



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0073679  
(43) 공개일자 2018년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 35/28* (2015.01) *A61K 35/15* (2014.01)  
*A61K 35/17* (2014.01) *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)  
*C12N 15/113* (2010.01) *C12N 15/90* (2006.01)  
*C12N 9/22* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 35/28* (2013.01)  
*A61K 35/15* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7015530
- (22) 출원일자(국제) 2016년11월03일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년05월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/060273
- (87) 국제공개번호 WO 2017/079400  
국제공개일자 2017년05월11일
- (30) 우선권주장  
62/250,561 2015년11월04일 미국(US)

- (71) 출원인  
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아  
미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트 스트리트 3160
- (72) 발명자  
길 자르  
미국, 펜실베니아 19106, 필라델피아, 아파트 4에이, 30 노스 써드 스트리트  
김 미리암  
미국, 펜실베니아 19103, 필라델피아, 아파트 2604, 2400 체스트넛 스트리트
- (74) 대리인  
손민

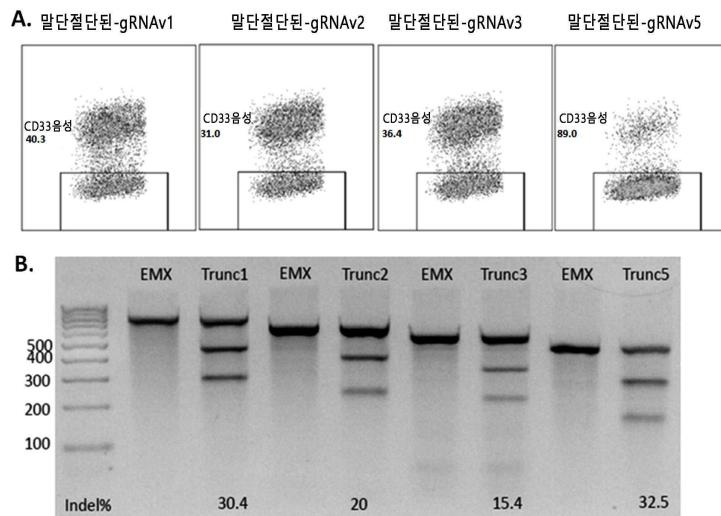
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 조혈 줄기 세포에서의 유전자 편집을 위한 방법 및 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 측면은 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 포함하는 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로서, 여기서, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩ти드를 코딩하는 것인 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 포함한다. 본 발명의 또 다른 측면은 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 입양 요법, 및 병태, 예컨대, 자가면역 질환 또는 암 치료를 위한 방법, 및 그를 위한 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물 또한 포함한다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*A61K 35/17* (2013.01)

*A61K 48/005* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C12N 15/102* (2013.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*C12N 15/907* (2013.01)

*C12N 9/22* (2013.01)

*C12N 2310/20* (2017.05)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 요법을 필요로 하는 대상체에게 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 투여하는 단계로서, 여기서 줄기 세포 또는 전구 세포는 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 포함하고, 여기서 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함하는, CAR T 세포 요법을 필요로 하는 대상체에서 CAR T 세포 요법으로부터 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 보호하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, CAR T 세포 요법을 필요로 하는 대상체에게 CAR T 세포 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 내인성 유전자 발현을 감소시킬 수 있는 핵산이 CRISPR 시스템인 것인 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, CRISPR 시스템이 Cas 발현 벡터 및 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, CRISPR 시스템이 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열과 복합체를 형성한 Cas9 단백질을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 6

제3항에 있어서, CRISPR 시스템이 유도성 프로모터를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, Cas 발현 벡터 중 유도성 프로모터를 활성화시키는 작용제에 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 노출시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 내인성 유전자가 종양 항원을 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 내인성 유전자가 CAR에 의해 표적화되는 종양 세포 상에서 발현되는 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 내인성 유전자가 CD33 또는 CD123을 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 변형된 세포가 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 변형된 내인성 유전자를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 변형된 폴리펩티드가 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 기능과 등가인 적어도 하

나의 기능을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 13

내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함하는, 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, CAR T 세포 요법을 필요로 하는 대상체로부터 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, 세포가 말초 혈액 단핵구 세포, 제대혈 세포, 골수, 림프절, 및 비장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공급원으로부터 수득되는 것인 방법.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 세포가 CD34+인 것인 방법.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 내인성 유전자 발현을 감소시킬 수 있는 핵산이 CRISPR 시스템인 것인 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, CRISPR 시스템이 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열과 복합체를 형성한 Cas9 단백질을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, CRISPR 시스템이 Cas 발현 벡터 및 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 20

제17항에 있어서, CRISPR 시스템이 유도성 프로모터를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, Cas 발현 벡터 중 유도성 프로모터를 활성화시키는 작용제에 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 노출시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 22

제13항에 있어서, 내인성 유전자가 종양 항원을 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 23

제13항에 있어서, 내인성 유전자가 CAR에 의해 표적화되는 종양 세포 상에서 발현되는 것인 방법.

#### 청구항 24

제13항에 있어서, 내인성 유전자가 CD33 및 CD123으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 25

제13항에 있어서, 변형된 내인성 유전자를 변형된 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서, 변형된 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

### 청구항 26

제25항에 있어서, 변형된 폴리펩티드가 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 기능과 등가인 적어도 하나의 기능을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 27

제13항에 있어서, 세포를 확장시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

### 청구항 28

제27항에 있어서, 확장시키는 단계가 핵산을 도입하는 단계 이전에 수행되는 것인 방법.

### 청구항 29

제13항에 있어서, 세포를 냉동보존하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

### 청구항 30

제29항에 있어서, 핵산을 도입하기 이전에 냉동보존된 세포를 해동시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

### 청구항 31

제13항에 있어서, 핵산을 도입하는 단계가 세포를 형질도입하는 공정, 세포를 형질감염시키는 공정, 및 세포를 전기천공시키는 공정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공정에 의해 수행되는 것인 방법.

### 청구항 32

제13항의 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 조성물.

### 청구항 33

제13항의 방법에 따라 생성된 변형된 세포 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

### 청구항 34

입양 세포 전달 요법을 필요로 하는 대상체에게 유효량의, 제13항의 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체를 치료하는 단계로서, 여기서 대상체는 유효량의, 세포 및 내인성 유전자 요법에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 항원 도메인을 표적화하는 CAR T 세포 요법을 투여받는 것인 단계를 포함하는, 입양 세포 전달 요법을 위한 방법.

### 청구항 35

제34항에 있어서, 변형된 세포가 대상체에서 적어도 하나의 혈액 세포 유형으로 분화되는 것인 방법.

### 청구항 36

제34항에 있어서, 변형된 세포가 대상체 내로의 투여 이후 자기 재생이 가능한 것인 방법.

### 청구항 37

병태 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료학상 유효량의, 제13항의 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 투여하고, CAR 요법을 투여하고, 이로써, 병태를 치료하는 단계로서, 여기서 CAR은 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 항원 도메인을 특이적으로 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 단계를 포함하는, 병태 치료를 필요로 하는 대상체에서 병태를 치료하는 방법.

### 청구항 38

제37항에 있어서, 변형된 세포가 대상체에서 적어도 하나의 혈액 세포 유형으로 분화되는 것인 방법.

### 청구항 39

제37항에 있어서, 변형된 세포가 대상체 내로의 투여 이후 자기 재생이 가능한 것인 방법.

#### 청구항 40

제37항에 있어서, 병태가 자가면역 질환인 것인 방법.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 자가면역 질환이 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역성 애디슨병, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 내이 질환 (AIED), 자가면역성 림프증식성 증후군 (ALPS), 자가면역성 혈소판감소성 자반병 (ATP), 베체트병, 심근증, 셀리악 스프루-포진성 피부염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 (CIPD), 반흔성 유사천포장, 한랭응집소증, 크레스트 증후군, 크론병, 디고스병, 소아 피부근염, 원관상 루푸스, 본태성 혼합한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), IgA 신장병증, 인슐린 의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합성 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근육염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 래이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 경피증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 전신 경화증 (SS)으로도 또한 공지됨), 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 다까야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증, 베게너 육아종증, 및 그의 임의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 42

제37항에 있어서, 병태가 암인 것인 방법.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, 암이 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 그의 임의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)하에 2015년 11월 4월 출원된 미국 가특허 출원 번호 62/250,561에 대한 우선권을 주장하고, 상기 가특허 출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

#### 배경 기술

[0003] 강력한 항원 특이적 면역요법, 예컨대, 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 (CART 세포), 항체-약물 접합체 또는 이중특이적 T 세포 관여 항체 (BITE)는 암 치료에 대한 새로운 접근법을 나타낸다. 효능 증가는 B 세포 악성 종양의 CART19 치료로부터 발생하는 B 세포 무형성증 장기화와 같은, 표적 겨냥의 종양의 독성 증가와 연관이 있다. 본질적으로, 이는 상기 양식들 중 어느 것도 악성 세포와, 동일 세포 표면 항원을 보유하는 그의 정상적인 대응물 사이를 구별할 수 없기 때문이다. CART 세포는, 그의 표면 상에 특이적인 항원을 발현하는 세포를 인식하고, 사멸시키도록 T 세포가 유전적으로 조작되는 것인 신규한 요법이다. CAR은 T 세포 표면 수용체의 세포내 신호전달 도메인과 조합된, 항체의 항원 인식 도메인의 하이브리드이다. CD19를 표적화하는 CART 세포는 수개의 I상 임상 시험에서 B 세포 악성 종양에 대하여 효능을 나타내었고 (문헌 [Grupp et al., New England Journal of Medicine. 2013;368: 1509-1518]; [Brentjens et al., Blood. 2011;118: 4817-4828]; 및 [Kochenderfer et al., Blood. 2010;116: 4099-4102]), 정상적인 B 세포를 고갈시킨다. 오래 계속된 B-림프구 감소증은 인간에 의해 널리 용인되는 바, 이러한 특정의 독성은 CART19 이후에 용량을 제한하고 있지 않다. 그러나, 급성 골수성 백혈병 (AML) 항원, 예컨대, CD123 또는 CD33을 표적화하는 CART 세포는 백혈병 세포를 근절시키고, 결과적으로는, 정상적인 골수계 전구체가 동일한 표면 항원을 보유하는 바, 이를 고갈시키며, 이로써, 골수 무형성증을 일으키게 된다. 정상적인 골수계 세포 상에서는 발현되지 않고, AML 세포 상에서는 선택적으로 발현되는 표면 항원이 없다는 점이 AML 및 (골수형성이상 및 골수증식성 신생물을 포함하는) 다른 골수성 질

환에서의 CART 세포 사용을 제한한다.

[0004] 그러므로, 정상적인 골수계 전구체는 고갈시키지 않으면서, 종양 세포를 선택적으로 표적화하는 것이 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구 사항을 충족시켜 준다.

### 발명의 내용

[0005] 본 발명은 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0006] 한 측면에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 요법을 필요로 하는 대상체에서 CAR T 세포 요법으로부터 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 보호하는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 대상체에게 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 투여하는 단계로서, 여기서, 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 포함하고, 여기서, 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 CAR T 세포 요법을 필요로 하는 대상체에게 CAR T 세포 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 세포는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 변형된 내인성 유전자를 추가로 포함한다.

[0007] 또 다른 측면에서, 본 발명은 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 CAR T 세포 요법을 필요로 하는 대상체로부터 세포를 수득하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 변형된 내인성 유전자를 변형된 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서, 변형된 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0008] 한 실시양태에서, 내인성 유전자 발현을 감소시킬 수 있는 핵산은 CRISPR 시스템이다. 한 실시양태에서, CRISPR 시스템은 Cas 발현 벡터 및 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CRISPR 시스템은 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열과 복합체를 형성한 Cas9 단백질을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CRISPR 시스템은 유도성 프로모터를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법은 Cas 발현 벡터 중 유도성 프로모터를 활성화시키는 작용제에 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0009] 한 실시양태에서, 내인성 유전자는 종양 항원을 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 종양 세포 상에서 발현된다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 내인성 유전자는 CD33 또는 CD123을 코딩한다.

[0010] 한 실시양태에서, 변형된 폴리펩티드는 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 기능과 등가인 적어도 하나의 기능을 포함한다.

[0011] 한 실시양태에서, 세포는 말초 혈액 단핵구 세포, 제대혈 세포, 골수, 림프절, 및 비장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공급원으로부터 수득된다.

[0012] 한 실시양태에서, 세포는 CD34+이다. 한 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법은 세포를 확장시키는 단계를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 확장시키는 단계는 핵산을 도입하는 단계 이전에 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법은 세포를 냉동보존하는 단계를 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 방법은 핵산을 도입하기 이전에 냉동보존된 세포를 해동시키는 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 핵산을 도입하는 단계는 세포를 형질도입하는 공정, 세포를 형질감염시키는 공정, 및 세포를 전기천공시키는 공정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 공정에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체에서 적어도 하나의 혈액 세포 유형으로 분화된다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체 내로의 투여 이후 자기 재생이 가능하다.

[0013] 한 측면에서, 본 발명은 본원에서 상기 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 상기 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 입양 세포 전달 요법을 위한 방법을 포함한다. 본 방법은 입양 세포 전달 요법을

필요로 하는 대상체에게 유효량의, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체를 치료하는 단계로서, 여기서, 대상체는 유효량의, 본원에 기술된 세포 및 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 항원 도메인을 표적화하는 CAR 요법을 투여받는 것인 단계를 포함한다.

