전자 요소에 결합하기 위해 위블 또는 축중성 염기를 도입할 수 있다. 일부 경우에서, 결합 영역의 3' 또는 5' 말단의 19개의 뉴클레오타이드는 표적 유전자 요소 또는 요소들에 완벽하게 상보적이다. 일부 경우에서, 결합 영역은 안정성을 증가시키도록 변경될 수 있다. 예를 들어, 비천연 뉴클레오타이드는 분해에 대한 RNA 저항을 증가시키기 위해 도입될 수 있다. 일부 경우에서, 결합 영역은 결합 영역은 결합 영역에서의 2차 구조 형성을 막거나, 감소시키도록 변경 또는 디자인될 수 있다. 일부 경우에서, 결합 영역은 G-C 함량을 최적화시키도록 디자인될 수 있다. 일부 경우에서, G-C 함량은 바람직하게는 약 40% 내지 약 60% (예를 들어, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%)이다. 일부 실시양태에서, Cas9 단백질은 활성 엔도뉴클레아제 형태일 수 있고, 이로써, 가이드 RNA와의 복합체의 일부로서, 또는 DNA 주형과의 복합체의 일부로서 표적 핵산에 결합되었을 때, 이중 가닥 파단이 표적 핵산 내로 도입된다. 본원에 제공된 방법에서, Cas9 폴리펩티드 또는 Cas9 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 T 세포 내로 도입될 수 있다. 이중 가닥 파단은 DNA 주형을 T 세포의 게놈 내로 삽입시키기 위해 HDR에 의해 복구될 수 있다. 다양한 Cas9 뉴클레아제가 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA에 의해 표적화된 영역의 3' 바로 옆에 NGG 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)를 필요로 하는 Cas9 뉴클레아제가 사용될 수 있다. 상기 Cas9 뉴클레아제는 NGG 서열을 함유하는, TRAC의 엑손 1 또는 TRBC의 엑손 1 중의 영역으로 표적화될 수 있다. 또 다른 예로서, 오르토고날 PAM 모티프 요건을 갖는 Cas9 단백질을 사용하여 인접한 NGG PAM 서열을 갖지 않는 서열을 표적화할 수 있다. 오르토고날 PAM 서열 특이성을 갖는 예시적인 Cas9 단백질의 예는 문헌 [Esvelt *et al.*, *Nature Methods* 10: 1116-1121 (2013)]에 기재된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0081] 일부 경우에서, Cas9 단백질은 니카제이고, 이로써, 가이드 RNA와의 복합체의 일부로서 표적 핵산에 결합되었을 때, 단일 가닥 파단 또는 니이 표적 핵산 내로 도입된다. 각각이 구조적으로 상이한 가이드 RNA에 결합된, 한 쌍의 Cas9 니카제는 표적 게놈 영역의 2개의 근위 부위에 표적화될 수 있는 바, 이로써, 한 쌍의 근위 단일 가닥 파단을 표적 게놈 영역, 예를 들어, TRAC 유전자의 엑손 1, 또는 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 도입할 수 있다. 오프-타겟 효과가 단일 니클 초래할 가능성이 있기 때문에 니카제 쌍은 증진된 특이성을 제공할 수 있으며, 이러한 니클은 일반적으로, 염기 절제 복구 기전에 의해 병변 없이 복구된다. 예시적인 Cas9 니카제는 D10A 또는 H840A 돌연변이를 갖는 Cas9 뉴클레아제를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Ran *et al.* "Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity," *Cell* 154(6): 1380-1389 (2013)]).

[0082] 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제, 가이드 RNA 및 핵산 서열은 세포 내로 리보핵단백질 복합체 (RNP)-DNA 주형 복합체로서 도입되며, 여기서 RNP-DNA 주형 복합체는 (i) Cas9 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함하는 RNP; 및 (ii) 이중성 TCR-β쇄 및 이중성 TCR-α쇄를 코딩하는 DNA 주형으로서, HDR을 통해 TRAC 유전자의 엑손 1

내로 삽입되는 DNA 주형을 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제, 가이드 RNA 및 핵산 서열은 세포 내로 리보핵단백질 복합체 (RNP)-DNA 주형 복합체로서 도입되며, 여기서 RNP-DNA 주형 복합체는 (i) Cas9 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함하는 RNP; 및 (ii) 이중성 TCR- β 쇠 및 이중성 TCR- α 쇠를 코딩하는 DNA 주형으로서, HDR을 통해 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입되는 DNA 주형을 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 별개의 구축물을 사용하여 이중성 TCR- α 쇠를 T 세포에서 TRAC 유전자의 엑손 1 내로, 및 이중성 TCR- β 쇠를 T 세포에서 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입하는 경우, (a) 제1 RNP-DNA 주형 복합체는, (i) RNP가 Cas9 뉴클레아제, 및 TRAC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 제1 가이드 RNA를 포함하는 제1 RNP; 및 (ii) 이중성 TCR α 서브유닛을 코딩하는 DNA 주형을 포함하는 것인 제1 (RNP)-DNA 주형 복합체; 및 (b) 제2 RNP-DNA 주형 복합체는 (i) 제2 RNP가 Cas9 뉴클레아제, 및 TRBC 유전자의 엑손 1 내의 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화하는 제2 가이드 RNA를 포함하는 것인 제2 RNP; 및 (ii) 이중성 TCR β 서브유닛을 코딩하는 DNA 주형을 포함하는 것인 제2 (RNP)-DNA 주형 복합체가 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 제1 RNP-DNA 주형 복합체 중 Cas9 뉴클레아제 및 제2 RNP-DNA 주형 복합체 중 Cas9 뉴클레아제는 동일한 것이다. 일부 실시양태에서, 제1 RNP-DNA 주형 복합체 중 Cas9 뉴클레아제 및 제2 RNP-DNA 주형 복합체 중 Cas9 뉴클레아제는 상이한 것이다.

[0084] 일부 실시양태에서, RNP 대 DNA 주형의 몰비는 약 3:1 내지 약 100:1일 수 있다. 예를 들어, 몰비는 약 5:1 내지 10:1, 약 5:1 내지 약 15:1, 5:1 내지 약 20:1; 5:1 내지 약 25:1; 약 8:1 내지 약 12:1; 약 8:1 내지 약 15:1, 약 8:1 내지 약 20:1, 또는 약 8:1 내지 약 25:1일 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체 중 DNA 주형은 약 2.5 pM 내지 약 25 pM 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, DNA 주형의 양은 약 1 μ g 내지 약 10 μ g이다.

[0086] 일부 경우에서, RNP-DNA 주형 복합체는 약 20°C 내지 약 25°C의 온도에서 약 1분 미만 내지 약 30분 동안 RNP를 DNA 주형과 함께 인큐베이션함으로써 형성된다. 일부 실시양태에서, RNP-DNA 주형 복합체를 세포 내로 도입하기 전에 RNP-DNA 주형 복합체 및 세포를 혼합한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 핵산 서열 또는 RNP-DNA 주형 복합체를 전기천공에 의해 T 세포 내로 도입한다. RNP-DNA 주형 복합체를 도입하기 위해 세포를 전기천공하는 방법, 조성물, 및 장치는 본원 실시예에 기재된 것을 포함할 수 있다. RNP-DNA 주형 복합체를 도입하기 위해 세포를 전기천공하는 추가의 또는 대안적 방법, 조성물, 및 장치는 WO/2006/001614 또는 문헌 [Kim, J.A. *et al.* Biosens. Bioelectron. 23, 1353-1360 (2008)]에 기재된 것을 포함할 수 있다. RNP-DNA 주형 복합체를 도입하기 위해 세포를 전기천공하는 추가의 또는 대안적 방법, 조성물, 및 장치는 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0094095; 2005/0064596; 또는 2006/0087522에 기재된 것을 포함할 수 있다. RNP-DNA 주형 복합체를 도입하기 위해 세포를 전기천공하는 추가의 또는 대안적 방법, 조성물, 및 장치는 문헌 [Li, L.H. *et al.* Cancer Res. Treat. 1, 341-350 (2002)]; 미국 특허 번호 6,773,669; 7,186,559; 7,771,984; 7,991,559; 6,485,961; 7,029,916; 및 미국 특허 출원 공개 번호 2014/0017213; 및 2012/0088842에 기재된 것을 포함할 수 있다. RNP-DNA 주형 복합체를 도입하기 위해 세포를 전기천공하는 추가의 또는 대안적 방법, 조성물, 및 장치는 문헌 [Geng, T. *et al.* J. Control Release 144, 91-100 (2010)]; 및 [Wang, J., *et al.* Lab. Chip 10, 2057-2061 (2010)]에 기재된 것을 포함할 수 있다.

[0088] 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 RNP-DNA 주형 복합체를 포함하는 복수의 RNP-DNA 주형 복합체가 세포 내로 도입된다. 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "복수"라는 어구는 2개 이상인 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 RNP-DNA 주형 복합체는 구조적으로 상이한 가이드 RNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 구조적으로 상이한 RNP 복합체가 구조적으로 상이한 가이드 RNA를 함유하는 경우, 구조적으로 상이한 RNP 복합체는 각각 Cas9 니카제를 포함하고, 구조적으로 상이한 가이드 RNA는 표적 영역의 반대 가닥에 하이브리드화한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역 및 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역을 코딩하는 적어도 2개의 구조적으로 상이한 핵산이 T 세포의 집단 중 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 도입된다. 이러한 방식으로, 각 핵산 서열이 이중성 TCR- β 쇠 및 이중성 TCR- α 쇠의 고유한 조합을 코딩하는 것인 복수의 핵산 서열이 T 세포의 집단 내로 도입될 수 있다. 각 핵산 서열은 RNP-DNA 주형 복합체의 일부로서 세포 내로 도입될 수 있다.

[0090] 예를 들어, 표적화된 뉴클레아제는 복수의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과, 예를 들어, 2-10, 5-100, 20-100개), 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역 및 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역을 코딩하는 고유한 DNA 주형과 복합체를 형성할 수 있다. 복수의 복합체는 T 세포의 집단 내로 동시에 도입되어 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역

및 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역의 고유한 조합을 코딩하는 단일 DNA 주형을 개별 T 세포에서 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 삽입할 수 있다. 비록 각 T 세포는 전체 세포의 집단에 걸쳐 오직 단일 DNA 주형만을 획득하겠지만, 다수의 고유한 구조적으로 상이한 DNA 주형이 T 세포 내로 통합되어 이중성 TCR 서열 라이브러리를 생성하게 될 것이다.

[0091] 일부 실시양태에서, 별개의 구축물을 사용하여 이중성 TCR- α 쇠를 TRAC 유전자의 엑손 1 내로, 및 이중성 TCR- β 쇠를 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 삽입하는 경우, 제1 표적화된 뉴클레아제는 이중성 TCR- β 쇠의 가변 영역을 코딩하는 복수의 고유한 DNA 주형과 복합체를 형성하여 복수의 제1 RNP-DNA 주형 복합체를 형성할 수 있고, 제2 표적화된 뉴클레아제는 이중성 TCR- α 쇠의 가변 영역을 코딩하는 복수의 고유한 DNA 주형과 복합체를 형성하여 복수의 제2 RNP-DNA 주형 복합체를 형성할 수 있다. 제1 및 제2 복수의 복합체는 동시에 T 세포의 집단으로 도입되어 이중성 TCR 서열 라이브러리를 생성할 수 있다.