[0016] 추가의 또 다른 측면에서, 본 발명은 병태 치료를 필요로 하는 대상체에서 병태를 치료하는 방법을 포함한다. 본 방법은 대상체에게 치료학상 유효량의, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 투여하고, CAR T 세포 요법을 투여하고, 이로써, 병태를 치료하는 단계로서, 여기서, CAR은 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 항원 도메인을 특이적으로 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0017] 한 실시양태에서, 병태는 자가면역 질환이다. 또 다른 실시양태에서, 자가면역 질환은 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역성 애디슨병, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 내이 질환 (AIED), 자가면역성 림프증식성 증후군 (ALPS), 자가면역성 혈소판감소성 자반병 (ATP), 베체트병, 심근증, 셀리악 스프루-포진성 피부염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 (CIPD), 반흔성 유사천포창, 한랭응집소증, 크레스트 증후군, 크론병, 디고스병, 소아 피부근염, 원판상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), IgA 신장병증, 인슐린 의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합성 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근육염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 래이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 경폐증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 전신 경화증 (SS)으로도 또한 공지됨), 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 다까야 수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증, 베게너 육아종증, 및 그의 임의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 병태는 암이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 암은 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 그의 임의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

### 도면의 간단한 설명

[0018] 본 발명의 바람직한 실시양태에 관한 하기의 상세한 기술 내용은 첨부된 도면과 함께 판독할 때에 더욱 잘 이해될 것이다. 발명을 예시하기 위해, 이제 바람직한 실시양태를 도면에 제시한다. 그러나, 본 발명은 도면에 제시된 실시양태의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는다는 것을 이해하여야 한다.

도 1a-1b는 CD33 gRNA 스크린을 보여주는 플롯 및 영상 세트이다. Molm14 세포를 1일째에는 Cas9 mRNA로, 및 2일째에는 gRNAv1-5로 전기천공시켰다. 도 1a는 전기천공 후 5일째 수행된 유세포 분석법에 의한 CD33 발현을 보여주는 그래프이다. 도 1b는 gRNA 절단 부위 간의 계놈 DNA의 PCR의 미스매치 절단 검정법 (서베이어 (Surveyor))을 보여주는 영상이다. 대조군 세포는 EMX1에 대한 gRNA로 전기천공시켰다. Indel%=[1- $\sqrt{1-(a+b)/(a+b+c)}$ ]\*100 (a,b: 절단된 밴드의 상태 농도, c: 전장의 밴드의 상태 농도).

도 2a-2b는 동원 말초 혈액으로부터의 CD34+ 세포를 처음에는 Cas9 mRNA로, 및 이어서, CD33 표적화 gRNA로 2회에 걸쳐 전기천공시키거나, 또는 대안적으로, 동일한 gRNA와 복합체를 형성한 Cas9 단백질로 1회에 걸쳐 전기천공시켰다는 것을 보여주는 플롯 세트이다. 도 2a는 전기천공 후 7일째 수행된 유세포 분석법에 의한 CD33 발현에 관한 대표적인 플롯을 보여주는 것이다. 도 2b는 gRNA 표적 부위에 걸쳐 있는 PCR 앰플리콘에 관한 TIDE 분석에 의해 측정된 indel 빈도로서, 상이한 기증자; RNA의 경우, n=4 및 RNP의 경우, n=2에 대한 평균값으로 제시된 것인 indel 빈도를 보여주는 그래프이다.

도 3a-3b는 CART33 세포가 CD33 음성 세포를 표적화하지 않는다는 것을 보여주는 그래프 세트이다. 도 3a는 유세포 분석 탈과립화 검정법으로부터의 결과를 보여주는 것이다. 도 3b는 루시페라제 기반 사멸로부터의 결과를 보여주는 것이다. 모든 경우에서, 이펙터는 CART33 세포이다. TCM = T 세포 배지 단독 (음성 대조군); P-I = PMA 및 이오노마이신 (양성 대조군); MOLM14wt = 유전자가 변형되지 않은, CD33 발현 AML 세포주 MOLM14; D6 = CD33에 대한 MOLM14 KO; 주르카트(Jurkat) = CD33 음성 세포주 (추가의 음성 대조군).

도 4a-4d는 인간 CD34+ 세포에서 CD33 KO를 보여주는 영상 패널이다. 도 4a는 CD33 KO CD34+ 세포에서의 CD33 및 CD38 발현을 보여주는 흐름도 패널이다. 도 4b는 서베이어 DNA 절단 검정법에 의한 미스매치 돌연변이 효율을 보여주는 영상이다. 도 4c는 TOPO 클로닝에 의해 측정된 바와 같은, 개별 돌연변이의 생어(Sanger) 서열분

석 결과를 보여주는 영상이다. 도 4d는 G-CSF 동원 말초 혈액 (mPB), 제대혈, 및 골수로부터 유래된 CD33 KO 세포의 백분율(%)을 보여주는 것이다.

도 5a-5c는 HSC에서 CD33의 KO가 그의 정상적인 성장 및 분화에는 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 플롯 및 영상 시리즈이다. EMX1 유전자좌 (대조군) 또는 CD33 유전자좌의 CRISPR을 겪은 후, CD34+ 세포를 SCF, Flt3L, TPO, 및 IL-6을 함유하는 무혈청 배지 중에서 7일 동안 배양하거나, 또는 대안적으로, 전기천공 직후 반고체 메틸셀룰로스 배지 (메쏘컬트(Methocult)) 상에서 플레이팅하였다. 도 5a는 대조군 (EMX1) 대 CD33 KO HSC 시험관내 배양물의 성장 곡선을 보여주는 그래프이다. 도 5b는 메틸셀룰로스 배지 중의 대조군 대 CD33 KO HSC의 골수계 및 적혈구계 분화를 보여주는 그래프이다. 도 5c는 CD33 KO HSC로부터 유래된 메틸셀룰로스 콜로니로부터의 시토스핀된 세포를 보여주는 것으로, 이는 대조군 세포와 비교된, 전형적인 단핵구 및 과립구 형태를 보여주는 것이다.

도 6은 CD33 KO HSC 메틸셀룰로스 콜로니 및 CD33+ HSC 메틸셀룰로스 콜로니의 면역표현형 분석에 관한 그래프 패널로서, 이는 대조군 HSC 유래 콜로니, CD33KO HSC 유래 콜로니에서의, 및 CD33KO HSC로부터의 잔존 CD33 발현 콜로니에서의 단핵구 및 과립구 분화가 동일하다는 것을 보여주는 것이다.

도 7a-7b는 CART33 세포와 함께 공동 배양된 CD33 KO HSC 분석을 보여주는 그래프 패널이다. 도 7a는 HSC와 비교된, CD33 KO HSC 상에서의 CD3 및 CD45의 발현을 보여주는 것으로, 이는 CART33에의 노출이 CD33KO HSC보다는 대조군 HSC에 대하여 더욱 큰 독성을 띤다는 것을 입증하는 것이고, 이는 도 7b에서 정량화되어 있다.

도 8은 EMX1 또는 CD33 KO HSC가 생착된 마우스는 정상적인 골수계 발생을 나타내었다는 것을 보여주는 그래프이다.

도 9a-9j는 CD33 KO 인간 CD34+ 세포가 장기간 다중 계통 생착이 가능하다는 것을 보여주는 플롯 및 영상 시리즈이다. 도 9a는 G-CSF 동원 말초 혈액으로부터 유래된 1차 인간 CD34+ 세포에서의 CD33 KO 공정을 나타낸 개략도이다. 도 9b는 대조군 또는 CD33 KO HSPC의 메쏘컬트 콜로니 형성 검정법으로부터의 결과를 나타낸 것이다. 두 군 모두에서의 콜로니 형성 단위-과립구 (CFU-G), 콜로니 형성 단위-대식세포 (CFU-M), 및 베스트 형성 단위-적혈구계 (BFU-E)의 대표적인 영상이 제시되어 있다. 도 9c는  $1-5 \times 10^5$  개의 대조군 또는 CD33-KO CD34+ 세포를 주사맞은 8-12주령된 NSG 마우스를 보여주는 것이고, 12주 후에 말초 혈액 인간 CD45+ 생착을 측정하였다 (n=68 마우스; 6회에 걸친 독립 실험; 6명의 상이한 기증자). 도 9d는 도 9c로부터의 인간 CD45+ 세포에서의 게이팅을 보여주는 것이며; B 세포 (CD19+) 및 CD3+ T 세포 (CD3+)는 두 군 사이에 어떤 유의적인 차이도 검출되지 않았다. 도 9e는 (hCD45+CD19-CD3- 세포에서 게이팅) CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서의 인간 골수계 세포는 대조군 HSPC 생착된 마우스와 비교하였을 때, 유의적으로 감소된 수준의 CD33 발현을 나타내었고, CD11b14+ 발현에 있어서는 어떤 차이도 없었다는 것을 보여주는 것이며, 이를 통해 CD33 손실이 골수계 분화에는 영향을 주지 않는다는 것으로 확인할 수 있다. 도 9f는 16주 후에 수확된 골수가 대조군 및 CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서 동일한 수준의 인간 CD45+ 생착을 보였다는 것으로 도시한 것이다. 도 9g는 대조군 또는 CD33 KO HSPC가 생착된 마우스의 골수에서의 인간 줄기 세포 (hCD45+lin-음성 CD34+38-) 및 골수계 전구체 (hCD45+lin-음성 CD34+38+) 수준을 보여주는 것이다. 도 9h는 1차 생착 후 16주째에 NSG 마우스로부터 골수를 수확하고, 2차 수혜자로 전달하고, 추가로 12주 후에 분석하였고; 지속적인 CD33 KO 표현형과 함께 지속적인 인간 생착이 관찰되었다는 것을 보여주는 표이다. 도 9i는 대조군 및 CD33 KO HSPC의 1차 생착 후 16주째에 수확된 골수를 도시한 것으로서, 인간 CD45 발현 수준 (좌측 상단) 및 림프계 및 골수계 계통으로의 분화 수준 (우측 상단)이 동일하였고, 오직 CD33 발현만이 상이하였고 (좌측 하단), 다른 골수계 마커 CD11b 및 CD14에서는 어떤 차이도 없었다 (우측 하단)는 것을 도시한 것이다. 도 9j는 16주 동안의 1차 이식 종료시, 비-림프계 인간 세포 상의 CD33의 발현을 보여주는 것으로서 (비-T 비-B 인간 세포에 대한 게이팅은 제시되지 않음), 이는 이종이식편 생착된 마우스의 골수에서는 장기간에 걸쳐 CD33이 안정적으로 존재하지 않음을 나타내는 것이다.

도 10a-10d는 CD33 KO HSPC가 CART33에 대하여 내성을 띤다는 것을 보여주는 플롯 및 영상 시리즈이다. 도 10a는 대조군 또는 CD33 KO HSPC가 생착된 NSG 마우스에  $5 \times 10^6$  개의 자가 유래 CART33 세포를 제공하고, 4주 경과 후에 잔존 인간 골수계 세포를 사정하였다는 것을 도시한 개략도이다 (n=30 마우스; 2회에 걸친 독립 실험; 2명의 상이한 기증자). 도 10b은 CART33으로 처리된 마우스의 말초 혈액 중에서 CD33을 제거하고, 이를 통해 대조군 HSPC 생착된 마우스에서는 골수계 세포 (CD11b14+)가 제거된 반면, CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서는 골수계 세포가 지속되었다는 것을 보여주는 것이다. 도 10c는 대조군 HSPC 생착된 마우스에서는 골수 제거가 관찰된 반면, CART33 처리 후 CD33 KO HSPC 생착된 마우스의 말초 혈액, 비장, 및 골수에서는 골수계 세포가 검출되

었다는 것을 도시한 것이다. 도 10d는 대조군과 비교하였을 때 CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서는 CART33 처리 후 인간 전구 세포가 유의적으로 증가되었다는 것을 보여주는 것이다.

도 11a-11e는 CART33이 CD33 KO HSPC에는 해를 가하지 않으면서, AML을 근절시킬 수 있다는 것을 보여주는 플롯 및 영상 시리즈이다. 도 11a는 먼저, NSG 마우스에 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 생착시킨 후, 녹색 형광 단백질 및 루시페라제를 발현하도록 조작된 AML 세포주인 Molm14를 주사한 후, CART33으로 처리하였다는 것을 도시한 개략도이다 (n=8 마우스). AML 질환 부담은 생체발광 영상화 (BLI)에 의해 측정한 반면, 인간 HSPC는 말초 혈액의 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 도 11b는 대조군 및 CD33 KO HSPC 생착된 마우스, 둘 모두 CART33 처리 후 AML 질환 관해를 달성하였다는 것을 보여주는 BLI 영상 시리즈이다. 도 11c는 BLI에 의해 측정된 시간 경과에 따른 종양 부담을 보여주는 것이고; 각 라인이 마우스 1마리씩을 나타낸다. 점선은 방사 휘도 배경 수준을 나타낸다. 도 11d는 AML의 CART33 처리 후, CD33 KO HSPC 생착된 마우스는 대조군과 대조적으로 말초 혈액 (PB), 비장, 및 골수 (BM)에서 지속적인 CD14+ 골수계 세포를 나타내었다는 것을 보여주는 것이다. 도 11e는 인간 전구 세포는 오직 CD33 KO HSPC 군에서만 CART33 매개 독성으로부터 해를 입지 않았다는 것을 보여주는 것이다.

도 12a-12f는 CD33 KO HSPC 자손은 어떤 기능적 결함도 없다는 것을 보여주는 플롯 및 영상 시리즈이다. 도 12a는 HSPC 생착된 마우스 골수로부터 수득된 인간 세포의 시토스핀 및 디프-퀵(Diff-Quick) 염색 결과, 일반적인 줄기 세포 (아세포), 골수계 전구체 (전골수세포), 및 최종 이愧터 세포(단핵구 및 중성구)의 특징적인 형태적 특성을 보였다는 것을 도시한 것이다. 도 12b는 시험관내에서 골수계 시토카인 (SCF, TPO, Flt3L, IL-6, GM-CSF, IL-3)으로 분화시키고, 파고솜에서 산성화되었을 때, 녹색 형광을 보이는 pH로도(pHrodo) 녹색 E. 콜라 이(*E. coli*) 생체입자와 함께 인큐베이션시킨 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 보여주는 것이며; 식세포 작용(%)은 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 상단, 대조군 및 CD33 KO 세포로부터의 대표 플로우 플롯; 하단, 4명의 상이한 기증자를 이용하여 수행된 2회에 걸친 독립 실험으로부터의 식세포 작용 정량화. 도 12c-12d는 5명의 동원 말초 혈액 기증자로부터의 대조군 및 CD33 KO CD34+ 세포가 시험관내에서 분화되었고, RNA-seq에 의해 유전자 발현을 분석하였다는 것을 보여주는 것이다. 도 12c는 열 지도로 제시된, 차별적으로 발현된 유전자의 변화 배수를 도시한 것으로, 여기서, 각 행은 유전자에 상응하고, 각 열은 대조군 (ctrl) 또는 CD33 KO (KO)로부터의 한 샘플을 나타내고; 번호는 원 기증자를 나타낸다. 열 및 행은 계층적 클러스터링에 의해 조직화된 것이며; 계통수 분지 길이는 샘플과 클러스터 사이의 길이를 나타낸다. 도 12d는 대조군 및 CD33 KO 샘플의 평균 유전자 발현 값의 로그 스케일 산점도이다. 결정 계수 (R<sup>2</sup>) 값이 제시되어 있다. 도 12e는 대조군 또는 CD33 KO HSPC가 생착된 마우스에 rhG-CSF를 주사하고, 말초 혈액 인간 단핵구 (CD11b+14+) 및 중성구 (CD11b+14-)의 절대 개수를 측정한 것을 보여주는 것이고; 기준선 수준 대비 세포 개수의 변화 배수가 제시되어 있다. 도 12f는 대조군 또는 CD33 KO HSPC가 생착된 마우스에 지질다당류를 주사하고, 혈청내 인간 시토카인 수준은 측정한 것을 도시한 것이다.