[0092] 이중성 T 세포 레퍼토리는 이전에 공지된 TCR 서열 뿐만 아니라, 관심 내인성 T 세포 집단에서 발견되는 천연 레퍼토리로부터 디자인되고, 생성될 수 있다. 예를 들어, TCR 서열은 종양 침윤 림프구로부터, 자가면역 질환의 부위에서의 자가반응성 T 세포로부터, 또는 병원체 반응성 T 세포로부터 수득된 TCR 서열일 수 있다.

[0093] 일부 실시양태에서, 핵산 서열 또는 RNP-DNA 주형 복합체는 약 1×10^5 내지 약 2×10^6 개 T 세포 내로 도입된다. 예를 들어, 핵산 서열 또는 RNP-DNA 주형 복합체는 약 1×10^5 개 세포 내지 약 5×10^5 개 세포, 약 1×10^5 개 세포 내지 약 1×10^6 개 세포, 1×10^5 개 세포 내지 약 1.5×10^6 개 세포, 1×10^5 개 세포 내지 약 2×10^6 개 세포, 약 1×10^6 개 세포 내지 약 1.5×10^6 개 세포, 또는 약 1×10^6 개 세포 내지 약 2×10^6 개 세포 내로 도입될 수 있다.

[0094] 본원에 제공된 방법 및 조성물에서, 인간 T 세포는 1차 T 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포, 이펙터 T 세포, 또는 나이브 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 $CD4^+CD8^+$ T 세포이다. 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 의해 변형된 세포 중 임의의 세포의 집단을 또한 제공한다. 세포는 시험관내, 생체외, 또는 생체내 존재할 수 있다. 일부 경우에서, T 세포는 대상체로부터 제거되고, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 사용하여 변형되고, 환자에게 투여된다.

[0095] 일부 실시양태에서, 변형된 T 세포는 이중성 TCR- β 쇠 및 이중성 TCR- α 쇠의 발현을 허용하는 조건 하에서 배양되어 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 형성한다. 다른 실시양태에서, T 세포는 변형된 세포의 집단을 확장시키는데 효과적인 조건 하에서 배양된다. 일부 실시양태에서, 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포는 정제된다.

[0096] 조성물

[0097] 본원에 제공된 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 인간 T 세포를 또한 제공한다. 본원에 제공된 방법 중 임의의 것에 의해 제조된 인간 T 세포의 집단을 또한 제공한다. 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과인 세포의 개체가 이중성 핵산의 표적화된 삽입을 포함하며, 여기서 핵산은 TRAC의 엑손 1 또는 TRBC의 엑손 1 내로 삽입되어 있는 것인, 복수의 인간 T 세포를 또한 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포, 이펙터 T 세포, 또는 나이브 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포는 $CD4^+CD8^+$ T 세포이다.

[0098] T 세포로서, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) TCR 서브유닛 쇠가 TCR 서브유닛 쇠의 불변 영역 및 가변 영역을 포함하는 것인 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠, (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇠의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 내인성 TCR 서브유닛이 TCR-알파 (TCR- α) 서브유닛인 경우, 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠는 이중성 TCR-베타 (TCR- β) 서브유닛 쇠이고, 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇠는 이중성 TCR- α 서브유닛 쇠이며, 여기서 내인성 TCR 서브유닛이 TCR- β 서브유닛인 경우, 제1 이중성 TCR 서브유닛 쇠는 이중성 TCR- α 서브유닛 쇠이고, 제2 이중성 TCR 서브유닛 쇠는 이중성 TCR- β 서브유닛 쇠인 T 세포를 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산 서열은, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열, (ii) 이중성 TCR- β 서브유닛 쇠, (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이중성 TCR- α 서브유닛 쇠의 가변 영역, 및 (v) 내인성 TCR- α 서브유닛 쇠의 N-말단 부분을 코딩한다. 일부 예에서, 핵산은, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열, (ii) 이중성 TCR- α 서브유닛 쇠, (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열, (iv) 이중성 TCR- β 서브유닛 쇠

의 가변 영역, 및 (v) 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩한다.

- [0099] 변형된 T 세포로서, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이종성 TCR- β 쇠의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이종성 TCR- α 쇠의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- α 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 통합되는 것인 변형된 T 세포를 또한 제공한다. 일부 예에서, 핵산은, N-말단에서 C-말단으로, 제1-자기-절단 펩티드 서열, 이종성 (예를 들어, 전장) TCR- β 서브유닛 쇠, 제2 자기-절단 펩티드 서열 및 이종성 TCR- α 서브유닛 쇠의 가변 영역을 코딩한다.
- [0100] 변형된 T 세포로서, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이종성 TCR- α 쇠의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이종성 TCR- β 쇠의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- β 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 통합되는 것인 변형된 T 세포를 또한 제공한다. 다른 예에서, 핵산은, N-말단에서 C-말단으로, 제1 자기-절단 펩티드 서열, 이종성 (예를 들어, 전장) TCR- α 서브유닛 쇠, 제2 자기-절단 펩티드 서열 및 이종성 TCR- β 서브유닛 쇠의 가변 영역을 코딩한다.
- [0101] 변형된 T 세포로서, N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 펩티드 서열; (ii) 이종성 TCR- β 쇠의 가변 영역; (iii) 제2 자기-절단 펩티드 서열; (iv) 이종성 TCR- α 쇠의 가변 영역; 및 (v) 내인성 TCR- γ 서브유닛의 N-말단 부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 TRGC 유전자의 엑손 1의 엑손 1 내로 통합되는 것인 변형된 T 세포를 또한 제공한다.
- [0102] 변형된 T 세포로서, a) N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 서열, (ii) 이종성 TCR- α 쇠의 가변 영역, 및 (iii) 내인성 TCR- α 쇠의 N-말단 부분을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 b) N-말단에서 C-말단으로, (i) 제1 자기-절단 서열, (ii) 이종성 TCR- β 쇠의 가변 영역, 및 (iii) 내인성 TCR- β 쇠의 N-말단 부분을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 여기서 제1 핵산 서열은 TRAC 유전자의 엑손 1 내로 통합되고, 제2 핵산 서열은 TRBC 유전자의 엑손 1 내로 통합되는 것인 변형된 T 세포를 추가로 제공한다.
- [0103] **치료 방법**
- [0104] 본원에 기재된 방법 및 조성물 중 임의의 것은 질환 (예를 들어, 대상체에서의 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 또는 다른 염증성 장애)을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다. 본원에 제공된 치료 방법에서, 예를 들어, 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 이식 거부를 일으킬 잠재성, 이식편 대 숙주 질환 또는 염증성 장애를 갖는 대상체에서 TCR의 TCR- α 또는 TCR- β 쇠를 포함하는 핵산 서열을 대상체에서 T 세포로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, TCR의 TCR- α 또는 TCR- β 쇠를 포함하는 핵산 서열을 수득하기 위해, 종양 침윤 림프구, 자가면역 부위에서의, 또는 병원체 반응성 림프구로부터의 T 세포를 대상체로부터 분리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자 샘플로부터 확인된 모노클로날 또는 폴리클로날 TCR 서열이 사용될 수 있다. 예를 들어, 종양 또는 염증 부위로부터의 TCR 레퍼토리를 수득할 수 있고, TCR 서열을 합성하고, 이를 DNA 주형으로서 사용함으로써 항원 특이성을 갖는 세포를 제조할 수 있다. 대안적으로, 대상체로부터의 클론/단일 세포로부터 서열을 증폭시키고, 예를 들어, PCR 증폭시킬 수 있고, 증폭된 서열을 DNA 주형으로서 사용할 수 있다. 일단 TCR의 TCR- α 및 TCR- β 쇠의 서열을 수득하고 나면, 이들 서열을 대상체 중의 또는 대상체로부터의 T 세포의 집단 내로 삽입하여 대상체 중의 T 세포의 내인성 TCR을 원하는 항원 특이성을 갖는 이종성 TCR로 대체할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 T 세포의 집단을 대상체에 투여하여 질환을 치료할 수 있다. 예를 들어, 도 3b를 참조한다.
- [0105] 본원에서는 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 사용하여 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 대상체의 T 세포를 변형시키는 단계를 포함하며, 여기서 T 세포 수용체는 대상체에서 종양-특이적 항원을 인식하는 것인 방법을 제공한다.
- [0106] 일부 실시양태에서, 치료하고자 하는 암은 B 세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경아세포종, 골육종, 폐암, 결장암, 만성 골수성 암, 백혈병 (예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 또는 급성 림프구성 백혈병 (ALL)), 전립선암, 결장암, 신장 세포 암종, 간암, 신장암, 난소암, 위암, 고환암, 횡문근육종, 및 호지킨 림프종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 기원의 암은 B 계통 급성 림프아구성 백혈병, B 세포 만성 림프구성 백혈병, 및 B 세포 비호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0107] 예를 들어, 암, 감염성 질환 또는 자가면역 장애 치료와 같은, 본원에 기재된 치료 방법의 일부 실시양태에서, T 세포는 생체내에서 변형된다. 본원에 기재된 구축물 중 임의의 것은 생체내에서 환자에게 전달된다. 예를

들어, 미국 특허 번호 9737604 및 문헌 [Zhang et al. "Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy," *NPG Asia Materials* Volume 9, page e441 (2017)]을 참조한다.

[0108] 일부 실시양태에서, 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법은 a) 대상체로부터 T 세포를 수득하는 단계; b) 본원에 제공된 방법 중 임의의 것을 사용하여 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 T 세포를 변형시키는 단계로서, 여기서 T 세포 수용체는 대상체에서 종양-특이적 항원을 인식하는 것인 단계; 및 c) 변형된 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "종양-특이적 항원"이라는 어구는 암 세포에 고유하거나, 또는 비암성 세포에서보다 암 세포에서 더욱 풍부하게 발현되는 항원을 의미한다.

[0109] 본원에서는 인간 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 사용하여 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 대상체의 T 세포를 변형시키는 단계를 포함하며, 여기서 T 세포 수용체는 자가면역 장애와 연관된 항원을 인식하는 것인 방법을 추가로 제공한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 인간 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법은 a) 대상체로부터 T 세포를 수득하는 단계; b) 본원에 제공된 방법 중 임의의 것을 사용하여 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 T 세포를 변형시키는 단계로서, 여기서 T 세포 수용체는 대상체에서 자가면역 장애와 연관된 항원을 인식하는 것인 단계; 및 c) 변형된 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포이다.

[0111] 본원에서는 인간 대상체에서 감염을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것을 사용하여 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 대상체의 T 세포를 변형시키는 단계를 포함하며, 여기서 T 세포 수용체는 대상체에서 감염과 연관된 항원을 인식하는 것인 방법을 추가로 제공한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 인간 대상체에서 감염을 치료하는 방법은 a) 대상체로부터 T 세포를 수득하는 단계; b) 본원에 제공된 방법 중 임의의 것을 사용하여 이중성 항원-특이적 T 세포 수용체를 발현하도록 T 세포를 변형시키는 단계로서, 여기서 T 세포 수용체는 대상체에서 감염과 연관된 항원을 인식하는 것인 단계; 및 c) 변형된 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0113] 본원에 제공된 치료 방법 중 임의의 것은 내인성 TCR을 이중성 TCR로 대체하기 이전에 T 세포의 집단을 확장시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 제공된 치료 방법 중 임의의 것은 내인성 TCR을 이중성 TCR로 대체한 후, 및 대상체에게 투여하기 이전에 T 세포의 집단을 확장시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0114] 개시된 방법 및 조성물의 생성물을 위해 사용될 수 있거나, 그와 함께 사용될 수 있거나, 그의 제조에서 사용될 수 있거나, 또는 그 자체인 물질, 조성물, 및 성분을 개시한다. 이들 물질 및 다른 물질을 본원에서 개시하고, 이들 물질의 조합, 서브세트, 상호작용, 그룹 등이 개시될 때, 이들 화합물의 각각의 다양한 개별적 및 집단적 조합 및 순열에 대한 구체적인 언급이 명확하게 개시되지 않을 수 있지만, 각각이 본원에 구체적으로 고려되고, 기재되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 한 방법이 개시되고 논의되고, 상기 방법에 포함되는 하나 이상의 분자에 대해 이루어질 수 있는 다수의 변형이 논의되는 경우, 상기 방법의 각각의 및 모든 조합 및 순열, 및 가능한 변형이, 달리 반대로 구체적으로 명시되지 않는 한, 구체적으로 고려된다. 유사하게, 이들의 임의의 서브세트 또는 조합이 또한 구체적으로 고려되고, 개시된다. 이러한 개념은 개시된 조성물을 사용하는 방법에서의 단계를 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 본 개시내용의 모든 측면에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가 단계가 존재하는 경우, 이들 추가 단계는 각각 개시된 방법의 임의의 구체적인 방법 단계 또는 방법 단계의 조합으로 수행될 수 있고, 각각의 상기 조합 또는 조합의 서브세트가 구체적으로 고려되고, 개시된 것으로 간주되어야 하는 것으로 이해된다.

[0115] 본원에 인용된 공개문헌 및 상기문헌들에 인용된 자료는 그 전문이 본원에 구체적으로 참조로 포함된다.

[0116] 실시예

[0117] 하기 실시예는 단지 예시를 위한 것이며 제한하려는 것이 아니다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본질적으로 동일하거나 또는 유사한 결과를 산출하도록 변화되거나 또는 변형될 수 있는 다양한 비-임계 파라미터를 용이하게 인식할 것이다.

[0118] 유전자 표적화를 위한 인간 1차 T 세포의 분리

[0119] 1차 인간 T 세포는 신선한 전혈 샘플, 트리마 어페리시스(Trima Apheresis) (블러드 센터즈 오브 더 퍼시픽 (Blood Centers of the Pacific)) 이후 백혈구 제거 캄버로부터의 잔류물, 또는 백혈구 성분 채집술 생성물 (스텝셀(StemCell))로부터의 건강한 인간 공여자로부터 분리되었다. 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)를 섀메이트 튜브(SepMate tube) (스텝셀, 제조업체의 지시에 따름)를 사용하여 피콜(Ficoll) 원심분리에 의해 전혈 샘플로부터

터 분리하였다. 이지셉 인간 T 세포 분리 키트(EasySep Human T Cell Isolation Kit) (스텝셀, 제조업체의 지시에 따름)를 사용하여 자기 음성 선택에 의해 모든 세포 공급원으로부터의 PBMC로부터 T 세포를 분리하였다. 달리 언급되지 않는 한, 분리된 T 세포를 자극하고, 직접 사용하였다 (신선한 세포). 동결된 세포를 사용한 경우, 제조업체의 지시에 따라 밤뱅크(Banck) 냉동 배지 (불독 바이오(Bulldog Bio))에서 냉동시킨 이전에 분리된 T 세포를 해동시키고, 1일 동안 자극 없이 배지에서 배양한 후, 이어서, 신선하게 분리된 샘플에 대해 기재된 바와 같이 자극하고, 취급하였다. 신선한 건강한 인간 혈액 공여자는 UCSF 인간 연구 위원회(Committee on Human Research: CHR)에 의해 승인된 프로토콜에 동의하였다. 유전자 편집을 위한 환자 샘플은 예일(Yale) 내부 검토 위원회(Internal Review Board: IRB)에 의해 승인된 프로토콜 하에서 획득되었다.

[0120] **1차 T 세포 배양**

[0121] 달리 언급되지 않는 한, 벌크 T 세포를 5% 우태아 혈청, 50 mM 2-메르캅토 에탄올 및 10 mM N-아세틸 L-시스틴을 포함하는 XVivo™ 15 배지 (스텝셀)에서 배양하였다. 첨가제를 포함하지 않는 무혈청 배지 (이뮤노컬트 XF(ImmunoCult XF) T 세포 확장 배지, 스텝셀) 뿐만 아니라, RPMI + 10% FBS를 명시된 실험에 사용하였다 (도 15). 분리 직후, T 세포를 200 U/mL의 IL-2 (UCSF 파마시(UCSF Pharmacy)), 5 ng/mL의 IL-7 (써모피셔(ThermoFisher)), 및 5 ng/mL의 IL-15 (라이프 테크(Life Tech))의 시토카인 콕테일과 함께, 1:1의 비드 대 세포 농도에서 항-인간 CD3/CD28 자기 디나비드 (써모피셔)로 2일 동안 자극하였다. 전기천공 후, T 세포를 500 U/mL의 IL-2를 포함하는 배지에서 배양하였다. 배양 전 기간 동안, T 세포를 배지 1 mL당 대략 백만개의 세포 밀도로 유지시켰다. 전기천공 후, 2-3일마다 추가 배지를 추가의 신선한 IL-2와 함께 첨가하여, 최종 농도가 500 U/mL가 되도록 하였고, 필요에 따라 세포를 더 큰 배양 베셀로 옮겨 백만개 세포/mL의 밀도를 유지시켰다.

[0122] **RNP 제조**

[0123] RNP는 앞서 기재된 바와 같이 ([Schumann et al. *PNAS* 112: 10437-10442 (2015)]; 및 [Hultquist et al. *Cell Rep.* 17: 1438-1452 (2016)]), 2-성분 gRNA를 Cas9로 어닐링함으로써 제조하였다. 간략하게, crRNA 및 tracrRNA를 화학적으로 합성하였고 (다르마콘(Dharmacon), IDT), 제조합 Cas9-NLS, D10A-NLS, 또는 dCas9-NLS를 제조합적으로 제조하고, 정제하였다 (QB3 마크로랩(Macrolab)). 동결건조된 RNA를 160 uM 농도로 150 mM KCl을 포함하는 트리스-HCl (7.4 pH)에 재현탁시키고, -80°C에서 분취물로 보관하였다. crRNA 및 tracrRNA 분취물을 해동시키고, 부피 기준으로 1:1로 혼합하고, 37°C에서 30 min 동안 인큐베이션하여 80 uM gRNA 용액을 형성하였다. 이어서, 20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10% 글리세롤, 1 mM DTT 중의 40 uM 하에 보관된 제조합 Cas9 및 변이체를 37°C에서 15 min 동안 80 uM gRNA와 부피 기준으로 1:1 (2:1 gRNA 대 Cas9 몰비)로 혼합하여 20 uM의 RNP를 형성하였다. RNP는 일반적으로 복합체 형성 직후에 전기천공하였다.

[0124] **dsDNA HDRT 제조**

[0125] 이중 가닥 DNA HDRT 서열은 PCR 생성물로부터 생성하였다. 김슨 어셈블리즈(Gibson Assemblies)를 사용하여 신규 HDR 서열을 구축하여, 상동성 아암 (통상적으로 IDT로부터 gBlocks로서 합성) 및 서열 확인 및 추후 증식을 위한 클로닝 벡터 내로의 원하는 인서트 (예컨대 GFP)로 이루어진 HDR 주형 서열을 배치하였다. 이들 플라스미드를 고 처리량 PCR 증폭 (카파 핫스타트(Kapa Hotstart) 폴리머라제)을 위한 주형으로서 사용하였다. PCR 앰플리콘 (dsDNA HDRT)을 SPRI 정제하고 (1.0X), PCR 반응물 유입량 100 µL당 3 µL H₂O의 최종 부피로 용출시켰다. 1:20 희석물로 나노드롭에 의해 HDRT의 농도를 분석하였다. 증폭된 HDRT의 크기는 1.0% 아가로스 겔에서 겔 전기영동에 의해 확인하였다.

[0126] **엑소뉴클레아제 분해에 의한 ssDNA HDRT 제조**

[0127] HDR 공여자로서 긴 ssDNA를 제조하기 위해, 관심 DNA를 하나의 일반 비-변형된 PCR 프라이머 및 제2 인산화된 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 증폭시켰다. 인산화된 프라이머를 사용하여 증폭되는 DNA 가닥은 이러한 방법을 사용하여 분해되는 가닥일 것이다. 이를 통해 각각의 인산화된 PCR 프라이머를 사용하여 단일 가닥 센스 또는 단일 가닥 안티센스 DNA를 제조할 수 있다. 관심 ssDNA 가닥을 제조하기 위해, PCR 생성물의 인산화된 가닥을 37°C에서 5분 동안 (1 kb 당) 각각 2개의 효소, 스트랜다제 믹스(Strandase Mix) A 및 스트랜다제 믹스 B로 후속 처리함으로써 분해시켰다. 80°C에서 5분 동안 인큐베이션하여 효소를 불활성화시켰다. 생성된 ssDNA HDR 주형을 SPRI 정제하고 (1.0X), H₂O에서 용출시켰다. 가이드-잇™ 롱 ssDNA 프로덕션 시스템(Guide-it™ Long ssDNA Production System) (다카라 바이오 USA, 인크.(Takara Bio USA, Inc.) #632644)에 대한 보다 상세한 프로토콜은 제조업체의 웹사이트에서 찾아볼 수 있다.

[0128] **역 합성에 의한 ssDNA HDRT 제조**

[0129] ssDNA 공여자는 문헌 [Leonetti et al. <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905>]]에 기재된 바와 같이, RNA 중간체의 역전사에 이어, 생성된 RNA:DNA 하이브리드 생성물에서 RNA 가닥의 가수분해에 의해 합성하였다. 간략하게, 원하는 HDR 공여자를 먼저 T7 프로모터의 하류에 클로닝하고, T7-HDR 공여자 서열을 PCR에 의해 증폭시켰다. RNA는 HiScribe T7 RNA 폴리머라제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 사용하는 시험관내 전사에 의해 합성하고, TGIRT-III (인덱스(InGex))을 사용하여 역전사시켰다. 역전사 후, NaOH 및 EDTA를 각각 0.2 M 및 0.1 M에 첨가하고, RNA 가수분해를 95°C에서 10 min 동안 수행하였다. 반응물을 HCl로 켄칭하고, 최종 ssDNA 생성물을, 앰퓨어 XP(Ampure XP) 자기 비드 (벤크만 쿨터(Beckman Coulter))를 사용하여 정제하고, 멸균 RNase-무함유 H₂O에서 용출시켰다. ssDNA 정질을 모세관 전기영동 (바이오애널라이저(Bioanalyzer), 애질런트(Agilent))에 의해 분석하였다.

[0130] 1차 T 세포 전기천공

[0131] RNP 및 HDR 주형은 초기 T 세포 자극 후 2일 경과 시에 전기천공하였다. T 세포를 그의 배양 베셀로부터 수거하고, 자석 위에 2분 동안 세포를 놓아둠으로써 자기 CD3/CD28 디나비드를 제거하였다. 전기천공 직전에, 비드가 제거된 세포를 90Xg에서 10분 동안 원심분리하고, 흡인하고, 백만개 세포당 20 µL 완충제로 론자(Lonza) 전기천공 완충제 P3에 재현탁시켰다. 최적의 편집을 위해, 펄스 코드 가 EH115인 론자 4D 96-웰 전기천공 시스템을 사용하여 웰당 백만개 T 세포를 전기천공하였다. 웰당 200,000개 내지 최대 2백만개 세포의 대체 세포 농도는 더 낮은 효율을 보였다. 대체 전기천공 완충제는 명시된 바와 같이 사용되었지만, 상이한 최적 펄스 설정(OMEM 완충제의 경우, EO155)을 가졌다. 달리 명시되지 않는 한, 2.5 µL의 RNP (총 50 pmol)를 2 µg/µL에 2 µL의 HDR 주형 (총 4 µg HDR 주형)과 함께 전기천공하였다.