도 13a-13b는 CD33 KO HSPC의 오프-타겟 평가를 도시한 영상 시리즈이다. 도 13a는 2가지 웹 기반 도구로부터 인실리코 예측된 상위 12개의 오프-타겟 부위를 보여주는 표이다. 도 13b의 상단 패널은 슈도진인 SIGLEC22P가 CD33 유전자와 고도의 상동성을 가지며, 여기서, 본원에서 사용되는 CD33 표적화 gRNA의 결합 부위와 100% 동일하다는 것을 보여주는 것이다. 도 13b의 하단 패널은 다른 SIGLEC 유전자에서는 서베이어 미스매치 검정법에 의해 어떤 돌연변이도 검출되지 않은 반면, CD33 및 SIGLEC22P에서는 고도의 온-타겟 돌연변이가 발견된다는 것을 보여주는 것이다.

도 14a-14b는 레서스 마카크에서의 자가 유래 CD33 KO 줄기 세포 이식을 도시한 플롯 및 영상 시리즈이다. 도 14a는 G-CSF 및 플래릭사포르를 사용하여 레서스 CD34+ HSPC를 동원하고, 성분채집술에 의해 제거하고, CD33의 CRISPR/Cas9 기반 유전자 네아웃으로 유전자 편집을 수행하는, 실험 개요를 보여주는 것이다. 그 동안, 원숭이를 방사선 조사 (TBI)로 조절하고, 이후, 편집된 HSPC의 재주입을 받도록 한다. 우측 상단 패널에는 대조군 및 KO 세포에서의 시험관내에서 분화된 HSPC에서의 CD33 발현에 관한 유세포 분석 평가가 제시되어 있고, 우측 하단 패널에는 CD33 유전자좌의 서열분석의 TIDE 분석이 제시되어 있다. 도 14b는 도 14a에서 이식을 받은 동물의 PB로부터의 선택된 하위집단 상에서의 CD33의 발현을 보여주는 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 정의

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본원에 기술된 것과 유사하거나, 또는 등가인

임의의 방법 및 물질이 본 발명의 시험을 위한 실시에 사용될 수 있지만, 본원에서는 바람직한 물질 및 방법이 기술된다. 본 발명의 기재 및 청구에서, 하기의 용어가 사용될 것이다.

- [0021] 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시양태를 기술하기 위한 것이며, 제한하고자 하는 것은 아니라는 것 또한 이해하여야 한다.
- [0022] 본원에 사용된 "한"("a" 및 "an")이라는 관사는 상기 관사의 하나 또는 1 초과의 (즉, 적어도 하나의)의 문법상의 목적어를 지칭한다. 예로서, "한 요소"는 하나의 요소 또는 1 초과의 요소를 지칭한다.
- [0023] 측정가능한 값, 예컨대, 양, 시간상 지속기간과 같은 측정가능한 값을 언급할 때 본원에서 사용되는 "약"은 명시된 값의  $\pm 20\%$  또는  $\pm 10\%$ , 더욱 바람직하게,  $\pm 5\%$ , 더욱더 바람직하게,  $\pm 1\%$ , 및 더욱더 바람직하게,  $\pm 0.1\%$ 의 편차를 포함하는 것으로 하는데, 그 이유는 상기와 같은 편차가 개시된 방법을 수행하는 데 적합하기 때문이다.
- [0024] 본원에서 사용되는 바, "항체"라는 용어는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원으로부터, 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 무손상 면역글로불린일 수 있고, 무손상 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 항체는 전형적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 본 발명에서 항체는 예를 들어, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, Fv, Fab 및 F(ab)<sub>2</sub> 뿐만 아니라, 단일 쇄 항체 (scFv) 및 인간화 항체를 비롯한, 다양한 형태로 존재할 수 있다. (문헌 [Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY]; [Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York]; [Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; [Bird et al., 1988, Science 242:423-426]).
- [0025] 본원에서 사용되는 바, "항원" 또는 "Ag"라는 용어는 면역반응을 일으키는 분자로서 정의된다. 상기 면역 반응은 항체 생산, 또는 특이적인 면역-적격 세포의 활성화, 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다. 당업자는 실질적으로 모든 단백질 또는 웨პ티드를 비롯한 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 알 것이다. 추가로, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 이로써 면역 반응을 일으키는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA는 항원이라는 용어가 본원에 사용되는 바와 같은 "항원"을 코딩한다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 추가로, 본 분야의 당업자는 항원이 오직 유전자의 전장의 뉴클레오티드 서열에 의해서만 코딩되어야 할 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 1 초과의 유전자의 부분적인 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하나, 이에 제한되지 않고, 상기 뉴클레오티드 서열은 원하는 면역 반응을 일으키기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것이 쉽게 자명해진다. 더욱이, 항원이 "유전자"에 의해 코딩되어야 할 필요는 없다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 항원은 합성되어 생성되거나, 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있다는 것이 쉽게 자명해진다. 상기와 같은 생물학적 샘플은 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본원에서 사용되는 바, "항-종양 효과"라는 용어는 종양 부피의 감소, 종양 세포수의 감소, 전이수의 감소, 기대 수명의 증가, 또는 암성 병태와 연관된 다양한 생리학적 증상들의 호전에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항-종양 효과"는 또한 우선 종양 발생의 예방에 있어서 본 발명의 웨პ티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 나타날 수 있다.
- [0027] "자가-항원"이라는 용어는 본 발명에 따르면, 면역계에 의해 외부인 것으로서 인식되는 임의의 자기-항원을 의미한다. 자가-항원은 세포 표면 수용체를 비롯한, 세포 단백질, 인단백질, 세포 표면 단백질, 세포 지질, 핵산, 당단백질을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본원에서 사용되는 바, "자가면역 질환"이라는 용어는 자가면역 반응으로부터 초래되는 장애로서 정의된다. 자가면역 질환은 자기-항원에 대한 부적합하고, 과도한 반응의 결과이다. 자가면역 질환의 예로는 그 중에서도 특히 애디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척추염, 자가면역성 간염, 자가면역 이하선염, 크론병, (I형) 당뇨병, 이영양성 수포성 표피 박리증, 부고환염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랭-바雷 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 전신 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상성 천포창, 건선, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 척추관절병증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수증, 악성 빈혈, 궤양성 대장염을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본원에서 사용되는 바, "자가 유래"라는 용어는 추후 개체 내로 재-도입되는 동일한 개체로부터 유래되는 임의의 물질을 지칭하고자 한다.

- [0030] "동종이계"란, 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 이식편을 지칭한다.
- [0031] "이종발생성"이란, 상이한 종의 동물로부터 유래된 이식편을 지칭한다.
- [0032] 본원에서 사용되는 바, "암"이라는 용어는 비정상적인 세포의 급속하고, 비조절된 성장을 특징으로 하는 질환으로서 정의된다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 각종 암의 예로는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 암은 갑상선 수질 암종이다.
- [0033] 본원에서 사용되는 바, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이라는 용어는 면역 이谶터 세포 상에서 발현되고, 항원에 특이적으로 결합하도록 조작된, 인공 T 세포 수용체를 지칭한다. CAR은 면역 이谶터 세포를 이용하는 방법으로서 사용될 수 있다. T 세포를 환자로부터 떼어내고, 특정 형태의 항원에 특이적인 수용체를 발현하도록 이를 변형시킨다. 일부 실시양태에서, CAR은 예를 들어, 종양 연관 항원에 대한 특이성을 가지고 발현된다. CAR은 또한 세포내 활성화 도메인, 막횡단 도메인, 및 종양 연관 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, CAR은 모노클로날 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함한다. CAR 디자인의 특이성은 수용체 (예컨대, 펩티드)의 리간드로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 종양 연관 항원에 특이적인 CAR을 발현하는 T 세포의 특이성을 재지정함으로써 암을 표적화할 수 있다.
- [0034] "절단"이라는 용어는 예컨대, 핵산 분자의 골격에서의 공유 결합의 과단을 지칭한다. 절단은 포스포디에스테르 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 방법에 의해 개시될 수 있다. 단일 가닥 절단 및 이중 가닥 절단, 둘 모두 가능하다. 이중 가닥 절단은 2개의 상이한 단일 가닥 이벤트의 결과로서 발생할 수 있다. DNA 절단을 통해 평활 말단 또는 엇갈린 말단이 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 절단된 이중 가닥 DNA를 표적화하는 데 사용될 수 있다.
- [0035] 본원에서 사용되는 바, "보존적 서열 변형"이라는 용어는 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특징에 유의적으로 영향을 미치지 않거나, 또는 상기 특징을 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하고자 한다. 상기와 같은 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 당업계에 공지된 표준 기술, 예컨대, 부위 지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 변형을 본 발명의 항체 내로 도입시킬 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에서 정의되었다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가지는 아미노산들을 포함한다. 따라서, 항체의 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 항체는 본원에 기술된 기능 검정법을 사용하여 항원에 결합할 수 있는 능력에 대해 시험될 수 있다.
- [0036] "CRISPR/CAS," "일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문구조 반복부 시스템," 또는 "CRISPR"이라는 용어는 염기 서열의 짧은 반복부를 함유하는 DNA 유전자좌를 지칭한다. 각 반복부 다음에는 이전의 바이러스에의 노출로부터의 스페이서 DNA의 짧은 세그먼트가 이어진다. 박테리아 및 고세균은 외부 핵산의 분해를 유도하는 데 짧은 RNA를 사용하는, CRISPR-CRISPR 연관 (Cas) 시스템이라 불리는, 적응 면역 방어를 진화시켰다. 박테리아에서, CRISPR 시스템은 RNA-가이드된 DNA 절단을 통해 침입 외부 DNA에 대한 후천 면역을 제공한다.
- [0037] II형 CRISPR/Cas 시스템에서, "스페이서"로 불리는, 외부 DNA의 짧은 세그먼트는 CRISPR 게놈 유전자좌 내에서 통합되고, 짧은 CRISPR RNA (crRNA)로 전사되고, 프로세싱된다. 이들 crRNA는 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA)에 어닐링되고, Cas 단백질에 의한 병원성 DNA의 서열-특이적 절단 및 침묵화를 지시한다. Cas9 단백질에 의한 표적 인식을 위해서는 crRNA 내에 "시드" 서열 및 crRNA-결합 영역의 상류 쪽에 보존되는 디뉴클레오티드-함유 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열이 요구된다는 것이 최근 연구를 통해 밝혀졌다.
- [0038] 관심 서열을 절단하도록 Cas9를 지시하기 위해, 이하 "가이드 RNA" 또는 "gRNA"로 지칭되는 crRNA-tracrRNA 융합 전사체는 인간 U6 폴리미라제 III 프로모터로부터 디자인될 수 있다. CRISPR/CAS 매개 게놈 편집 및 조절은 기초 과학, 세포 공학 및 치료학을 위한 그의 변화시킬 수 있는 잠재능을 강조하였다.
- [0039] "CRISPRi"라는 용어는 서열 특이적인 유전자 억제 또는 예컨대, 전사 수준에서의 유전자 발현의 억제를 위한 CRISPR 시스템을 지칭한다.