[0132] 96-웰 실험을 위해, HDRT를 먼저 96-웰 폴리프로필렌 V-바닥 플레이트의 웰에 분취하였다. 이어서, RNP를 HDRT에 첨가하고, 적어도 30초 동안 RT에서 함께 인큐베이션하였다. 최종적으로, 전기천공 완충제에 재현탁된 세포를 첨가하고, HDRT 및 RNP로 피펫팅함으로써 간단히 혼합하고, 24 µL의 총 부피 (세포 + RNP + HDRT)을 96 웰 전기천공 큐벳 플레이트로 옮겼다. 전기천공 직후, 80 µL의 미리 가온된 배지 (시토카인 없음)를 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 전기천공 큐벳에 잔류시키면서, 세포 배양 인큐베이터에서 37°C에서 15분 동안 휴지시켰다. 15분 후, 세포를 최종 배양 베셀로 옮겼다.

[0133] 내인성 T 세포 수용체의 단일 HDR 주형으로의 비-바이러스 대체

[0134] TCR-α 및 TCR-β 쌍 둘 다를 단일 멀티플렉스화된 라운드의 편집에서 동시에 녹인할 수 있다 (도 2). 이는 도 1a 및 도 1b의 표적화된 전략법과 유사하되, 단, 예외적으로, TCR-α 및 TCR-β 불변 로커스 둘 다에서 원하는 항원 특이적 TCR의 가변 영역만이 삽입된다. 이는 둘 다 삽입물의 총 크기를 (1개의 1.5 kbp 삽입물에서 2개의 500 bp 삽입물로) 축소시킨다는 이점을 갖고, 또한, 예를 들어, 잠재적으로 원하지 않는, 삽입된 항원 특이적 TCR-α 쌍과 내인성 TCR-β 쌍의 쌍형성을 막으면서, 원하는 항원 특이적 TCR의 쌍 둘 다를 발현하는 임의의 T 세포가 그의 앞서 재조합된 내인성 TCR-α 및 TCR-β 쌍은 녹아웃될 것이라는 것을 의미한다.

[0135] T 세포 수용체의 폴리클로날 라이브러리로의 내인성 TCR 대체

[0136] 내인성 TCR을 임의의 원하는 신규 이중성 TCR 서열로 대체하는데 gRNA 및 상동성 아암은 동일한 것이기 때문에, 다양한 원하는 TCR을 함유하는 다중의 상이한 DNA 주형을 동시에 전기천공할 수 있다. 임의의 특이적 T 세포는 오직 다양한 원하는 TCR로부터 단일의 TCR만을 획득하겠지만, 다수의 TCR DNA 주형은 전기천공된 세포의 집단 전반에 걸쳐 통합될 것이며, 이로써, 원하는 서열의 합성 T 세포 레퍼토리를 생성하게 될 것이다 (도 3a).

[0137] 앞서 공지된 TCR 서열로부터, 또는 관심 내인성 T 세포 집단에서 발견되는 천연 레퍼토리로부터 합성 T 세포 레퍼토리를 디자인하고, 생성할 수 있다 (도 3b). 일부 예는 (CD8+ 또는 CD4+ T 세포 이펙터의 신규 집단 내로 삽입되는) 중앙 침윤 림프구에 의해 발현되는 TCR, (조절 T 세포의 집단 내로 삽입되는,) 자가면역 질환의 부위에서의 자가반응성 T 세포에 의해 발현되는 TCR, 또는 (CD8+ 또는 CD4+ T 세포 이펙터 내로 삽입된) 병원체 반응성 T 세포로부터의 TCR을 포함한다.

[0138] 내인성 T 세포 수용체의 단일 HDR 주형으로의 비-바이러스 대체

[0139] T 세포 수용체의 게놈 로커스는 매우 복잡하며, 여기서 (TCR-α 쌍의 경우, V 및 J 대립유전자, 및 TCR-β 쌍의 경우, V, D 및 J 대립유전자로 명명되는) 매우 다양한 가변 대립유전자에서는 기능성 T 세포 수용체를 생성하기 위해 T 세포 발생 동안 체세포 유전자 재배열이 이루어지게 된다. TCR 레퍼토리의 다양성을 위해서는 중요하지만, (녹아웃 또는 녹인에 상관 없이) TCR 로커스에서의 표적화된 게놈 편집을 위해서는 도전과제가 되는 이들

재조합된 서열은 T 세포의 폴리클로날 집단 사이에 상이하다. 표적화 적용을 위해, TCR- α 및 TCR- β 쌍 둘 다, 비록 V-J 또는 V-D-J 세그먼트가 재배열되었다 하더라도, 단백질 C-말단의 불변 도메인은 모든 T 세포가 공유하고 있다. TCR- β 로커스는 도 1b에 제시된 바와 같이 표적화될 수 있는 2개의 불변 영역 (TRBC1 및 TRBC2)을 갖는다. 상기 불변 서열 (불변 엑손, TRAC 또는 TRBC 엑손 1, 엑손 2 등으로 표지)을 통해 게놈 표적화 시약의 단일 세트 (본 출원에서 CRISPR/Cas9 시스템, 즉, 단일 gRNA 서열)는 T 세포 그가 발현하는 TCR이 재배열되었다 하더라도, 모든 T 세포를 변형시키는데 사용될 수 있다.

[0140] 상기 기재된 방법을 사용하여, 종양 항원에 특이적으로 결합하는 이중성 TCR을 코딩하는 DNA 주형을 제조하였고, 인간 T 세포에서 내인성 TCR을 대체하는데 사용하였다. 내인성 TCR을 대체하는데 사용된 상동성 지정 복구 주형 (PCR에 의해 제조된 dsDNA, 또는 본원에 기재된 다양한 방법에 의해 제조된 ssDNA)의 길이는, gRNA 커팅 부위에 플랭킹되는 게놈 서열에 상동성인 5' 및 3' 상동성 아암 (~300 bp)을 포함하여 ~2.1 kb이다 (도 1a). 이들 상동성 아암 사이에는 상동성 지정 복구에 의해 gRNA 커팅 부위에 삽입된 ~1.5 kb 서열이 존재한다. 상기 삽입된 서열은 멀티시스트론성 요소 (T2A 자기-절제 펩티드)로 시작하고, 이어서, 원하는 항원 특이적 T 세포 수용체 (본 실시예에서, NY-ESO-1 흑색종에 특이적인 TCR)의 TCR- β 쌍의 전장 서열이 이어진다. 제2 멀티시스트론성 요소 (P2A 자기 절제 펩티드)는 TCR- β 쌍 뒤로 이어지고, TCR- β 쌍을 원하는 항원 특이적 TCR- α 쌍의 가변 (재조합된 V 및 J 대립유전자) 서열로부터 분리시켰다. 오직 TCR- α 쌍로부터의 가변 영역 및 TRAC 엑손 1의 서열만이 gRNA 커팅 부위(의 5' 말단) 앞의 선행부로 삽입되었는데, 남은 TRAC 엑손은 함께 최종 mRNA 서열로 스플라이싱되었기 때문이었다. DNA 주형은 상기 기재된 바와 같이 RNP:DNA 주형 복합체의 일 부분으로서 T 세포 내로 도입되었다.

[0141] 성공적인 HDR이 이루어진 세포에서의 전사를 통해 TCR- β 및 TCR- α 둘 다를 코딩하는 폴리시스트론성 mRNA일 수득되었다. 본 표적화 전략법을 통해 3개의 펩티드 쌍을 수득하였다 - (1) 막횡단 패스를 갖지 않고 (따라서, 세포 표면 상에서 발현되지 않아야 하고), 소포체에서 분해되거나, 또는 전사 후 분비된 나머지 내인성 가변 영역 펩티드; (2) 전장의 원하는 항원-특이적 TCR- β 쌍; 및 (3) 전장의 원하는 항원-특이적 TCR- α 쌍. 결과는 내인성 TCR 프로모터의 제어 하에 원하는 항원 특이적 TCR의 쌍 둘 다를 발현한 T 세포였다. 쌍 둘 다는 T 세포에 의해 발현되었고, 이를 통해 NY-ESO-1 흑색종 신생항원을 특이적으로 인식한 이중성 TCR일 형성되었다.

[0142] 도 4a에 제시된 바와 같이, 상기 기재된 구축물의 전기천공 후 4일째, 2명의 건강한 인간 혈액 공여자로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 통합된 NY-ESO-1 특이적 TCR에 의해 인식되는 펩티드를 함유하는 형광 표지된 MHC-텍스트라머 (NYESO)로 염색하였다. 도 4b는 다른 건강한 인간 공여자에서의 유사한 결과를 보여주는 제2 실험이며, 이로써, 비-바이러스 내인성 TCR 대체의 강건성 및 재현성이 입증된다.

[0143] 비록 두 불변 영역 (TRBC1 및 TRBC2)이 서로 고도로 상보적이기 때문에 β 로커스가 더 복잡하기는 하지만, TCR- α 를 표적화하는 것과 유사한 전략법을 이용하여 TCR- β 로커스에서도 또한 TCR 대체를 달성하였다. HDR 주형은 TRBC1 및 TRBC2 둘 다에서 발견되는 서열을 표적화하는 gRNA를 이용하여 제1 TRBC1 엑손의 5' 말단에 신규 전장 TCR- α 및 신규 TCR- β 의 VDJ 영역을 삽입하였다. TRBC1과 TRBC2 게놈 영역 사이의 서열 유사성에 기인하여, 상기 구축물의 3' 상동성 아암은 TRBC2 중 등가 영역에도 또한 거의 완벽한 상동성을 띤 반면, 5' 상동성 아암은 삽입 부위에 가장 가까운 150 bps 중 TRBC2 게놈 영역에 대하여 ~85%의 상동성을 가졌다. 따라서, 삽입은 가능하게는 TRBC1에서 지배적으로 이루어지지만, TRBC2에서도 또한 가능하거나, TRBC1과 TRBC2 사이에 개입 결실이 있을 수 있다. TRBC1 또는 TRBC2에서 특이적으로 커팅하는 gRNA가 또한 둘 다를 표적화하는 gRNA 대신 사용될 수 있다.

[0144] 도 9a는 게이팅된 CD4+ 또는 CD8+ T 세포에서의 NY-ESO-1 특이적 TCR의 레트로바이러스 전달 또는 비-바이러스 TCR 대체 이후의 TCR 쌍형성 오류 분석을 제시한다. TCR의 레트로바이러스 전달과 비교하였을 때, 비-바이러스 TCR 대체를 통해 TCR 쌍형성 오류는 감소된다. TCR의, TRAC로 표적화된 신규 TCR- α VJ 도메인 및 TRBC1로 표적화된 신규 TRB- β VDJ 도메인을 이용한 멀티플렉스화된 대체가 또한 가능하였고, TCR 쌍형성 오류를 추가로 감소시키기 위한 전략법을 제공할 수 있다 (도 9b-c).