- [0040] "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 없고, 상기 질환이 호전되지 않을 경우에는, 동물의 건강이 계속해서 악화되는 것인 동물의 건강 상태이다. 그에 반해, "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수는 있지만, 동물의 건강 상태는 상기 장애가 없는 경우보다는 덜 유리한 동물의 건강 상태이다. 치료하지 않고 방치할 경우, 장애는 동물의 건강 상태를 반드시 추가적으로 저하시키는 것은 아니다.
- [0041] 본원에서 사용되는 바, "하향조절"이라는 용어는 하나 이상의 유전자 또는 그의 일부의 유전자 발현 감소 또는 제거를 지칭한다.
- [0042] "유효량" 또는 "치료학상 유효량"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 특정 생물학적 결과를 달성하거나, 치료학적 또는 예방학적 이점을 제공하는 데 효과적인, 본원에 기술된 바와 같은 화합물, 제제, 물질 또는 조성물의 양을 지칭한다. 상기와 같은 결과는 당업계에서 적합한 임의의 수단에 의해 측정되는 바와 같은 항-종양 활성을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] "코딩"이란, 뉴클레오티드 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 한정된 서열 또는 아미노산의 한정된 서열을 가지는 생물학적 공정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용하기 위한, 예컨대, 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드 중의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유한 특성 및 그로부터 생성되는 생물학적 특성을 지칭한다. 따라서, 유전자는 상기 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물계에서 단백질을 생산한다면, 상기 단백질을 코딩하는 것이다. 그의 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고, 일반적으로 서열 목록에 제공되는 것인 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용되는 것인 비-코딩 가닥, 둘 모두 상기 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코딩하는 것으로 지칭될 수 있다.
- [0044] 본원에서 사용되는 바 "내인성"이란, 유기체, 세포, 조직 또는 계로부터의, 또는 그 내부에서 생산되는 임의의 물질이라는 것을 지칭한다.
- [0045] 본원에서 사용되는 바, "외인성"이라는 용어는 유기체, 세포, 조직 또는 계로부터 도입되거나, 또는 그 외부에서 생산되는 임의의 물질이라는 것을 지칭한다.
- [0046] 본원에서 사용되는 바, "확장시키다"라는 용어는 세포 수의 증가에서와 같은 수의 증가를 지칭한다. 한 실시양태에서, 생체외에서 확장되는 세포는 배양물 중에 원래 존재하는 수에 비해 수가 증가한다. 또 다른 실시양태에서, 생체외에서 확장되는 세포는 배양물 중의 다른 세포 유형에 비해 수가 증가한다. 본원에서 사용되는 바, "생체외"라는 용어는 살아있는 유기체 (예컨대, 인간)로부터 제거되고, 유기체 밖에서 (예컨대, 배양 디쉬, 시험관, 또는 생물반응기 내에서) 증식된 세포를 지칭한다.
- [0047] 본원에서 사용되는 바, "발현"이라는 용어는 특정 뉴클레오티드 서열의 그의 프로모터에 의해 구동되는 전사 및 /또는 번역으로 정의된다.
- [0048] "발현 벡터"란, 발현시키고자 하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용 요소를 포함하고; 다른 발현 요소는 숙주 세포 또는 시험관내 발현 시스템에 의해 공급받을 수 있다. 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 당업계에 공지된 모든 벡터들, 예컨대, 코스미드, 플라스미드 (예컨대, 네이키드 플라스미드 또는 리포솜 중에 함유된 플라스미드) 및 바이러스 (예컨대, 센다이 바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)를 포함한다.
- [0049] "조혈 줄기 세포" 또는 "HSC"라는 용어는 모든 혈액 세포 유형, 골수계 및 림프계 세포로 분화될 수 있는 미분화된 조혈 세포를 지칭한다. HSC는 골수에 상주할 수 있거나, 또는 다른 곳, 예컨대, 말초 혈액에서 발견될 수 있다.
- [0050] 본원에서 사용되는 바, "상동성"이란, 두 중합체 분자 사이의, 예컨대, 두 핵산 분자, 예컨대, 두 DNA 분자 또는 두 RNA 분자 사이의, 또는 두 폴리펩ти드 분자 사이의 서브유니트 서열 동일성을 지칭한다. 두 분자 모두 중의 서브유니트 위치가 동일한 단량체 서브유니트에 의해 점유되는 경우; 예컨대, 각각의 두 DNA 분자 중의 한 위치가 아데닌에 의해 점유되었다면, 이때 이들은 상기 위치에서 상동성인 것이다. 두 서열 사이의 상동성은 매칭되거나, 상동성인 위치의 개수의 직접적인 함수이다; 예컨대, 두 서열에서 위치의 절반 (예컨대, 길이가 10 개의 서브유니트 길이인 중합체에서 5개의 위치)이 상동성인 경우, 두 서열은 50% 상동성이고; 위치의 90% (예컨대, 10개 중 9개)가 매칭되거나, 상동성인 경우, 두 서열은 90% 상동성이다.
- [0051] 본원에서 사용되는 바, "동일성"이란, 두 중합체 분자 사이의, 특히, 두 아미노산 분자 사이의, 예컨대, 폴리펩

티드 분자 사이의 서브유니트 서열 동일성을 지칭한다. 두 아미노산 서열이 동일한 위치에서 동일한 잔기를 가지는 경우; 예컨대, 각각의 두 폴리펩티드 분자 중의 한 위치가 아르기닌에 의해 점유되었다면, 이때 이들은 상기 위치에서 동일한 것이다. 동일성, 또는 두 아미노산 서열이 정렬되었을 때, 동일한 위치에서 동일한 잔기를 가지는 정도는 대개 백분율(%)로서 표현된다. 두 아미노산 서열 사이의 동일성을 매칭되거나, 동일한 위치의 개수의 직접적인 함수이다; 예컨대, 두 서열에서 위치의 절반 (예컨대, 길이가 10개의 아미노산 길이인 중합체에서 5개의 위치)이 동일한 경우, 두 서열은 50% 동일하고; 위치의 90% (예컨대, 10개 중 9개)가 매칭되거나, 동일한 경우, 두 아미노산 서열은 90% 동일하다.

[0052] 본원에서 사용되는 바, "면역 반응"이라는 용어는 림프구가 항원 분자를 외부인 것으로 인식하여 항체의 형성을 유도하고/거나, 림프구를 활성화시켜 상기 항원을 제거할 때 발생하는 항원에 대한 세포 반응으로서 정의된다.

[0053] 본원에서 사용되는 바, "설명서"는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전달하는 데 사용될 수 있는 간행물, 기록물, 도해, 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 키트의 설명서는 본 발명의 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 부착되거나, 또는 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 배송될 수 있다. 대안적으로, 설명서는 수령자가 상기 설명서 및 화합물을 협력하여 사용할 수 있도록 하는 의도로 용기와 별도로 배송될 수도 있다.

[0054] "단리된"이란, 자연 상태로부터 변경되거나 제거되었다는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물 중에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니고, 그의 자연 상태의 공존 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재하거나, 또는 예를 들어, 숙주 세포와 같은 비-천연 환경에 존재할 수 있다.

[0055] 본원에서 사용되는 바, "넉아웃" 또는 "KO"라는 용어는 하나 이상의 유전자의 유전자 발현의 제거를 지칭한다.

[0056] 본원에서 사용되는 바, "렌티바이러스"란, 레트로비리다에(*Retroviridae*) 과의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 레트로바이러스들 중에서도 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있다는 점에서 독특하며; 이는 상당량의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA 내로 전달할 수 있고, 이로써, 이는 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV가 렌티바이러스의 모든 예이다. 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 생체내에서 유의 수준의 유전자 전달을 달성할 수 있는 수단을 제공한다.

[0057] 본원에서 사용되는 바, "변형된"이라는 용어는 본 발명의 문자 또는 세포의 변화된 상태 또는 구조를 의미한다. 문자는 다수의 방식으로, 예를 들어 화학적으로, 구조적으로 및 기능적으로 변형될 수 있다. 세포는 핵산의 도입을 통해 변형될 수 있다.

[0058] 본원에서 사용되는 바, "조절하는"이라는 용어는 치료 또는 화합물 부재하에서의 대상체의 반응 수준과 비교하여, 및/또는 다른 것은 동일하지만, 치료받지 않은 대상체에서의 반응 수준과 비교하여, 대상체에서 반응 수준의 검출가능한 증가 또는 감소를 매개하는 것을 의미한다. 상기 용어는 대상체, 바람직하게, 인간에서 천연 신호 또는 반응을 교란시키고/거나, 그에 영향을 줌으로써 유익한 치료학적 반응을 매개하는 것을 포함한다.

[0059] 본 발명과 관련하여, 통상적으로 존재하는 핵산 염기에 대하여 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 유리딘을 지칭한다.

[0060] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은 서로의 축퇴 버전이고, 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이라는 어구는 또한 일부 버전에서는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.

[0061] "작동가능하게 연결된"이라는 용어는 이종성 핵산 서열이 발현될 수 있도록 하는, 조절 서열과 이종성 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 지칭한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적인 관계로 배치되어 있을 때, 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결되어 있는 것이다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 준다면, 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 것이다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 인접해 있고, 두 단백질 코딩 영역을 연결하는 것이 필요할 경우, 동일한 리딩 프레임 내에 존재한다.

[0062] "과다발현된" 종양 항원 또는 종양 항원의 "과다발현"이라는 용어는 환자의 특정한 조직 또는 기관내 고형 종양과 같은 질환 부위로부터의 세포에서의 종양 항원의 발현 수준이 상기 조직 또는 기관으로부터의 정상 세포에

서의 발현 수준에 비해 비정상적이라는 것을 나타내는 것으로 의도된다. 종양 항원의 과다발현을 특징으로 하는 고형 종양 또는 혈액학상 악성 종양을 앓는 환자를 당업계에 공지된 표준 검정법에 의해 측정할 수 있다.

[0063] 면역원성 조성물의 "비경구적" 투여는 예컨대, 피하 (s.c.), 정맥내 (i.v.), 근육내 (i.m.), 또는 흉골내 주사, 또는 주입 기법을 포함한다.

[0064] 본원에서 사용되는 바, "펩티드," "폴리펩티드," 및 "단백질"이라는 용어는 상호교환적으로 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기들로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유하여야 하고, 단백질 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 개수에 대해서는 어떤 제한도 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로에 결합된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 상기 용어는 단쇄 (이는 또한 당업계에서 통상적으로 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로 지칭됨), 및 더욱 긴 장쇄 (당업계에서 일반적으로 단백질로 지칭됨), 둘 모두를 지칭하며, 이들 중 다수의 유형이 존재한다. "폴리펩티드"는 특히, 예를 들어, 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동성인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 그의 조합을 포함한다.

[0065] 본원에서 사용되는 바, "폴리뉴클레오티드"라는 용어는 뉴클레오티드의 쇄로서 정의된다. 추가로, 핵산은 뉴클레오티드의 종합체이다. 따라서, 본원에서 사용되는 바, 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 상호교환이 가능하다. 본 분야의 당업자는 핵산이 폴리뉴클레오티드이며, 이는 단량체성 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있다는 일반적인 지식을 알고 있다. 단량체성 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 폴리뉴클레오티드는 제한 없이, 재조합 수단, 즉, 재조합 라이브러리 또는 세포 계놈으로부터의 핵산 서열의 클로닝, 통상의 클로닝 기술 및 PCR™ 등의 사용, 및 합성 수단에 의한 것을 비롯한, 당업계에서 이용가능한 임의의 수단에 의해 수득되는 모든 핵산 서열을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] "그의 일부"라는 용어는 전체의 일부분 또는 그의 단편을 지칭한다.

[0067] "조혈 전구 세포"라는 용어는 적어도 하나의 혈액 세포 유형으로 분화되고, 모든 혈액 세포, 예컨대, HSC가 아닌, 여러 혈액 세포 유형으로까지 분화될 수 있는 미분화된 조혈 세포를 지칭한다. 조혈 전구 세포의 예로는 일반 골수계 전구 세포, 거핵구-직혈구 전구 세포, 과립구-대식세포 전구 세포, 단핵구-수지상 전구 세포, 및 일반 림프계 전구 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본원에서 사용되는 바, "프로모터"라는 용어는 폴리뉴클레오티드 서열의 특이적인 전사를 개시시키는 데 요구되는, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열로서 정의된다.

[0069] 본원에서 사용되는 바, "프로모터/조절 서열"이라는 용어는 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 생성물의 발현에 요구되는 핵산 서열을 의미한다. 일부 경우에서, 상기 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 경우에서, 상기 서열은 또한 유전자 생성물의 발현에 요구되는 인핸서 서열 및 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절 서열은 예를 들어, 조직 특이적인 방식으로 유전자 생성물을 발현하는 것일 수 있다.

[0070] "구성적" 프로모터는, 유전자 생성물을 코딩하거나, 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되었을 때, 세포의 대부분의 또는 모든 생리적 조건하에 세포 중에서 유전자 생성물이 생성될 수 있도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0071] "유도성" 프로모터는 유전자 생성물을 코딩하거나, 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되었을 때, 실질적으로는 오직 프로모터에 상응하는 유도물질이 세포 중에 존재하는 경우에만 세포 중에서 유전자 생성물이 생성될 수 있도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0072] "조직 특이적" 프로모터는 유전자를 코딩하거나, 유전자에 의해 명시되는 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되었을 때, 실질적으로는 오직 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 세포 중에서 유전자 생성물이 생성될 수 있도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0073] "센다이 바이러스"란, 란, 파라믹소비리다에(*Paramyxoviridae*) 과의 속을 지칭한다. 센다이 바이러스는 숙주 계놈 내로 통합되지 않거나, 숙주 세포의 유전 정보를 변경시키지 않는, 음성 단일 가닥 RNA 바이러스이다. 센다이 바이러스는 매우 광범위한 숙주 범위를 가지고, 인간에 대해서는 병원성을 띠지 않는다. 재조합 바이러스 백터로서 사용되는 바, 센다이 바이러스는 일파성이지만, 강력한 유전자 발현이 가능하다.

[0074] "신호 전달 경로"란, 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로의 신호의 전달에서 중요한 역할을 하는

다양한 신호 전달 분자들 사이의 생화학적 관계를 지칭한다. "세포 표면 수용체"라는 어구는 신호를 수용하고, 세포의 원형질막을 가로질러 신호를 전송할 수 있는 분자 및 분자들의 복합체를 포함한다.

[0075] 본원에서 사용되는 바, 항체와 관련하여 "특이적으로 결합한다"라는 용어는 항체가 샘플 중 특정 항원은 인식하지만, 실질적으로 다른 분자는 인식하거나, 또는 그에 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 하나 이상의 종으로부터의 상기 항원에도 또한 결합할 수 있다. 그러나, 상기와 같은 이종간 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로서 변경시키지 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 항원의 상이한 대립유전자 형태에도 또한 결합할 수 있다. 그러나, 상기와 같은 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로서 변경시키지 않는다. 일부 경우에서, "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이라는 용어는 항체, 단백질 또는 웨티드와 제2 화학 종과의 상호작용과 관련하여, 상호작용이 화학 종상의 특정 구조 (예컨대, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하는 데 사용될 수 있고; 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질보다는 특이적인 단백질 구조를 인식하고, 그에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 A (또는 프리, 비표지 A)를 함유하는 분자의 존재는 상기 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0076] "자극"이라는 용어는 자극 분자 (예컨대, TCR/CD3 복합체)가 그의 동족 리간드와 결합하여 신호 전달 이벤트, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달을 매개함으로써 유도되는 1차 반응을 의미한다. 자극은 특정 분자의 발현 변경, 예컨대, TGF-베타의 하향조절 및/또는 세포골격 구조의 재조직화 등을 매개할 수 있다.

[0077] 본원에서 사용되는 바, "실질적으로 상보성"이라는 것은 프라이머 서열 중의 염기의 대부분 또는 그 모두가 상보적이거나, 또는 하나 이상의 염기가 비-상보적이거나, 또는 미스매칭되는 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다.