[0145] **텍스트라머를 이용한 TCR 대체 및 TCR 염색**

[0146] 2명의 건강한 인간 혈액 공여자로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 상기 기재된 단일 구축물로 전기천공하였다. 전기천공 후 4일째, NYESO MHC-텍스트라머를 이용한 항원 특이적 염색 대비로 (모든 잠재적 인간 TCR에 결합하는 항체를 이용한) TCR 발현에 대한 염색을 수행하였다. 내인성 TCR의 상동성 지정 대체가 없는 대부분의 T 세포에서 (도 5), TRAC 엑손 1 gRNA에 의한 커팅 및 비-상동성 말단 연결에 의한 작은 indel의 도입에 기인하여 내인성 TCR은 녹아웃된다. 예상대로, 거의 모든 NYESO 양성 세포도 또한 TCR 발현에 대해 양성이다.

[0147] TCR 녹인 1차 인간 T 세포에 의한 시험관내 암 세포 사멸

[0148] 시험관내 암 세포 사멸 검정법을 통해 TCR 녹인 세포의 기능적 표적 세포 사멸 능력을 입증하였다. 상기 기재된 바와 같이, 건강한 인간 공여자로부터의 CD3+ 1차 T 세포 중 내인성 TCR α 로커스 내로 1G4 (NYSEO 특이적) TCR 서열을 삽입하였다. 전기천공 후 7일째, 세포를 형광성 NYESO 펩티드-MHC 텍스트라머로 염색하고, 형광성 활성화 세포 분류에 의해 NYESO+ 세포를 분류하여 순수한 집단을 획득하였다. 상기 집단을 추가로 5일 동안 표준 T 세포 배양 조건 (배지 및 IL-2)에서 추가로 배양하였다. 전기천공 후 12일째, 그의 내인성 TCR이 1G4 TCR에 의해 대체된 것인 분류된 T 세포를, 그의 MHC 상에 NYESO 항원을 제시하는 암 세포주 (흑색종으로부터 유래되고, NYESO 항원 뿐만 아니라, 1G4 TCR에 의해 인식되는 MHC 대립유전자인 MHC-A2를 내재적으로 발현하는 A375 세포)와 함께 공동 배양하였다. 매 12시간마다, 정량적 형광 영상화에 의해 암 세포 개수를 계수하였다 (A375 세포는 적색 형광성 단백질을 발현하는 바, 이를 통해 A375 세포를 T 세포로부터 별개로 특이적으로 계수할 수 있음). 인큐사이트(Incucyte) 자동 형광 현미경을 이용하여 형광 계수를 자동화하였다. 배양물을 3,000개의 암 세포 및 1G4+ T 세포의 명시된 비로 시딩하였다 (도 4a 참조). 2명의 건강한 인간 공여자로부터 편집된 T 세포에서, 표적 암 세포의 용량 및 시간에 의존하는 강력한 사멸이 관찰되었고, 이는 1G4 TCR 녹인 T 세포의 기능성을 시사하는 것이다. 주어진 웰 중 살아있는 암 세포의 개수를, T 세포가 존재하지 않는 대조군 웰 중의 살아있는 암 세포의 개수로 나눔으로써 암 세포의 퍼센트 사멸률을 측정하였다. T 세포 대 암 세포의 높은 비 (~10:1)의 T 세포 대 암 세포는 거의 모든 암 세포의 신속한 (<24시간) 사멸을 보였지만, 극도로 낮은 비 (~0.1:1)의 T 세포 대 암 세포도 배양 시간이 추가로 경과됨에 따라 강력한 사멸을 보였다 (도 6a 참조).

[0149] 단일 시점에서의 1G4 TCR 녹인 T 세포에 의한 시험관내 암 사멸을 입증하였다 (도 6b 참조). 상기 기재된 세포 사멸 검정법에서 단일 시점으로부터 요약 데이터를 수집하였다 (공동-인큐베이션 후 36시간째). NYESO 텍스트라머+ (1G4+) T 세포를 상기 기재된 바와 같이 분류하여 100% 1G4 양성 집단을 생성하였고, 이어서, 동일 공여자로부터의 NYESO 텍스트라머- (1G4-) T 세포로 희석하여 명시된 백분율의 NYESO+ 염색 T 세포 (10%, 1%, 또는 0%)를 획득하였다. 이어서, 상기 기재된 바와 같이, 시험관내 암 사멸 검정법에서 상기 집단을 각각 암 세포와 함께 8개 T 세포 대 1개 암 세포의 비로 공동-배양하였다 (100%, 10%, 1%, 및 0% NYESO+ T 세포 집단에 대해 각각 8:1, 0.8:1, 0.08:1 및 0:1 비의 1G4+ T 세포:암 세포를 획득). 암 세포 사멸에 대한 양성 대조군으로서, T 세포의 게놈 내로 1G4 TCR 발현 카세트를 무작위로 통합하는 렌티바이러스를 추가의 건강한 공여자로부터의 세포에 형질도입하였다 (이 경우, 1G4 TCR이 내인성 TCR 로커스를 대체하는 1G4 TCR 녹인 T 세포와 달리, TCR은 무작위로 통합 및 발현되고, 이로써, 내인성 TCR 프로모터로부터 발현이 이루어지고, 동시에 내인성 TCR은 녹아웃시킨다는 점에 주의함). 상기 추가의 공여자로부터의 렌티바이러스에 의해 형질도입된 T 세포를 유사하게 분류하여 100% 1G4+ 집단을 획득하였고, 유사하게 8:1 T 세포 대 암 세포 비로 표적 A375 암 세포주와 함께 공동-배양하였다.

[0150] 생체내 마우스 고형 종양 모델

[0151] 모든 마우스 실험은 UCSF 동물 실험 윤리 위원회(UCSF Institutional Animal Care and Use Committee) 프로토콜 하에 완료하였다. 모든 실험을 위해 8 내지 12주령된 NOD/SCID/IL-2R γ -널 (NSG) 수컷 마우스 (잭슨 래보라토리(Jackson Laboratory))를 사용하였다. 1×10^6 개 A375 인간 흑색종 세포 (ATCC CRL-1619)를 면도된 우측 옆구리 내로 피하 주사하여 마우스에 종양을 시딩하였다. 종양 시딩 후 7일째, 종양 크기를 사정하고, 종양 부피가 15-30 mm³인 마우스를 무작위로 실험 처리군 및 대조 처리군으로 배정하였다. 명시된 개수의 T 세포를 100 μ l 무혈청 RPMI 중에 재현탁시키고, 안와후로 주사하였다. 종양 사이징 실험을 위해, 전자 캘리퍼스를 이용하여 종양의 길이 및 너비를 측정하였고, $v = 1/6 * \pi * \text{길이} * \text{너비} * (\text{길이} + \text{너비})/2$ 로서 부피를 계산하였다. 사이징 측정 동안 연구원은 실험 처리군에 대해 맹검화되었다. 벌크 편집된 T 세포 집단 (5×10^6) 또는 분류된 NY-ESO-1 TCR+ 집단 (3×10^6)을 도면 및 범례에 명시된 바와 같이 전달하였다. 벌크 편집된 T 세포 전달의 경우, 렌티바이러스에 의해 편집된 세포는 일반적으로 더 높은 비로 NY-ESO-1 양성 세포를 가졌고, 이에, 총 T 세포 NY-ESO-1+의 백분율이 비-바이러스에 의해 편집된 T 세포의 벌크 집단의 백분율과 같도록 (~10% NY-ESO-1+) 정규화시키기 위해 모의 감염된 세포를 첨가하였다. 분류된 T 세포 전달의 경우, 전기천공 후 8일째 NY-ESO-1+ T 세포를 FACS 분류하고, 추가로 2일 동안 확장시키고, 냉동시켰다 (밤벡커 냉동 배지, 불독 바이오). 이어서, 비-바이러스에 의해 또는 렌티바이러스에 의해 변형된 인간 T 세포를 해동시키고, 입양 전달 전 밤새도록 배지 중에서 휴지시켰다. 입양 전달된 T 세포의 유세포 분석법에 의한 분석을 위해, 70 μ m 필터를 통해 종양을 기계적으로 해리시켜 종양 및 비장으로부터의 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 모든 실험 동물은, 어느 차원으로도 종양 크기 한계는 2.0 cm인 것을 포함하는, 승인받은 IACUC 프로토콜 (UCSF)에 따른 관련 윤리 규정

에 준하여 수행하였다.

[0152] 비-바이러스 TCR 대체가 이루어진 T 세포의 생체내 기능성

[0153] 인간 항원 특이적 종양 이중이식편 모델을 사용하여 (도 7a) 비-바이러스 TCR 대체가 이루어진 T 세포의 생체내 기능성을 사정하였다. 먼도된 옆구리에 피하로 1×10^6 개 A375 세포 (인간 흑색종 세포주; NY-ESO-1 항원+ 및 HLA-A*0201+)를 8 내지 12주령된 NSG 마우스에 시딩하였다. NY-ESO-1 항원 특이적 TCR을 발현하도록 편집된 1 차 인간 T 세포를 (렌티바이러스 형질도입 또는 비-바이러스 TCR 대체를 통해) 생성하고, 형질도입 또는 전기천 공 후 10일 동안 확장시키고, 냉동시켰다. 벌크 편집된 집단을 사용하거나 (도 7b-c), NY-ESO-1 TCR+ 분류된 집단 (도 7d-f)을 사용하였다. 종양 시딩 후 7일째, T 세포를 해동시키고, 안와후로 주사하 입양 전달하였다. 도 7b에 제시된 바와 같이, 5×10^6 개 벌크 비-바이러스에 의해 표적화된 T 세포 전달 후 2일째 (~10% TCR+ NYESO-1+ (적색), ~10% TCR+ NYESO-1- (오렌지색), 및 ~80% TCR- NYESO-1- (녹색), 도 7b 참조), NY-ESO-1+ 비-바이러스에 의해 편집된 T 세포는 비장 대비 종양에 우선적으로 축적되었다. 4명의 인간 T 세포 공여자 각각에 대하여 마우스 n=5. 5×10^6 개 벌크 비-바이러스에 의해 표적화된 CFSE 표지된 T 세포 전달 후 10일째, NYESO-1 TCR+ 세포는 TCR- 또는 TCR+NYESO-1- T 세포보다 더욱 큰 증식을 보였고, 비장에서보다 종양에서 더욱 큰 증식 (CFSE 낮음)을 보였다 (도 7c). 전달 후 10일째, 종양에서 TCR- 및 TCR+NYESO-1 T 세포를 찾기 어려웠다 (도 7d). 도 7d는 도 8f에 요약된 데이터에 대한 종축 방향 종양 부피 트랙을 제시한다. 렌티바이러스 형질도입 또는 비-바이러스 TCR 대체에 의해 생성된 3×10^6 개 분류된 NY-ESO-1 TCR+ T 세포를 종양 시딩 후 7일째 전달하고, 종양 시딩 후 24일째까지 비히클 단독 주사인 것과 비교하였다. 렌티바이러스 전달 (상단) 및 비-바이러스 TCR 대체 (하단)와의 비교로 비히클 대조군 데이터에 대한 동일한 데이터가 각 공여자에 대하여 제시되어 있다는 것에 주의한다. 본 실험에서 (도 7e-f), T 세포 전달 후 17일째, 비-바이러스에 의해 TCR 대체된 세포는 더욱 큰 NY-ESO-1 TCR 발현 및 고갈 마커의 더 낮은 발현을 보이는 것으로 나타났다. 렌티바이러스에 의해 형질도입된 세포 및 비-바이러스 TCR 대체된 세포 전달 둘 다, 24일째 종양 부담의 유의적인 감소를 보였다. 본 실험 모델에서, 비-바이러스 TCR 대체는 렌티바이러스 형질도입과 비교하였을 때, 추가 감소를 보였다 (도 8f). 공여자 1명당 5마리의 마우스 (도 7b, 7c) 또는 7마리의 마우스 (도 7d-f)에서의 n=4 (도 7b), n=2 (도 7d-f), 또는 n=1 (도 7c) 독립된 건강한 공여자, 여기서 평균 (도 7b, 7e, 7f) 및 표준 편차 (도 7b).