[0078] "대상체"라는 용어는 면역 반응을 이끌어낼 수 있는 살아있는 유기체 (예컨대, 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에서 사용되는 바, "대상체" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유동물일 수 있다. 비-인간 포유동물은 예를 들어, 가축 및 애완동물, 예컨대, 양, 소, 돼지, 개, 고양이 및 뮤린 포유동물을 포함한다. 바람직하게, 대상체는 인간이다.

[0079] 본원에서 사용되는 바, "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 유형이 본질적으로 없는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 일반적으로 그의 자연적으로 발생된 상태에서는 그와 회합되어 있는 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 경우에서, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 동종 세포 집단을 지칭한다. 다른 경우에서, 상기 용어는 단순히 그의 자연 상태에서 자연적으로 그와 회합되어 있는 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 실시양태에서, 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다.

[0080] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합이 이루어지는 데 충분한 조건하에서 결합 분자가 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 일부를 정의하는 계획 핵산 서열을 지칭한다.

[0081] 본원에서 사용되는 바, "치료학적"이라는 용어는 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료학적 효과는 질환 상태의 억제, 관해 또는 근절에 의해 획득된다.

[0082] 본원에서 사용되는 바, "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"이라는 용어는 외인성 핵산을 숙주 세포 내로 전달하거나, 도입하는 공정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염되거나, 형질전환되거나 또는 형질도입된 것이다. 상기 세포는 1차 대상 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0083] 본원에서 사용되는 바와 같아, 질환을 "치료하다"라는 것은 대상체가 경험한 질환 또는 장애의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시킨다는 것을 의미한다

[0084] 본원에서 사용되는 바, "전사 제어하에" 또는 "작동적으로 연결된"이라는 어구는 프로모터가 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오티드의 발현을 제어할 수 있도록 상기 폴리뉴클레오티드와 관련하여 정확한 위치 및 배향으로 존재하고 있다는 것을 의미한다.

[0085] "벡터"는, 단리된 핵산을 포함하고, 세포의 내부로 상기 단리된 핵산을 전달하는 데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 회합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다수의 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 따라서, "벡터"라는 용어

는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포 내로의 전달을 촉진시키는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예컨대, 를 들어, 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예로는 센다이 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 범위: 본 개시내용 전역에 걸쳐, 본 발명의 다양한 측면들은 범위 포맷으로 제시될 수 있다. 범위 포맷으로 기술하는 것은 단지 편의성 및 간략성을 위한 것이며, 본 발명의 범주에 대한 불변의 제한으로서 해석되지 않아야 한다는 것을 이해하여야 한다. 따라서, 범위 기술은 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위범위 뿐만 아니라, 상기 범위 내의 개별적인 수치를 가지는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위로 기술한 것은 구체적으로 개시된 하위범위, 예를 전대, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등 뿐만 아니라, 상기 범위 내의 개별적인 숫자들, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6을 가지는 것으로 간주되어야 한다. 이는 상기 범위의 폭과 상관없이 적용된다.

#### 설명

[0088] 본원에 기술된 본 발명은 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현이 감소된 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하는 조성을 및 방법을 포함한다. 내인성 유전자는 CAR에 의해, 또는 임의의 다른 항체-기반 양식, 예컨대, 모노클로날 항체, scFv, 또는 이중특이적 항체 (예컨대, BITE)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 내인성 유전자 또는 그의 일부는 유전자 편집을 통해 하향조절되고, 이로써, 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 CART 세포에 대하여, 또는 다른 항원 특이적 요법에 대하여 내성을 띠게 된다.

#### 방법

[0090] 본 발명의 한 측면은 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 요법 또는 다른 항원 특이적 요법을 필요로 하는 대상체에서 CAR T 세포 요법 또는 다른 항원 특이적 요법으로부터 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 보호하는 방법을 포함한다. 본 방법은 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 줄기 세포 또는 전구 세포는 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 포함하고, 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 CART 요법을 필요로 하는 대상체에게 CART 요법을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0091] 변형된 세포는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 변형된 내인성 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 변형된 폴리펩티드는 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 기능과 등가인 적어도 하나의 기능을 포함할 수 있다.

[0092] 본 발명은 또한 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 본 방법은 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함한다. 본 발명은 CAR T 세포 요법을 필요로 하는 대상체로부터 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 세포는 말초 혈액 단핵구 세포, 제대혈 세포, 골수, 럼프절, 및/또는 비장으로부터 수득될 수 있다. 세포는 CD34+일 수 있다.

[0093] 본 발명의 특정 실시양태에서, 내인성 유전자 발현을 감소시킬 수 있는 핵산은 CRISPR 시스템이다. CRISPR 시스템은 Cas 발현 벡터 및 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열, 및/또는 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열과 복합체를 형성한 Cas9 단백질을 포함할 수 있다. CRISPR 시스템은 유도성 프로모터를 포함할 수 있다. 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 Cas 발현 벡터 중 유도성 프로모터를 활성화시키는 작용제에 노출될 수 있다.

[0094] 특정 실시양태에서, 내인성 유전자는 종양 항원을 코딩할 수 있고/거나, CAR에 의해 표적화되는 종양 세포 상에서 발현될 수 있고/거나, CD33, CD123, CD19, 또는 CD22를 코딩할 수 있다. 변형된 내인성 유전자는 변형된 세포 내로 도입될 수 있고, 여기서, 변형된 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩한다. 변형된 폴리펩티드는 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 기능과 등가인 적어도 하나의 기능을 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명의 특정 실시양태는 세포를 확장시키는 단계를 추가로 포함한다. 확장은 핵산을 도입하는 단계 이전에 이루어질 수 있다. 세포는 냉동보존될 수 있고, 이어서, 핵산을 도입하는 단계 이전에 해동될 수 있다. 핵산은 세포를 형질도입함으로써, 또는 세포를 형질감염시킴으로써, 또는 세포를 전기천공시킴으로써 도입될 수 있

다.

[0096] 본 발명은 또한 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함한다. 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성을 또한 본 발명에 포함된다.

#### CRISPR/Cas

[0098] 프로그램가능한 뉴클레아제를 사용하여 게놈 편집을 통해 특이적인 게놈 유전자좌에서 정확하게 편집할 수 있고, 이는 유해한 돌연변이를 제거하는 데, 또는 보호 돌연변이를 삽입하는 데 사용될 수 있다. 현재까지, 뉴클레아제에는 아연 평거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성인자-유사 이팩터 뉴클레아제 (TALEN), 및 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문구조 반복부 (CRISPR) 연관 뉴클레아제라는 세가지 주요 부류가 있다. 이들 중, CRISPR 연관 뉴클레아제는 사용이 용이하고, 간단하다는 점에서 나머지 다른 것들보다 현저히 우수한 것으로 입증되었다.

[0099] CRISPR/Cas 시스템은 표적화된 유전자 변경을 도입하는 데 용이하고, 효율적인 시스템이다. Cas9 단백질에 의한 표적 인식을 위해서는 가이드 RNA (gRNA) 내에 '시드' 서열 및 gRNA-결합 영역의 상류 쪽에 보존되는 디뉴클레오티드-함유 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열이 요구된다. gRNA로부터의 지시하에 Cas9 단백질은 그의 표적 DNA 서열에 결합하고, 특이적인 유전자좌에서 DNA 가닥 둘 모두를 절단한다. 이러한 이중 가닥 DNA 파단은 비상동적 말단 결합 (NHEJ) 또는 상동성-유도 수복 (HDR)에 의해 수복된다. NHEJ는 빈번하게는 파단 부위에서 소규모의 삽입 또는 결실 (indel)을 유발하는데, 이는 유전자에 의해 코딩된 단백질의 프레임쉬프트 돌연변이를 일으킬 수 있다. HDR은 상기 유전자로 복사되는 수복 주형을 이용하며, 이로써, 특이적인 돌연변이를 조작할 수 있다.

[0100] 이로써, CRISPR/CAS 시스템은 세포주 (예컨대, 293T 세포), 1차 세포, CAR T 세포, 및 줄기 세포 및 전구 세포를 재디자인함으로써 사실상 임의의 DNA 서열을 절단하도록 조작될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명은 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 포함하는 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로서, 여기서, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 포함한다.

[0101] 유전자 발현을 억제시키는 데 사용되는 CRISPR/Cas 시스템의 한 예인 CRISPRi가 미국 공개 번호 2014/0068797에 기술되어 있다. CRISPRi는 오류-빈발 수복 경로를 촉발시키는 DNA 이중 가닥 파단을 도입하여 프레임쉬프트 돌연변이를 일으키기 위해 RNA-가이드된 Cas9 엔도뉴클레아제를 이용하는 영구적인 유전자 파괴를 유도한다. 촉매 반응을 일으키지 않는(catalytically dead) Cas9에는 엔도뉴클레아제 활성이 결여되어 있다. 가이드 RNA와 함께 공동 발현되었을 때, 전사 신장, RNA 폴리머라제 결합 또는 전사 인자 결합을 특이적으로 방해하는 DNA 인식 복합체가 생성된다. 이러한 CRISPRi 시스템은 표적화된 유전자의 발현을 효율적으로 억제시킨다.

[0102] 표적 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열 및 Cas 엔도뉴클레아제가 세포 내로 도입되고, Cas 엔도뉴클레아제가 표적 유전자에서 이중 가닥 파단을 도입할 수 있도록 하는 복합체를 형성하였을 때에 CRISPR/Cas 유전자 파괴가 일어난다. CRISPR/CAS 시스템은 또한 2개 이상의 gRNA와 함께 단일 CAS9 단백질을 공동 발현함으로써 다중 게놈 유전자좌를 동시에 표적화할 수 있으며, 이로써, 상기 시스템은 다중 유전자 편집 또는 표적 유전자의 시너지적 활성화에 맞게 특별히 적합화될 수 있다. 한 측면에서, 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 세포 내로 도입함으로써 생성되며, 여기서, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것이다. 상기 실시양태에서, 내인성 유전자 또는 그의 일부의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산은 CRISPR 시스템이다. 일부 실시양태에서, CRISPR 시스템은 Cas 발현 백터 및 내인성 유전자에 특이적인 가이드 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, Cas 발현 백터는 Cas9 엔도뉴클레아제의 발현을 유도한다. T7, Cas3, Cas8a, Cas8b, Cas10d, Cse1, Csy1, Csn2, Cas4, Cas10, Csm2, Cmr5, Fok1, 당업계에 공지된 다른 뉴클레아제, 및 그의 임의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다른 엔도뉴클레아제 또한 사용될 수 있다.

[0103] 한 실시양태에서, CRISPR 시스템을 도입하는 것은 유도성 CRISPR 시스템을 도입하는 것을 포함한다. CRISPR 시스템은 CRISPR 시스템, 예컨대, Cas 발현 백터 중 유도성 프로모터를 활성화시키는 작용제에 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 노출시킴으로써 유도될 수 있다. 상기 실시양태에서, Cas 발현 백터는 유도성 프로모터, 예컨대, 항생제에의 노출에 의해 (예컨대, 테트라시클린, 또는 테트라시클린의 유도체, 예를 들어, 독시시클린에 의해) 유도가능한 것을 포함한다. 그러나, 다른 유도성 프로모터도 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 유도화제는 유도성 프로모터를 유도하는 선택적 조건 (예컨대, 작용제, 예를 들어, 항생제에의 노출)일 수 있다.

이를 통해 Cas 발현 벡터의 발현이 이루어지게 된다.

[0104] 가이드 핵산 서열은 유전자에 특이적이고, Cas 엔도뉴클레아제-유도성 이중 가닥 파단을 위해 상기 유전자를 표적화한다. 가이드 핵산 서열의 서열은 상기 유전자의 유전자와 내에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 가이드 핵산 서열의 길이는 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 이상의 뉴클레오티드 길이다.

[0105] 가이드 핵산 서열은 임의의 유전자, 예컨대, 면역원성을 감소시키거나, 또는 CART 요법에 대한 감수성을 감소시키는 내인성 유전자에 대해 특이적일 수 있다. 본 발명의 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 가이드 핵산 서열은 종양 항원을 코딩하는 내인성 유전자에 대해 특이적이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 가이드 핵산 서열은 CD33 또는 CD123을 코딩하는 내인성 유전자에 대해 특이적이다.

[0106] 가이드 핵산 서열은 RNA 서열, DNA 서열, 그의 조합 (RNA-DNA 조합 서열), 또는 합성 뉴클레오티드를 포함하는 서열을 포함한다. 가이드 핵산 서열은 단일 문자 또는 이중 문자일 수 있다. 한 실시양태에서, 가이드 핵산 서열은 단일 가이드 RNA를 포함한다.

#### 내인성 유전자 표적

[0108] CAR은 전형적으로 임양 세포 전달에서 요법으로서 사용된다. CAR은 항원에 특이적으로 결합하고, 면역 이펙터 세포로서 T 세포를 활성화시키도록 조작된, T 세포 상에서 발현되는 인공 수용체이다. 다수의 경우에서, CART 세포에 의해 표적화되는 항원은 정상 세포 및 이환된 세포 상에서 발현되는 내인성 유전자이다. 따라서, CART 세포는 제거를 위해 정상 세포 및 이환된 세포, 둘 모두를 표적화한다.

[0109] 본 발명의 CAR의 표적은 세포 상에서 발현된 항원 도메인을 포함하는 (세포에 대하여) 내인성 폴리펩티드를 코딩한다. CAR은 일반적으로 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 표적 세포 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 다른 실시양태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 종양 항원에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 종양 세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 세포 표면 문자를 코딩한다. 세포 표면 문자는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염과 연관된 결합 파트너로서 작용할 수 있는 내인성 문자를 포함한다.

[0110] 내인성 유전자의 예로는 CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (이는 또한 CD2 서브세트 1, CRACC, SLAMF7, CD319, 및 19A24로도 지칭됨); C형 렉틴-유사 문자-1 (CLL-1 또는 CLECL1); CD33; 표피 성장 인자 수용체 변이체 III (EGFRvIII); 강글리오시드 G2 (GD2); 강글리오시드 GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGAlp(1-4)bDGlcP(1-1)Cer); TNF 수용체 패밀리 구성원 B 세포 성숙화 (BCMA); Tn 항원 ((Tn Ag) 또는 (GalNAc α-Ser/Thr)); 전립선 특이적 막 항원 (PSMA); 수용체 티로신 키나제-유사 희귀 수용체 1 (ROR1); Fms-유사 티로신 키나제 3 (FLT3); 종양 연관 당단백질 72 (TAG72); CD38; CD44v6; 암배아 항원 (CEA); 상피 세포 부착 분자 (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); 인터류킨-13 수용체 서브유니트 알파-2 (IL-13Ra2 또는 CD213A2); 메소텔린; 인터류킨 11 수용체 알파 (IL-11Ra); 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA); 프로테아제 세린 21 (테스티신 또는 PRSS21); 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (VEGFR2); 루이스(Y) 항원; CD24; 혈소판 유래 성장 인자 수용체 베타 (PDGFR-베타); 단계 특이적 배아 항원-4 (SSEA-4); CD20; 폴레이트 수용체 알파; 수용체 티로신-단백질 키나제 ERBB2 (Her2/neu); 뮤신 1, 세포 표면 연관 (MUC1); 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); 신경 세포 부착 분자 (NCAM); 프로스타제; 전립선 산성 포스파타제 (PAP); 신장 인자 2 돌연변이형 (ELF2M); 에프린 B2; 섬유아세포 활성화 단백질 알파 (FAP); 인슐린-유사 성장 인자 1 수용체 (IGF-I 수용체), 카보닉 안히드라이제 IX (CAIX); 프로테아솜 (프로솜, 마크로파인) 서브유니트, 베타 유형, 9 (LMP2); 당단백질 100 (gp100); 절단점 클러스터 영역 (BCR) 및 아멜슨 뮤린 백혈병 바이러스 온코진 동족체 1 (Ab1)로 이루어진 온코진 융합 단백질 (bcr-ab1); 티로시나제; 에프린 A형 수용체 2 (EphA2); 푸코실 GM1; 시알릴 루이스 부착 분자 (sLe); 강글리오시드 GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGAlp(1-4)bDGlcP(1-1)Cer); 트랜스글루타미나제 5 (TGS5); 고분자량-흑색종 연관 항원 (HMWMAA); o-아세틸-GD2 강글리오시드 (OAcGD2); 폴레이트 수용체 베타; 종양 내피 마커 1 (TEM1/CD248); 종양 내피 마커 7 관련 (TEM7R); 클라우딘 6 (CLDN6); 갑상선 자극 호르몬 수용체 (TSHR); G 단백질 커플링된 수용체 부류 C 그룹 5, 구성원 D (GPRC5D); 염색체 X 오픈 리딩 프레임 61 (CXorf61); CD97; CD179a; 역형성 림프종 키나제 (ALK); 폴리시알산; 태반 특이적 1 (PLAC1); 글로보H 글리코세라미드의 핵사사카라이드 부분 (글로보H); 유선 분화 항원 (NY-BR-1); 유로플라킨 2 (UPK2); A형 간염 바이러스 세포 수용체 1 (HAVCR1); 아드레날린 수용체 베타 3 (ADRB3); 판넥신 3 (PANX3); G 단백질 커플링된 수용체 20 (GPR20); 림프구 항원 6 복합체,

유전자좌 K 9 (LY6K); 후각 수용체 51E2 (OR51E2); TCR 감마 교번 리딩 프레임 단백질 (TARP); 빌름스 종양 단백질 (WT1); 암/고환 항원 1 (NY-ESO-1); 암/고환 항원 2 (LAGE-1a); 흑색종 연관 항원 1 (MAGE-A1); ETS 전좌-변이체 유전자 6, 염색체 12p 상에 위치 (ETV6-AML); 정액 단백질 17 (SPA17); X 항원 패밀리, 구성원 1A (XAGE1); 안지오포이에틴 결합 세포 표면 수용체 2 (Tie 2); 흑색종 암 고환 항원-1 (MAD-CT-1); 흑색종 암 고환 항원-2 (MAD-CT-2); Fos 관련 항원 1; 종양 단백질 p53 (p53); p53 돌연변이체; 프로스테인; 서바이빙; 텔로머라제; 전립선 암종 종양 항원-1 (PCTA-1 또는 갈렉틴 8), T 세포 1에 의해 인식된 흑색종 항원 (MelanA 또는 MART1); 래트 육종 (Ras) 돌연변이체; 인간 텔로머라제 역전사효소 (hTERT); 육종 전좌 절단점; 아폽토시스의 흑색종 억제제 (ML-IAP); ERG (막횡단 프로테아제, 세린 2 (TMPRSS2) ETS 융합 유전자); N-아세틸 글루코사미닐-트랜스퍼라제 V (NA17); 쌍 형성 박스 단백질 Pax-3 (PAX3); 안드로겐 수용체; 시클린 B1; v-myc 조류 골수세포증 바이러스 온코진 신경아세포종 유래 동족체 (MYCN); Ras 동족체 패밀리 구성원 C (RhoC); 티로시나제 관련 단백질 2 (TRP-2); 시토크롬 P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC-결합 인자 (아연 링거 단백질)-유사 (BORIS 또는 임프린트된 부위의 조절인자의 동료(Brother of the Regulator of Imprinted Sites)), T 세포 3에 의해 인식된 편평 세포 암종 항원 (SART3); 쌍 형성 박스 단백질 Pax-5 (PAX5); 프로아크로신 결합 단백질 sp32 (OY-TES1); 림프구 특이적 단백질 티로신 키나제 (LCK); 키나제 고정 단백질 4 (AKAP-4); 활액 육종, X 절단점 2 (SSX2); 진행된 당화반응 최종생성물의 수용체 (RAGE-1); 신장 유비쿼터스 1 (RU1); 신장 유비쿼터스 2 (RU2); 레구메인; 인간 유두종 바이러스 E6 (HPV E6); 인간 유두종 바이러스 E7 (HPV E7); 장 카르복실 에스테라제; 열충격 단백질 70-2 돌연변이형 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 백혈구 연관 면역글로불린-유사 수용체 1 (LAIR1); IgA 수용체의 Fc 단편 (FCAR 또는 CD89); 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 구성원 2 (LILRA2); CD300 분자-유사 패밀리 구성원 f (CD300LF); C형 톤신 도메인 패밀리 12 구성원 A (CLEC12A); 골수기질 세포 항원 2 (BST2); EGF-유사 모듈-함유 뮤신-유사 호르몬 수용체-유사 2 (EMR2); 림프구 항원 75 (LY75); 글리피칸-3 (GPC3); Fc 수용체-유사 5 (FCRL5); 및 면역글로불린 람다-유사 폴리펩티드 1 (IGLL1)을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0111]

내인성 유전자의 선택은 정상 세포에서의 내인성 유전자의 발현, 정상 세포의 표면 상에의 발현된 내인성 유전자 생성물의 존재, 및 CART 요법이 정상 세포에 미치는 효과에 의존한다. 예를 들어, 내인성 유전자는 이환된 세포 상에서 고도로 발현될 수 있고, 정상 세포에서는 제한된 발현을 보일 수 있다.

[0112]

또 다른 예에서, 내인성 유전자는 정상적인 혈액 세포에서 광범위하게 발현될 수 있고, CART 요법은 이환된 세포 이외에도, 상기의 모든 세포를 잠재적으로 표적화할 것이다. 그러한 환경하에서는 변형된 내인성 유전자를 도입하는 것이 유용할 수 있다. 변형된 내인성 유전자의 도입은, 내인성 유전자의 발현이 비-이환된 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포의 건강에 중요할 경우에 특히 유용할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기술된 변형된 세포를 생성하는 방법은 내인성 유전자의 일부, 예컨대, CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 일부의 발현을 감소시키는 단계를 포함한다. 상기 실시양태에서, 본 방법은 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 변형된 내인성 유전자를 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 변형된 세포는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 변형된 내인성 유전자를 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 변형된 폴리펩티드는 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 기능과 등가인 적어도 하나의 기능을 포함한다. 따라서, 변형된 세포는 CART 세포 요법에 대한 내성을 유지하면서, 변형된 내인성 유전자를 발현한다.

[0113]

### 핵산 도입

[0114]

핵산을 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포 내로 도입하는 방법은 물리적, 생물학적, 및 화학적 방법을 포함한다. 폴리뉴클레오티드, 예컨대, RNA를 숙주 세포 내로 도입시키기 위한 물리적 방법으로는 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. RNA는 전기천공 (아막사 뉴클레오펙터-II(Amaxa Nucleofector-II) (아막사 바이오시스템즈(Amaxa Biosystems: 독일 퀼른)), (ECM 830 (BTX) (하버드 인스트루먼츠(Harvard Instruments: 미국 매사추세츠주 보스턴)) 또는 더 진 펄서 II(the Gene Pulser II) (바이오래드 (BioRad: 미국 콜로라도주 덴버)), 멀티포레이터(Multiporator) (에펜도르트(Eppendorf: 독일 함부르크)))을 비롯한, 상업적으로 이용가능한 방법을 이용하여 표적 세포 내로 도입될 수 있다. RNA는 또한 리포펙션을 사용하는 양이온성 리포솜 매개 형질감염을 사용하거나, 중합체 캡슐화를 사용하거나, 웨이퍼 매개된 형질감염을 사용하거나, 또는 바이오리스틱 입자 전달 시스템, 예컨대, "유전자 총"을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)] 참조).

[0115]

관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입시키기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 백터의 사용을 포함한다. 바이러스 백터, 및 특히 레트로바이러스 백터는 유전자를 포유동물, 예컨대, 인간 세포 내로 삽입하

는 데 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스 단순 바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 연관 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0116] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입시키기 위한 화학적 수단으로는 콜로이드성 분산 시스템, 예컨대, 거대 분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 수중유 에멀젼, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 비롯한, 지질 기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예컨대, 인공 막 소포체)이다.

[0117] 사용에 적합한 지질은 상업적 공급원으로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 시그마(Sigma: 미국 미주리주 세인트루이스)로부터 입수할 수 있고; 디세틸 포스페이트 ("DCP")는 K&K 라보라토리즈(K & K Laboratories: 미국 뉴욕주 플레인뷰)로부터 입수할 수 있고; 콜레스테롤 ("Choi")은 칼바이오켐-베링(Calbiochem-Behring)으로부터 입수할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 다른 지질은 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드(Avant i Polar Lipids, Inc.: 미국 앨라배마주 버밍햄)로부터 입수할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질의 스톡 용액을 약 -20°C에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 쉽게 증발되기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 둘러싸인 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중 라멜라 지질 비히클을 포괄하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소포체 구조를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 다중 라멜라 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질층을 가진다. 이는 인지질이 과량의 수성 용액 중에 혼탁될 때 자발적으로 형성된다. 지질 성분들은 폐쇄된 구조가 형성되기 이전에 자기-재배열되고, 물을 포획하고, 지질 이중층 사이의 용질을 용해시킨다 (문헌 [Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10]). 그러나, 용액 중에서 일반 소포체 구조와는 다른 구조를 가지는 조성물이 또한 포함한다. 예를 들어, 지질은 미셀 구조를 띠거나, 또는 단지 지질 분자의 불균일한 응집체로서 존재할 수 있다. 리포펙타민-핵산 복합체 또한 고려된다.

[0118] 핵산을 세포 내로 도입시키는 데 사용되는 방법과 상관없이, 세포 중의 핵산의 존재를 확인하기 위해 다양한 검정법이 수행될 수 있다. 상기와 같은 검정법으로는 예를 들어, 당업자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정법, 예컨대, 씨던 및 노던 블로팅, RT-PCR 및 PCR; "생화학적" 검정법, 예컨대, 예로서, 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블로트)에 의해, 또는 본 발명의 범주 내에 포함되는 작용제를 확인하기 위한 본원에 기술된 검정법에 의해 특정 웹티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것을 포함한다.

[0119] 한 측면에서, 본 발명은 내인성 유전자 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함하는, 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 방법은 변형된 내인성 유전자를 변형된 세포 내로 도입하는 단계로서, 여기서, 변형된 내인성 유전자는 CAR에 의해 표적화되는 항원 도메인이 결여된 변형된 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 추가로 포함한다. 상기 실시양태에서, 한 핵산은 변형된 내인성 유전자를 세포 내로 도입시키는 데 사용된 것과 동일하거나, 또는 상이한 방법을 사용하여 도입될 수 있다.

#### RNA

[0121] 한 실시양태에서, 세포 내로 도입되는 핵산은 RNA를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, CRISPR 시스템의 적어도 하나의 성분은 RNA를 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 가이드 핵산 서열은 RNA이다. 또 다른 실시양태에서, RNA는 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 포함한다. RNA는 중합효소 연쇄 반응 (PCR)-생성 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 제조된다. 임의의 공급원으로부터의 관심 DNA를, 적합한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 PCR에 의해 직접 전환시킬 수 있다. DNA의 공급원은 예를 들어, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 과지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 DNA의 임의의 다른 적합한 공급원일 수 있다.

[0122] PCR을 사용하여 RNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성할 수 있고, 이어서, 이를 세포 내로 도입시킨다. PCR을 수행하기 위한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 PCR을 위한 주형으로서 사용되는 DNA의 영역에 실질적으로 상보성인 영역을 가지도록 디자인된다. 실질적으로 상보성인 서열은 PCR에 사용되는 어닐링 조건하에서 의도하는 DNA 표적과 어닐링되거나, 하이브리드화될 수 있다. 프라이머는 DNA 주형의 임의의 부분과 실질적으로 상보성을 띠도록 디자인될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하여, 세포 중에서 통상적으로 전사되는 유전자의 부분 (오픈 리딩 프레임)을 증폭시키도록 디자인될 수 있다. 프라이머는 또한 특정 관심 도메인을 코딩하는 유전자의 일부를 증폭시키도록 디자인될 수 있다. 한 실시

양태에서, 프라이머는 5' 및 3' UTR 모두 또는 그의 일부를 포함하여, 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭시키도록 디자인된다. PCR에 유용한 프라이머는 당업계에 널리 공지된 합성 방법에 의해 생성된다. "정방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 상류인 DNA 주형 상의 뉴클레오티드에 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. 본원에서 사용되는 바, "상류"는 코딩 가닥 기준으로 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대해 5' 위치를 지칭한다. "역방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 하류인 이중 가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드 영역을 함유하는 프라이머이다. 본원에서 사용되는 바, "하류"는 코딩 가닥 기준으로 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대해 3' 위치를 지칭한다.