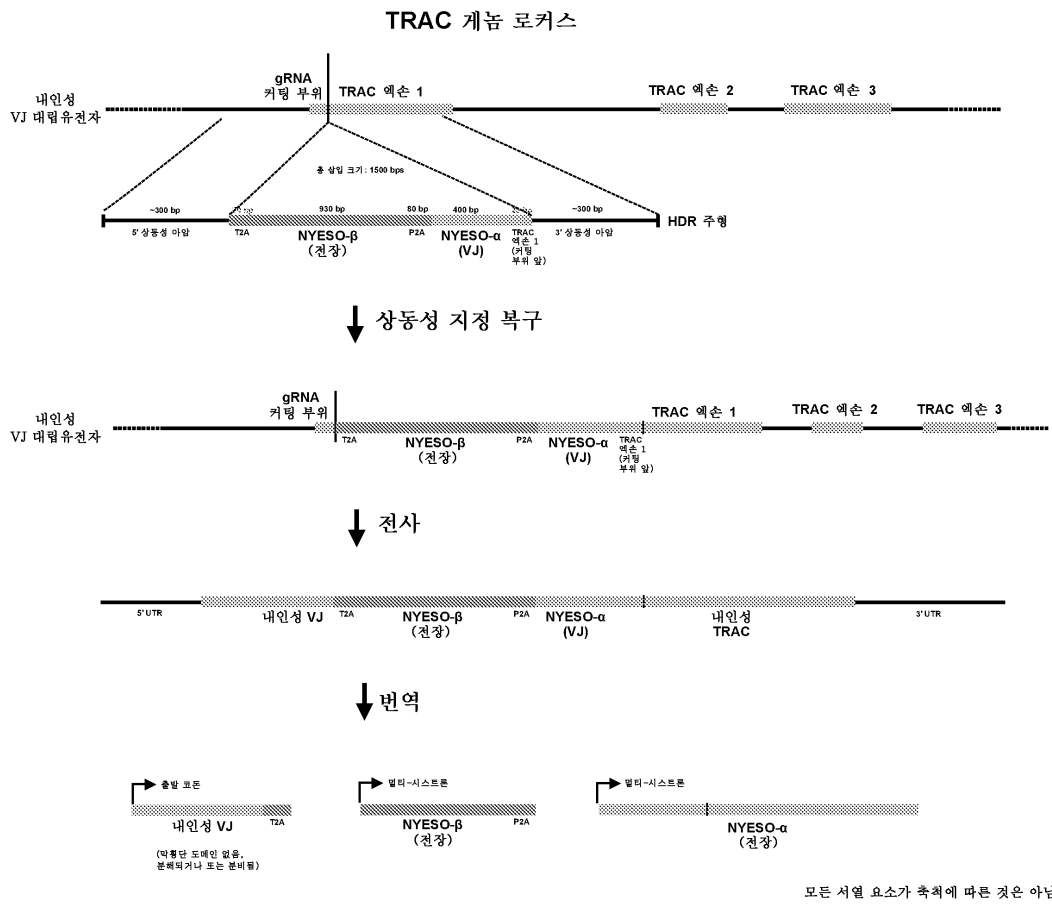
[0154] 종양 항원 특이적 기능

[0155] 표적화된 인간 T 세포의 종양 항원-특이적 기능을 또한 사정하였다. 표적화된 T 세포를 2개의 상이한 NY-ESO-1+ 흑색종 세포주, M257 및 M407과 함께 공동-배양하였을 때, 변형된 T 세포는 강건하게 및 특이적으로 IFN- γ 및 TNF- α 를 생산하였고, T 세포 탈과립화 (CD107a 표면 발현에 의해 측정)를 유도하였다 (도 8a). 시토카인 생산 및 탈과립화는 동족 NY-ESO-1 펩티드를 제시하는데 필요한 적절한 HLA-A*0201 클래스 I MHC 대립유전자를 발현하는 세포주에 NY-ESO-1 TCR T 세포가 노출되었을 때에만 발생하였다. CD8+ 및 CD4+ T 세포 반응 둘 다 건강한 공여자 사이에는 일치하였고, NY-ESO-1 TCR이 감마 레트로바이러스에 의해 형질도입되었고, 바이러스 프로모터를 사용하여 이중 발현된 것으로, 동일한 건강한 공여자로부터의 T 세포의 반응과 유사하였다 (도 8a 및 도 9d). NY-ESO-1 TCR 녹인 T 세포는 시험관내에서 양성 대조군인 레트로바이러스에 의해 형질도입된 T 세포와 유사한 속도로 표적 M257-HLA-A*0201 암 세포를 신속하게 사멸시켰다 (도 8b). 사멸은 공여자 사이에 일관되게, NY-ESO-1 항원 및 HLA-A*0201 대립유전자를 발현하는 표적 세포에 대하여 선택적이었고, 올바른 gRNA 및 HDR 주형 둘 다를 이용하여 변형된 T 세포에 의존하였다 (도 9h-k).

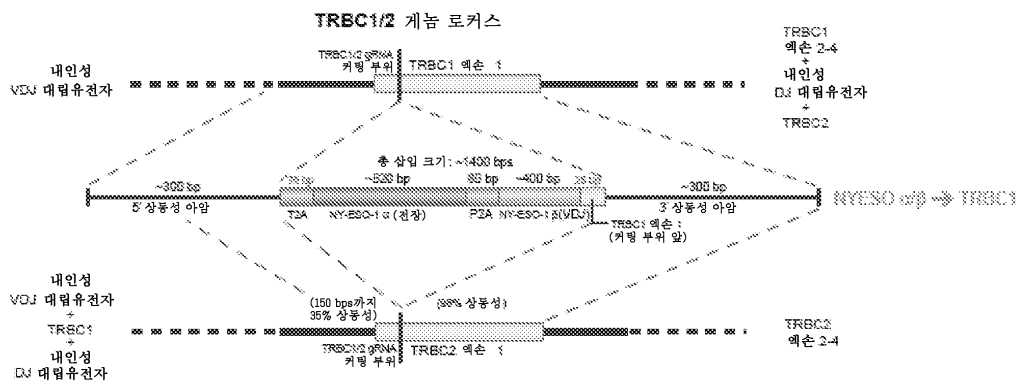
[0156] 마지막으로, 비-바이러스 게놈 표적화를 이용하여 NY-ESO-1 TCR 세포를 규모에 맞게 생성할 수 있고, 이들 세포는 생체내 항종양 기능을 갖는다는 것을 확인하였다 (도 8c 및 도 7a). 유사한 크기의 AAV 주형 사용시보다 비-바이러스 표적화 사용 시에 녹인 효율이 더 낮았다는 점을 고려하면, 입양 세포 요법을 위해 NY-ESO-1 양성 세포의 개수가 충분하지 여부는 보장되었다. 6명의 건강한 공여자로부터의 1억 개 T 세포를 통해 10일 동안의 확장 후, 공여자 1명당 평균 3억 8,500개 NY-ESO-1 TCR T 세포를 얻었다 (도 8d). NY-ESO-1 TCR 녹인 T 세포는 양성 대조군인 렌티바이러스에 의해 형질도입된 T 세포와 유사하게, 비장보다 종양으로 우선적으로 국재화되고, 종양에 지속되고, 종양에서 증식되었다 (도 8e 및 도 7b-f). 분류된 NY-ESO-1 TCR T 세포의 입양 전달은 또한 처리된 동물에서 종양 부담을 감소시켰다 (도 8f).