[0123] RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진시킬 수 있는 능력을 가지는 화학 구조물 또한 사용될 수 있다. RNA는 바람직하게 5' 및 3' UTR을 가진다. 한 실시양태에서, 5' UTR의 길이는 0 내지 3,000개의 뉴클레오티드 길이이다. 코딩 영역에 부가되는 5' 및 3' UTR 서열의 길이는 UTR의 상이한 영역에 어닐링되는 PCR용 프라이머를 디자인하는 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 상이한 방법에 의해 변경될 수 있다. 상기 접근법을 사용하여, 당업계의 숙련가는 전사된 RNA의 형질감염 이후에 최적의 번역 효율을 달성하는 데 요구되는 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다.

[0124] 5' 및 3' UTR은 주형에 대한 자연적으로 발생된, 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 대안적으로, UTR 서열을 정방향 및 역방향 프라이머 내로 도입함으로써, 또는 주형의 임의의 다른 변형에 의해 주형에 대하여 내인성이 아닌 UTR 서열을 부가할 수 있다. 주형에 대하여 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변형시키는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열 중 AU 풍부한 요소는 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 당업계에 널리 공지된 UTR의 특성에 기초하여, 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 3' UTR을 선택하거나 디자인할 수 있다.

[0125] 한 실시양태에서, 5' UTR은 내인성 유전자의 코작 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 관심 유전자에 대하여 내인성이 아닌 5' UTR을 상기 기술한 바와 같이 PCR에 의해 부가하고자 하는 경우, 5' UTR 서열을 부가함으로써 컨센서스 코작 서열을 재디자인할 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사체의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역을 위해 모든 RNA에 요구되는 것으로 보이지는 않는다. 다수의 mRNA에 대한 코작 서열의 요건은 당업계에 공지되어 있다. 다른 실시양태에서, 5' UTR은 RNA 계놈이 세포 중에서 안정성을 띠는 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 실시양태에서, 다양한 뉴클레오티드 유사체가 RNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해 상기 3' 또는 5' UTR에서 사용될 수 있다.

[0126] 유전자를 클로닝할 필요 없이, DNA 주형으로부터 RNA를 합성할 수 있기 위해서는 전사의 프로모터를 전사하고자 하는 서열 상류의 DNA 주형에 부착시켜야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 작용하는 서열이 정방향 프라이머의 5' 말단에 부가되는 경우, RNA 폴리머라제 프로모터는 전사시키고자 하는 오픈 리딩 프레임 상류의 PCR 생성물 내로 통합되게 된다. 한 실시양태에서, 프로모터는 본원 다른 곳에 기술되어 있는 바와 같이, T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터로는 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지되어 있다.

[0127] 한 실시양태에서, mRNA는 세포에서 리보솜 결합, 번역 개시 및 mRNA 안정성을 결정짓는 캡을 5' 말단 및 3' 폴리(A) 테일 상 둘 모두에 가지고 있다. 고리형 DNA 주형, 예를 들어, 플라스미드 DNA 상에서, RNA 폴리머라제는, 진핵 세포에서의 발현에는 적합하지 않은 긴 콘카타며 생성물을 생성시킨다. 3' UTR의 말단에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 전사 이후 폴리아데닐화되는 경우에도 진핵성 형질감염에 효과적이지 않은 보통 크기의 mRNA를 생성시킨다.

[0128] 선형 DNA 주형 상에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 전사체의 3' 말단을 주형의 최종 염기 너머로까지 연장시킬 수 있다 (문헌 [Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985)]; [Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)]).

[0129] DNA 주형 내로 폴리A/T 신장부를 통합시키는 통상적인 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA 내로 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 야기할 수 있으며, 이는 박테리아 세포로부터 수득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 다른 이상으로 고도로 오염되는 이유이다. 이는 클로닝 과정을 고되고, 시간 소모적으로 만들 뿐만 아니라, 신뢰할 수 없게 한다. 이는 클로닝 없이 폴리A/T 3' 신장부를 포함하는 DNA 주형을 구축할 수 있게 허용하는 방법이 매우 바람직한 이유이다.

[0130] 전사 DNA 주형의 폴리A/T 세그먼트는 폴리T 테일, 예컨대, 100 T 테일 (크기는 50 내지 5000 T일 수 있다)을 함유하는 역방향 프라이머를 사용함으로써 PCR 동안에, 또는 DNA 결찰 또는 시험관내 재조합을 포함하나, 이에 제

한되지 않는 임의의 다른 방법에 의한 PCR 이후에 생성될 수 있다. 폴리(A) 테일은 또한 RNA에 안정성을 제공하고, 그의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 테일의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관관계를 가진다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 테일은 100 내지 5,000개의 아데노신이다.

[0131] RNA의 폴리(A) 테일은 폴리(A) 폴리머라제, 예컨대, E. 콜라이 폴리A 폴리머라제 (E-PAP)를 사용하는 시험관내 전사 이후에 추가로 연장될 수 있다. 한 실시양태에서, 폴리(A) 테일의 길이를 100개의 뉴클레오티드로부터 300 내지 400개의 뉴클레오티드로 증가시키면, RNA의 번역 효율은 약 2배 정도 증가하게 된다. 추가로, 3' 말단에 상이한 화학기를 부착시키면, mRNA 안정성은 증가될 수 있다. 상기와 같은 부착은 변형된/인공 뉴클레오티드, 앱타미 및 다른 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체는 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 폴리(A) 테일에 통합될 수 있다. ATP 유사체는 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.

[0132] 5' 캡 또한 RNA 분자에 안정성을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 당업계에 공지되고, 본원에 기술된 기법을 사용하여 5' 캡을 제공한다 (문헌 [Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001)]; [Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001)]; [Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)]).

[0133] 본원에 개시된 방법들에 의해 제조된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열을 함유할 수 있다. IRES 서열은 mRNA에의 캡-비의존적 리보솜 결합을 개시하고, 번역 개시를 촉진시키는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 디자인된 서열일 수 있다. 세포 투과성 및 생존력을 촉진시키는 인자를 함유할 수 있는, 세포 전기 천공에 적합한 임의의 용질, 예컨대, 당, 햅티드, 지질, 단백질, 항산화제 및 계면활성제가 포함될 수 있다.

[0134] 본원에 기술된 RNA는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA는 세포 내로 전기천공된다. 한 실시양태에서, CRISPR 시스템은 세포 내로 전기천공되는 RNA를 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, CRISPR 시스템은 RNA이고, 세포 내로 전기천공되는 적어도 하나의 가이드 핵산 서열을 포함한다.

[0135] 개시된 방법은 암, 급성 및 만성 감염, 및 자가면역 질환 분야에서 대상체에게 요법을 제공하기 위해 세포 활성을 조절하는 데 적용될 수 있다. 개시된 방법은 줄기 세포를 표적화하는 것을 포함할 수 있고, 이는 또한 유전적으로 변형된 세포의 표적 암 세포를 사멸시킬 수 있는 능력에 대해 사정하는 방법도 포함할 수 있다.

[0136] 본 방법은 또한 발현 수준을 개별적으로 조절할 수 있도록 하면서, 예를 들어, 프로모터 또는 RNA의 투입량을 변경시킴으로써 광범위한 범위에 걸쳐 발현 수준을 제어할 수 있는 능력을 제공한다.

[0137] 본 발명의 RNA 형질감염 방법의 한 장점은 RNA 형질감염이 본질적으로 일과성이고, 벡터 부재하에 이루어진다는 점이다. RNA 트랜스진은 세포로 전달되고, 그 안에서 어떤 추가의 바이러스 서열도 필요로 하지 않으면서 최소 발현 카세트로서 발현될 수 있다. 이러한 조건하에서 트랜스진을 숙주 세포 계놈 내로 통합시키는 것은 가능성이 없다. RNA의 형질감염 효율, 및 전체 림프구 집단을 균일하게 변형시킬 수 있는 그의 능력에 기인하여 세포 클로닝은 필요가 없다.

[0138] 시험관내-전사된 RNA (IVT-RNA)를 이용하여 세포를 유전적으로 변형시키는 것은, 둘 모두가 각종의 동물 모델에서 성공적으로 시험된 2개의 상이한 전략법을 이용한다. 세포를 리포렉션 또는 전기천공에 의해 시험관내-전사된 RNA로 형질감염시킨다. 전달된 IVT-RNA의 발현을 연장시키기 위해서는 다양한 변형을 사용하여 IVT-RNA를 안정화시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0139] 표준화된 방식으로 시험관내 전사를 위한 주형으로서 사용되고, 안정화된 RNA 전사체를 제조하는 방식으로 유전적으로 변형된 일부 일부 IVT 벡터는 문헌에 공지되어 있다. 당업계에서 사용되는 현행 프로토콜은 하기 구조를 가지는 플라스미드 벡터를 기본으로 한다: RNA 전사를 가능하게 하는 5' RNA 폴리머라제 프로모터, 이어서, 비번역 영역 (UTR) 3' 및/또는 5' 측면에 위치하는 관심 유전자, 및 50-70 A 뉴클레오티드를 함유하는 3' 폴리아데닐 카세트. 시험관내 전사에 앞서, 고리형 플라스미드는 II형 제한 효소 (인식 서열은 절단 부위에 상응한다)에 의해 폴리아데닐 카세트의 하류에서 선형화된다. 따라서, 폴리아데닐 카세트는 전사체 중의 후자의 폴리(A) 서열에 상응한다. 상기 과정의 결과로서, 일부 뉴클레오티드는 선형화 이후에 효소 절단 부위의 일부분으로서 남게 되고, 3' 말단에서 폴리(A) 서열을 연장시키거나, 또는 차폐시킨다. 비생리학적 오버행이 상기와 같은 구축물로부터 세포내에서 생산되는 단백질의 양에 영향을 미치는지 여부는 명확하지 않다.

[0140] 또 다른 측면에서, RNA 구축물은 전기천공에 의해 세포 내로 전달된다. 예컨대, US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1에 교시된, 핵산 구축물의 포유동물 세포 내로의 전기천공을 위해 제제화 및 방법을 참조한다. 임의의 공지된 세포 유형의 전기천공을 위해 요

구되는 전계 강도를 비롯한 각종 파라미터가 관련 연구 문헌 뿐만 아니라, 본 분야의 많은 특허 및 출원에 일반적으로 공지되어 있다. 예컨대, 미국 특허 번호 6,678,556, 미국 특허 번호 7,171,264, 및 미국 특허 번호 7,173,116을 참조한다. 전기천공의 치료학적 적용을 위한 장치, 예컨대, 메드펄서™ DNA 일렉트로포레이션 테라피 시스템(MedPulser™ Electroporation Therapy System) (이노비오/제네트로닉스(Inovio/Genetronics: 미국 캘리포니아주 샌디에고))은 상업적으로 이용가능하고, 이는 특허, 예컨대, 미국 특허 번호 6,567,694; 미국 특허 번호 6,516,223, 미국 특허 번호 5,993,434, 미국 특허 번호 6,181,964, 미국 특허 번호 6,241,701, 및 미국 특허 번호 6,233,482에 기술되어 있으며; 전기천공은 또한 예컨대, US20070128708A1에 기술되어 있는 바와 같이, 시험관내 세포 형질감염을 위해서도 사용될 수 있다. 전기천공은 또한 시험관내 핵산의 세포 내로의 전달에도 사용될 수 있다. 따라서, 다수의 이용가능한 장치 및 당업자에게 공지된 전기천공 시스템 중 임의의 것을 사용하여 이루어지는, 발현 구축물을 비롯한, 핵산의 세포 내로의 전기천공-매개된 투여는 관심 RNA를 표적 세포로 전달하기 위한 흥미로운 새로운 수단을 제공한다.

#### [0141] HSC 또는 전구 세포의 공급원

확장 이전에, 세포 공급원을 대상체로부터 수득한다. 대상체의 비제한적인 예로는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 비인간 영장류, 돼지 및 그의 트랜스제닉 종을 포함한다. 바람직하게, 대상체는 인간이다. 세포는 말초 혈액 단핵구 세포, 골수, 제대혈, 림프절 조직, 비장 조직, 제대, 및 종양을 비롯한 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, 당업계에서 이용가능한 HSC 또는 전구 세포주가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 당업자에게 공지된 임의 개수의 기술, 예컨대, 피콜(Ficoll) 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 유니트로부터 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 수득된다. 성분채집술 생성물은 전형적으로 림프구, 예를 들어, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 함유한다. 후속 프로세싱 단계를 위해, 성분 채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고, 세포를 적절한 완충제 또는 배지, 예컨대, 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS), 또는 칼슘 무함유, 및 마그네슘이 없거나, 또는 전부는 아니라도, 다수의 2가 양이온이 없을 수도 있는 세척액에 넣을 수 있다. 세척 후, 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대, 예를 들어, Ca 무함유, Mg 무함유 PBS에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 비바람직한 성분을 제거할 수 있고, 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0143] 또 다른 실시양태에서, 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들어, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액으로부터 단리된다. 대안적으로, 세포는 제대로부터 단리될 수 있다. 어느 경우에선, HSC 또는 전구 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 단리될 수 있다

[0144] 그렇게 단리된 제대혈 단핵 세포는 CD4, CD5, CD8, CD11b, CD14, CD19, CD24, CD45, CD56, 및 CD66b을 포함하나, 이에 제한되지 않는 특정 항원을 발현하는 세포가 고갈된 것일 수 있다. 상기 세포의 고갈은 단리된 항체, 항체를 포함하는 생물학적 샘플, 예컨대, 복수, 물리적 지지체에 결합된 항체, 및 세포 결합된 항체를 사용하여 달성될 수 있다.