도면

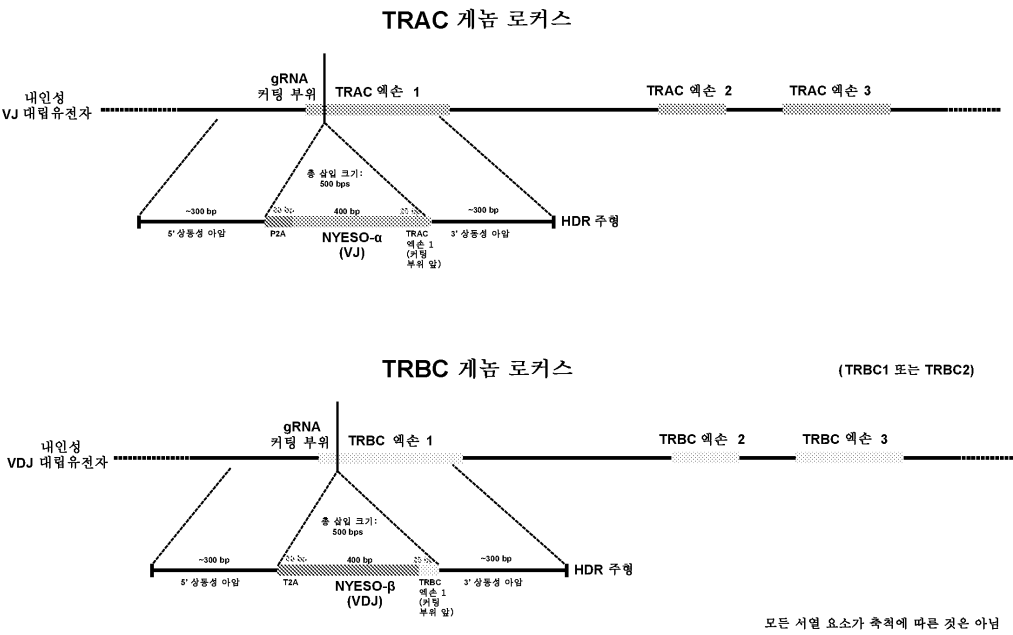
도면1a



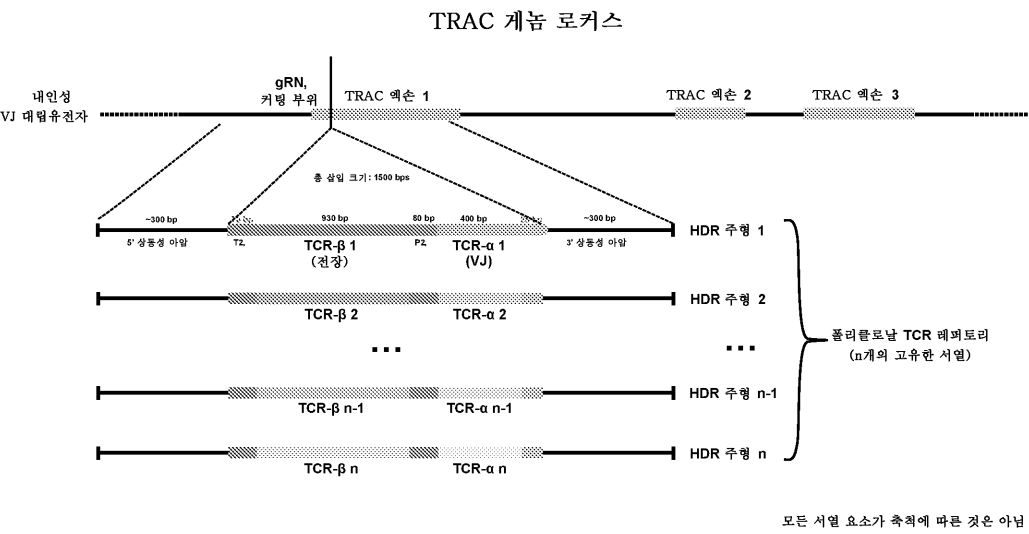
도면1b



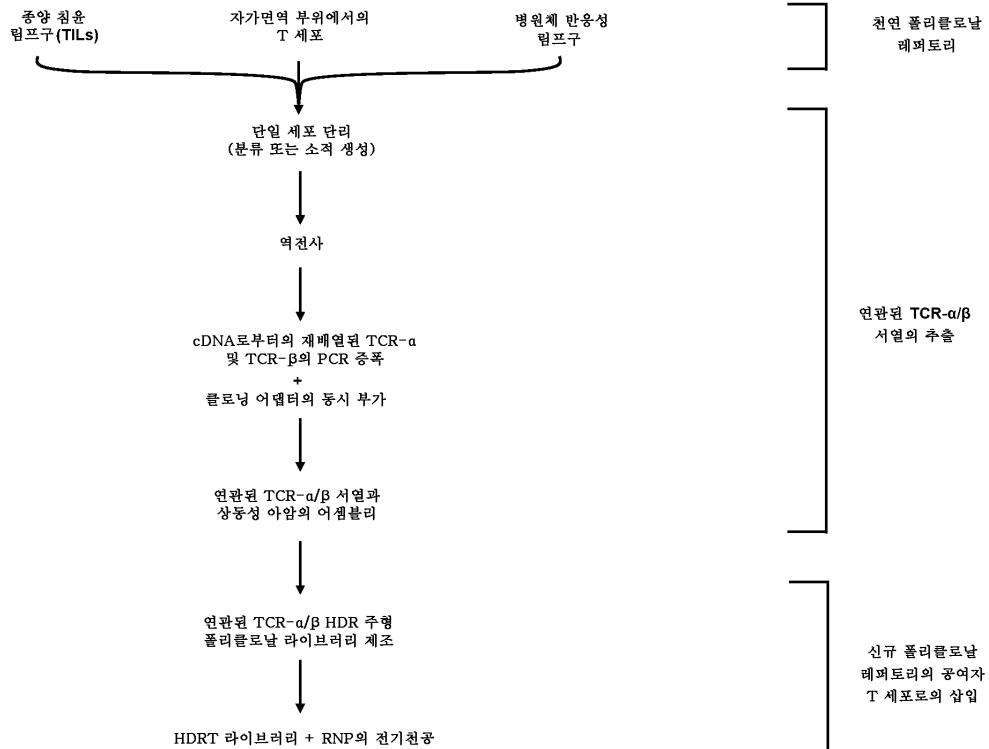
도면2



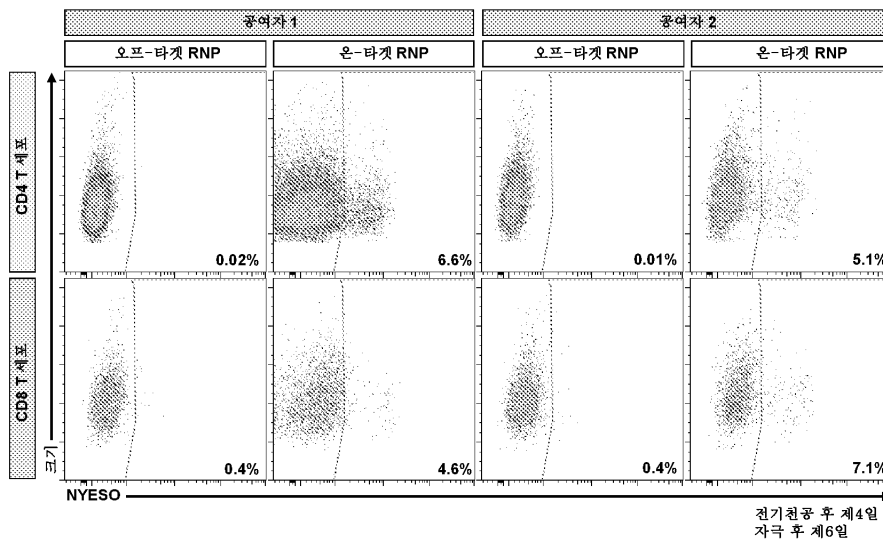
도면3a



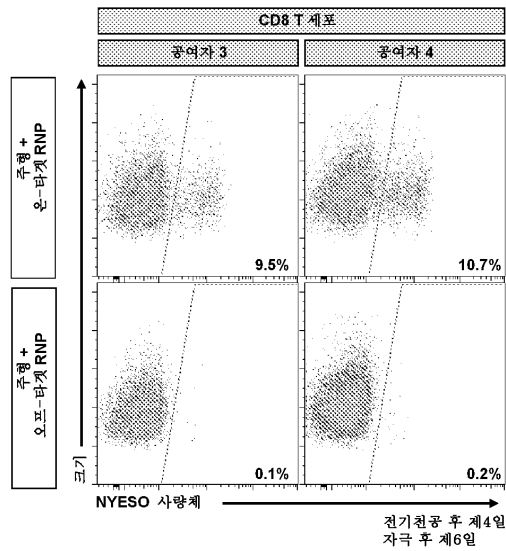
도면3b



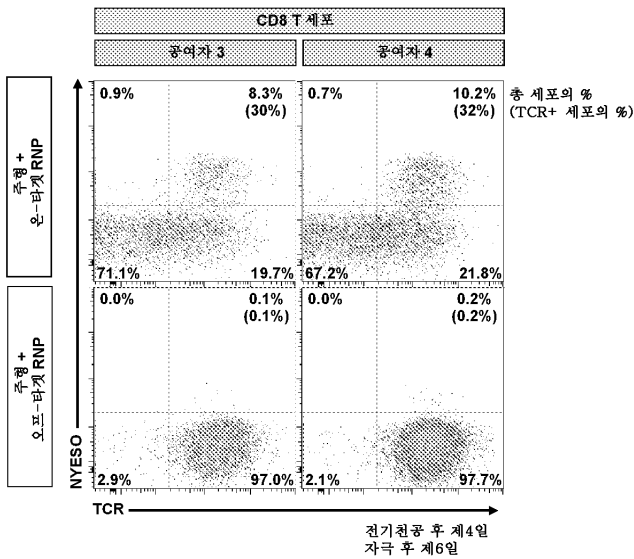
도면4a



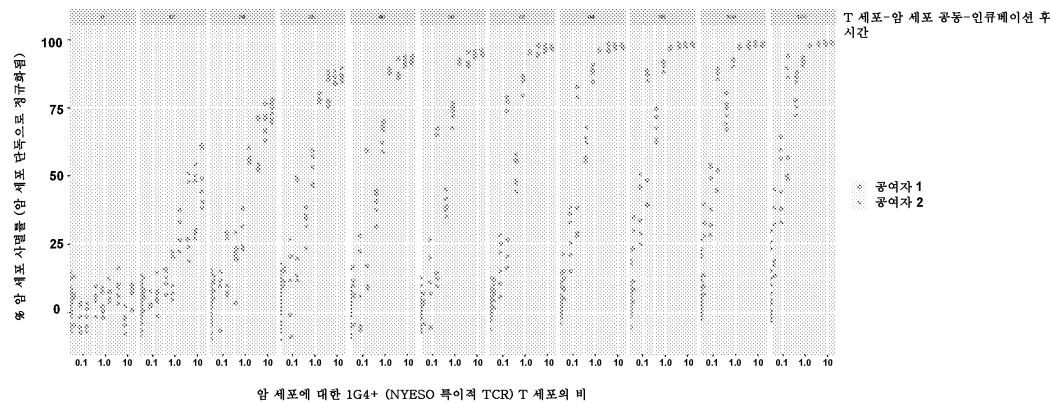
도면4b



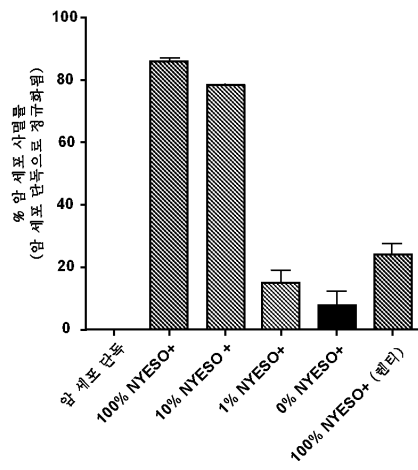
도면5



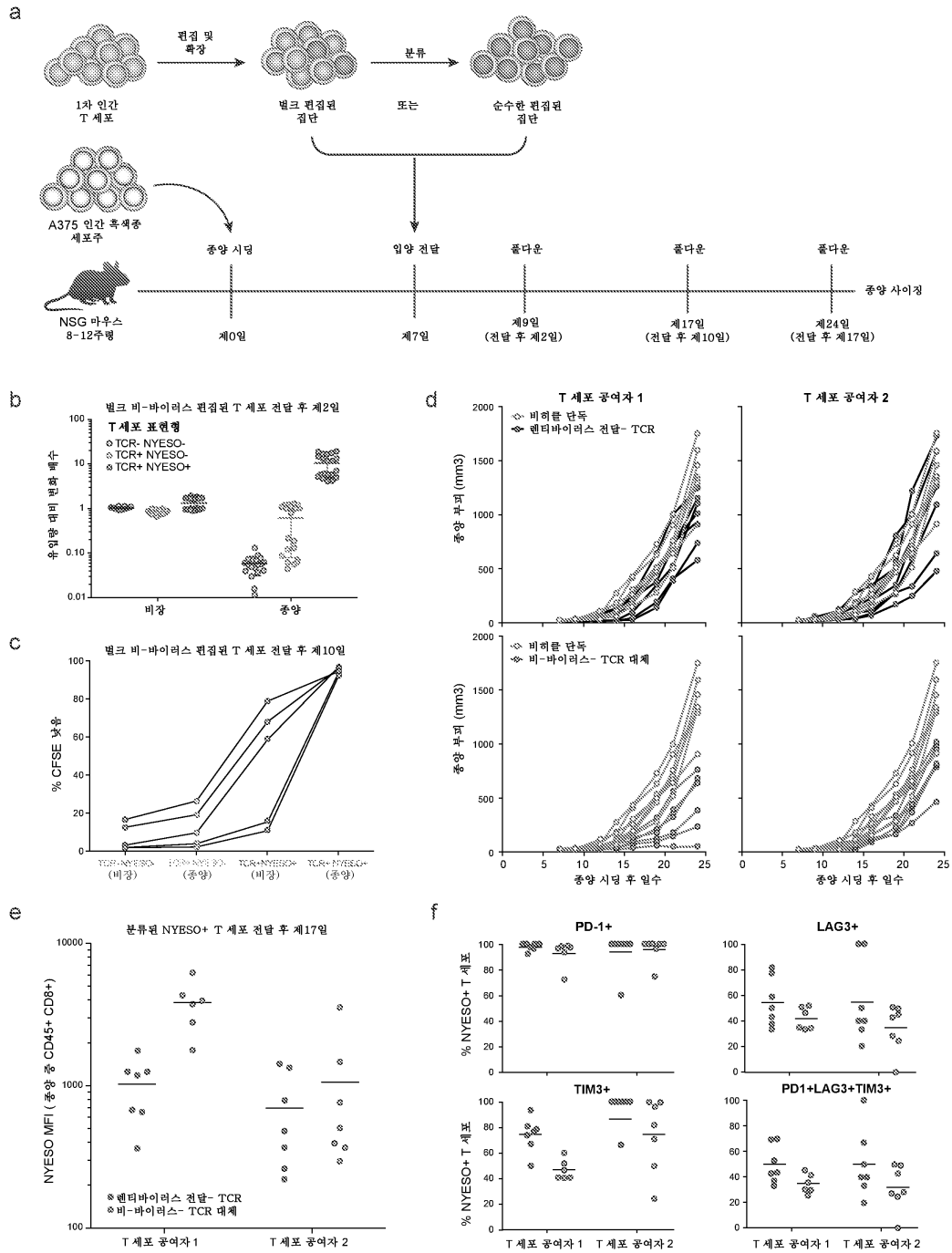
도면6a



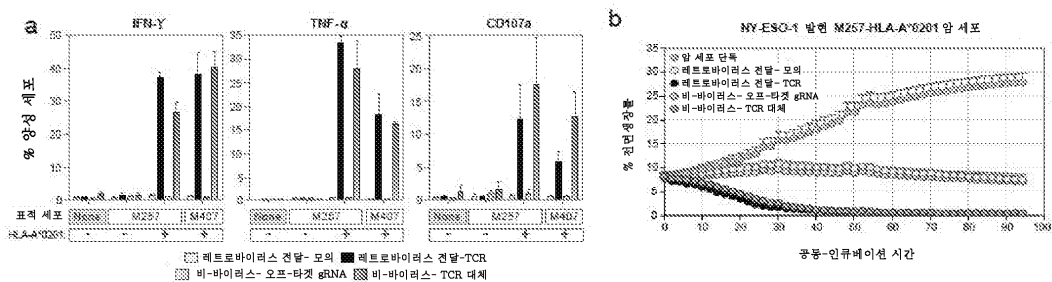
도면6b



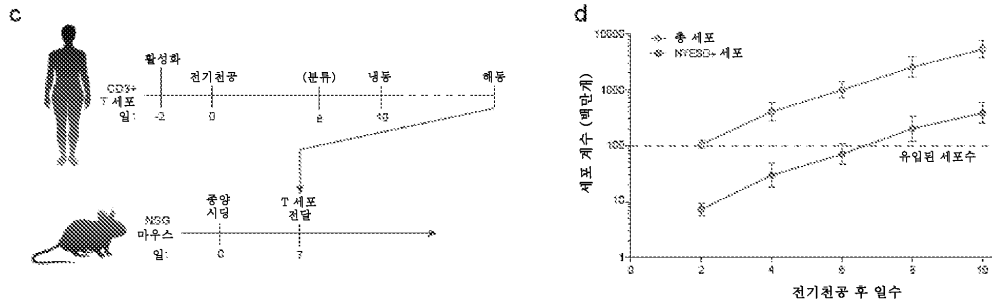
도면7



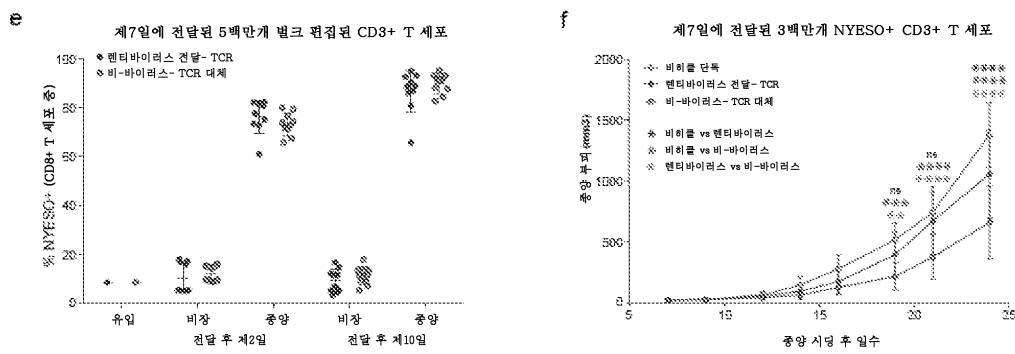
도면8ab



도면8cd

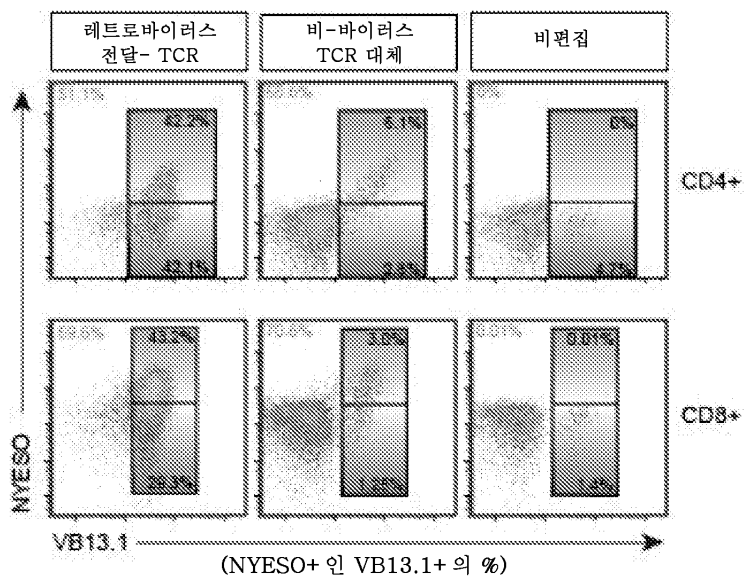


도면8ef

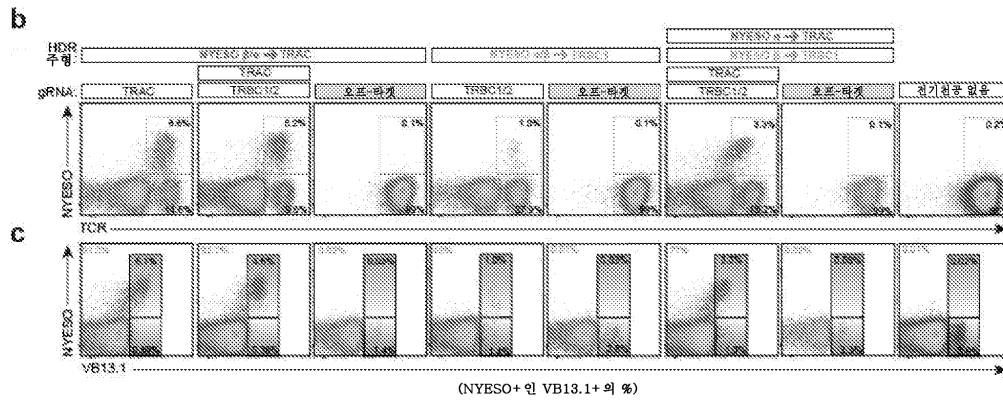


도면9a

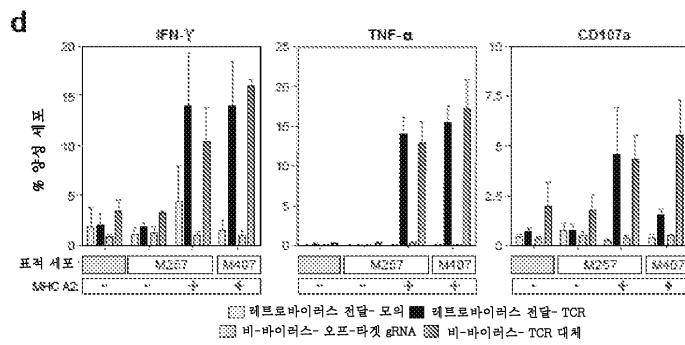
a



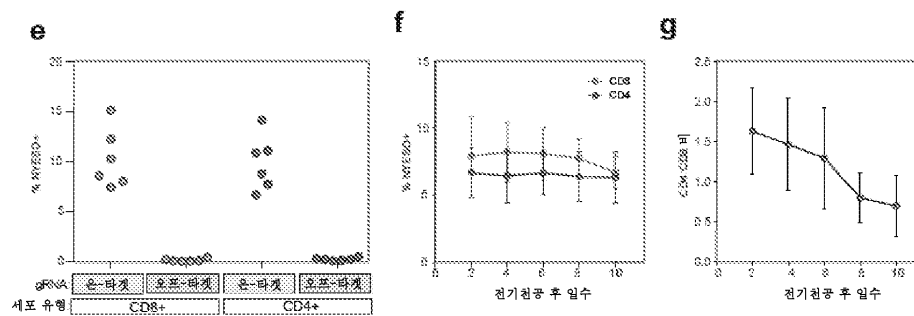
도면9bc



도면9d

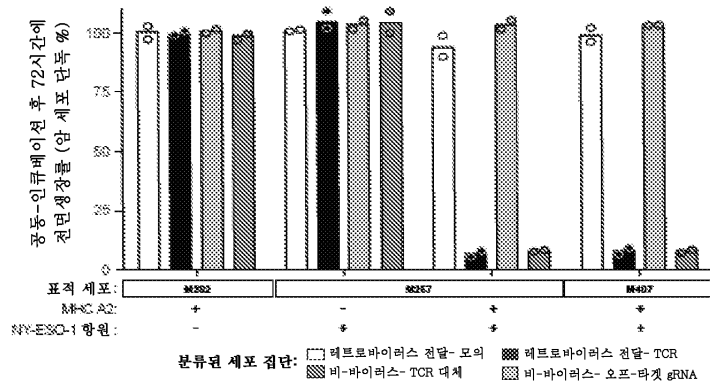


도면9efg



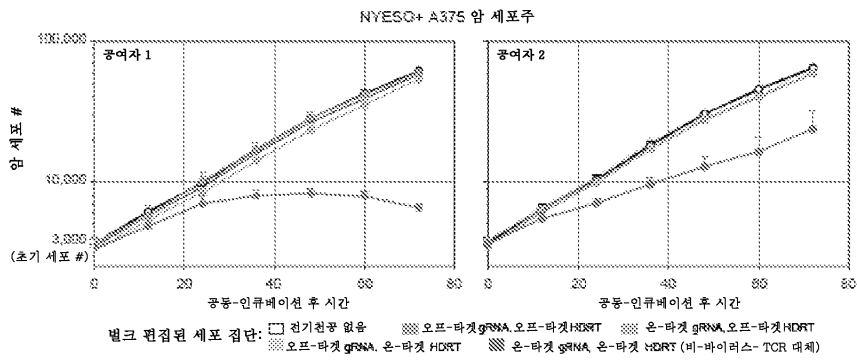
도면9h

h



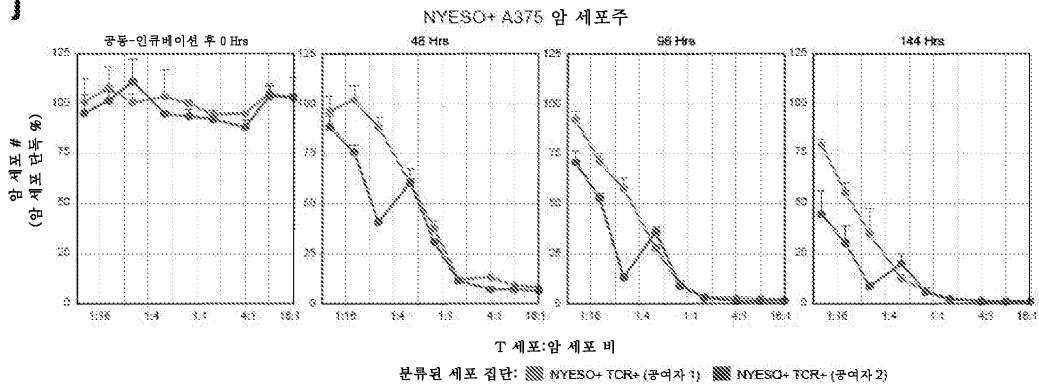
도면9i

i



도면9j

j



도면9k

k