[0145] 음성 선택에 의한 세포 집단의 농축은 음성적으로 선택된 세포에 특유한 표면 마커에 대한 항체 조합을 사용하여 달성될 수 있다. 바람직한 방법은 음성적으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 모노클로날 항체의 각테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유세포 분석법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의한 CD34+ 세포의 농축을 위해, 모노클로날 항체 각테일은 전형적으로 CD4, CD5, CD8, CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다.

[0146] 양성 또는 음성 선택에 의해 원하는 세포 집단을 단리시키기 위해, 세포의 농도 및 표면 (예컨대, 비드와 같은 입자)을 달리할 수 있다. 특정 실시양태에서, 비드 및 세포가 함께 혼합되어 있는 부피를 유의적으로 감소시켜 (즉, 세포의 농도를 증가시켜) 확실히 세포 및 비드가 최대로 접촉할 수 있도록 하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 20억 개의 세포/ml인 농도가 사용된다. 한 실시양태에서, 10억 개의 세포/ml인 농도가 사용된다. 추가의 실시양태에서, 1억 개의 세포/ml 초파가 사용된다. 추가의 실시양태에서, 세포 농도가 1,000만, 1,500만 개, 2,000만 개, 2,500만 개, 3,000만 개, 3,500만 개, 4,000만 개, 4,500만 개, 또는 5,000만 개의 세포/ml인 것이 사용된다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 세포 농도가 7,500만 개, 8,000만 개, 8,500만 개, 9,000만 개, 9,500만 개, 또는 1억 개의 세포/ml인 것이 사용된다. 추가 실시양태에서, 농도가 1억 2,500만 개 또는 1억 5,000만 개의 세포/ml인 것이 사용될 수 있다. 고농도를 사용하는 것이 세포 수율, 세포 활성화, 및 세포 확장을 증가시킬 수 있다.

[0147] 세포는 또한 단핵구 제거 단계를 필요로 하지 않는 세척 단계 이후에 냉동될 수 있다. 이론으로 제한하고자 하

지 않으면서, 냉동 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구를 제거함으로써 더욱 균일한 생성물, 및 어느 정도의 단핵구를 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거 세척 단계 이후에, 세포를 냉동액 중에 혼탁시킬 수 있다. 다수의 냉동액 및 파라미터가 당업계에 공지되어 있고, 이와 관련하여 유용하겠지만, 비제한적인 예에서 한 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 냉동 배지를 사용하는 것을 포함한다. 이어서, 세포를 분당 1° 인 비율로 -80°C까지 냉동시키고, 액상 질소 보관 탱크의 기체상에서 보관한다. 다른 조절식 냉동 방법 뿐만 아니라, 액상 질소에서의 또는 -20°C에서의 비조절식 급냉도 사용될 수 있다.

[0148] 한 실시양태에서, 세포는 말초 혈액 단핵구 세포, 제대혈 세포, 골수, 텁프절 및 비장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 CD34+이다.

#### HSC 또는 전구 세포의 확장

[0150] 본 발명은 본원에 기술된 변형된 세포를 포함하는 세포 집단을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기술된 변형된 세포를 생성하는 방법은 세포 또는 변형된 세포를 확장시키는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 확장은 핵산을 도입하는 단계 이전에 이루어진다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 확장은 핵산을 도입하는 단계 이전에 이루어진다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 세포는 약 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 2,000배, 3,000배, 4,000배, 5,000배, 6,000배, 7,000배, 8,000배, 9,000배, 10,000배, 100,000배, 1,000,000배, 10,000,000배 이상, 및 그 사이의 임의의 모든 완전 또는 부분 정수배만큼 확장될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포는 약 20배 내지 약 50배 범위로 확장된다.

[0151] 세포를 또 다른 배양 장치로 넘기기 이전에 최적의 계대를 위해 일정 기간 동안 또는 세포가 높은 세포 밀도에도 달할 때까지 세포를 배양 장치 중의 세포 배지에서 인큐베이션시킬 수 있다. 배양 장치는 시험관내에서 세포를 배양하는 데 통상 사용되는 임의의 배양 장치일 수 있다. 세포 배지는 세포 배양 중 언제라도 교체될 수 있다. 바람직하게, 세포 배지는 대략 2 내지 3일마다 교체된다. 이어서, 세포는 배양 장치로부터 수확된 후, 세포는 즉시 사용될 수 있거나, 또는 추후 사용을 위해 보관될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 확장된 세포를 냉동보존하는 것을 포함한다. 냉동보존된 세포는 핵산을 세포 내로 도입하기 이전에 해동된다.

[0152] 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 세포를 단리시키고, 세포를 확장하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 확장 이전에 세포를 냉동보존하는 것을 추가로 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 핵산을 도입하는 단계 이전에 냉동보존된 세포를 해동하는 것을 추가로 포함한다.

[0153] 본원에 기술된 바와 같은 배양 단계 (본원에 기술된 바와 같은 작용제와의 접촉)는 예를 들어, 24시간 미만, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23시간으로 매우 짧은 시간일 수 있다. 본원에 추가로 기술된 바와 같은 배양 단계 (본원에 기술된 바와 같은 작용제와의 접촉)는 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상으로 더욱 긴 시간일 수 있다.

[0154] 배양물 중의 세포를 기술하는 데 다양한 용어가 사용된다. 세포 배양물이란 일반적으로 살아있는 유기체로부터 채취되고, 조절된 조건하에서 성장시킨 세포를 지칭한다. 1차 세포 배양물은 유기체로부터 채취되고, 1차 계대 배양 이전의 세포, 조직, 또는 기관의 배양물이다. 세포 성장 및/또는 분열을 촉진시키는 조건하에 세포를 성장 배지 중에 배치하였을 때, 세포는 배양물 중에서 확장되고, 이로써, 더욱 큰 세포 집단이 생성된다. 세포가 배양물 중에서 확장되었을 때, 세포 증식 속도는 전형적으로, 다르게는 배가 시간으로 공지되어 있는, 세포 개수가 2배가 되는 데 소요되는 시간량에 의해 측정된다.

[0155] 계대배양의 각 라운드가 계대로 지칭된다. 세포가 계대배양될 때, 이는 계대접종된 것으로 지칭된다. 세포, 또는 세포주의 특정 집단은 종종 그가 계대접종된 횟수로 지칭되거나, 또는 그를 특징으로 한다. 예를 들어, 10회 계대접종된, 배양된 세포 집단은 P10 배양물로서 지칭될 수 있다. 1차 배양물, 즉, 조직으로부터의 세포 단리 이후의 첫 번째 배양물은 P0으로 지정된다. 1차 계대배양 후, 세포를 2차 배양물 (P1 또는 계대 1)로 기술된다. 2차 계대배양 후, 세포는 3차 배양물 (P2 또는 계대 2)이 되고, 그 다음도 마찬가지로 계속 그러하다. 계대접종 기간 동안 다수의 집단은 배가될 수 있고; 따라서, 배양물의 집단 배가 횟수가 계대수보다 크다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 계대접종 사이의 기간 동안 세포의 확장 (즉, 집단 배가 횟수)는 시딩 밀도, 기관, 배지, 및 계대접종 사이의 시간을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다수의 인자에 의존한다.

[0156] 한 실시양태에서, 세포는 수시간 (약 3시간) 내지 약 14일 동안 또는 그 사이의 임의의 시간 정수 값인 기간 동안 배양될 수 있다. HSC 또는 전구 세포 배양에 적절한 조건은 증식 및 생존력에 필요한 인자, 예컨대, 혈청 (예컨대, 우태아 또는 인간 혈청), GM-CSF 인슐린, IFN-감마, 인터류킨-1 (IL-1), IL-3, IL-4, IL-6, IL-7,

IL-10, IL-12, IL-15, SCF, TGF-베타, TNF- $\alpha$  및 TPO, 또는 당업자에게 공지된 세포의 성장을 위한 임의의 다른 첨가제를 함유할 수 있는 적절한 배지 (예컨대, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640, 또는 X-비보 15(X-vivo 15) (론자(Lonza)))를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양물은 IL-3, IL-6, GM-CSF, SCF 및 TPO를 포함한다. 세포의 성장을 위한 다른 첨가제로는 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예컨대, N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 배지는 아미노산, 소듐 피루베이트, 및 비타민이 첨가되고, 무혈청의, 또는 적절한 양의 혈청 (또는 혈장), 또는 정의된 호르몬 세트, 및/또는 HSC 또는 전구 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 시토카인(들)으로 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-비보 15, 및 X-비보 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있다. 항생제, 예컨대, 페니실린 및 스트렙토마이신은 대상체에게 주입하고자 하는 세포 배양물이 아닌, 실험 배양물에만 오직 포함된다. 표적 세포는 성장을 지원하는 데 필요한 조건, 예를 들어, 적절한 온도 (예컨대, 37°C) 및 대기 (예컨대, 대기 + 5% CO<sub>2</sub>) 하에서 유지된다.

[0157] 세포를 배양하는 데 사용되는 배지는 변형된 세포의 확장을 자극할 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법에 의해 변형된 세포는 대략 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 2,000배, 3,000배, 4,000배, 5,000배, 6,000배, 7,000배, 8,000배, 9,000배, 10,000배, 100,000배, 1,000,000배, 10,000,000배 이상 확장될 수 있다. 한 실시양태에서, 변형된 세포는 변형된 세포의 배양에 의해 약 20배 내지 약 50배 이상의 범위로 확장된다.

#### 요법

[0159] 본원에 기술된 변형된 세포는 요법용 조성물 중에 포함될 수 있다. 조성물은 제약 조성물을 포함할 수 있고, 이는 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 치료학상 유효량의, 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물이 투여될 수 있다.

[0160] 한 측면에서, 본 발명은 변형된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 투여하는 단계로서, 여기서, 줄기 세포 또는 전구 세포는 내인성 유전자의 발현을 감소시킬 수 있는 핵산을 포함하고, 내인성 유전자는 키메라 항원 수용체 (CAR)에 의해 표적화되는 항원 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 단계를 포함하는, 키메라 항원 T 세포 (CART) 요법을 필요로 하는 대상체에서 CART 요법으로부터 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 보호하는 방법을 포함한다.

[0161] 또 다른 측면에서, 본 발명은 입양 세포 전달 요법을 필요로 하는 대상체에게 유효량의, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 투여하여 대상체를 치료하는 단계로서, 여기서, 대상체는 유효량의, 본원에 기술된 세포 및 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 항원 도메인을 표적화하는 CAR 요법을 투여받는 것인 단계를 포함하는, 입양 세포 전달 요법을 위한 방법을 포함한다.

[0162] 또 다른 측면에서, 본 발명은 병태 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료학상 유효량의, 본원에 기술된 방법에 따라 생성된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물을 투여하고, CAR T 세포 요법을 투여하고, 이로써, 병태를 치료하는 단계로서, 여기서, CAR은 내인성 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 항원 도메인을 특이적으로 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 단계를 포함하는, 병태 치료를 필요로 하는 대상체에서 병태를 치료하는 방법을 포함한다.

[0163] 본원에 기술된 변형된 세포는 대상체, 바람직하게, 포유동물, 더욱더 바람직하게, 인간에게 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체에서 적어도 하나의 혈액 세포 유형으로 분화된다. 또 다른 실시양태에서, 변형된 세포는 대상체 내로의 투여 이후 자기 재생이 가능하다.

[0164] 한 실시양태에서, 병태는 암이다. 각종 암의 예로는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 암은 백혈병, 예컨대, 급성 골수성 백혈병이다.

[0165] 추가로, 변형된 세포는 면역 반응을 억제시키기 위해 대상체, 바람직하게, 포유동물, 더욱더 바람직하게, 인간에게 투여될 수 있다. 변형된 세포는 면역 반응, 예컨대, 자가면역 질환, 예컨대, 당뇨병, 건선, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, GVHD, 동종이식 면역관용 유포 증강, 이식편 거부 등에 공통된 것인 면역 반응을 억제시키기 위해 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 세포는, 면역 반응, 특히, 세포-매개된 면역 반응이 감소되거나, 또는 다르게는 억제되는 것이 질환을 치료하거나, 또는 경감시키는 데 바람직한 것인 임의의 병태 치료를 위해 사용될 수 있다.

- [0166] 추가로, 변형된 세포는 병태, 예컨대, 자가면역 질환을 치료하기 위해, 대상체, 바람직하게, 포유동물, 더욱더 바람직하게, 인간에게 투여될 수 있다. 각종 자가면역 질환의 예로 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 자가면역 질환의 예로는 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS, 이는 자가면역 성분을 가지는 바이러스성 질환이다), 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역성 애디슨병, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 간염, 자가면역성 내이 질환 (AIED), 자가면역성 림프증식성 증후군 (ALPS), 자가면역성 혈소판감소성 자반병 (ATP), 베체트병, 심근증, 셀리악 스프루-포진성 피부염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 (CIPD), 반흔성 유사천포창, 한랭응집소증, 크레스트 증후군, 크론병, 디고스병, 소아 피부 균염, 원판상 루푸스, 본래성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 그레이브스병, 길랭-바雷 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP), IgA 신장병증, 인슐린 의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합성 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발성 근육통, 다발성 근육 염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 래이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 샤르코이드증, 경피증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 이는 또한 전신 경화증 (SS)으로도 공지됨), 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 다카야수 동맥염, 측 두 동맥염/거대 세포 동맥염, 케양성 대장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0167] 본원에 기술된 바와 같이 생성된 세포는 또한 변형될 수 있고, 염증성 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 염증성 장애의 예로는 만성 및 급성 염증성 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 염증성 장애의 예로는 알츠하이머병, 천식, 아토피성 알레르기, 알레르기, 죽상동맥경화증, 기관지 천식, 습진, 사구체신염, 이식편 대 속 주병, 용혈성 빈혈, 골관절염, 패혈증, 뇌졸중, 조직 및 기관 이식, 혈관염, 당뇨병성 망막병증 및 인공호흡기 유발 폐 손상을 포함한다.
- [0168] 또 다른 실시양태에서, 본원에 기술된 변형된 세포는 면역 반응 치료를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응 치료 용 의약 제조를 위해 사용될 수 있다.
- [0169] 본 발명의 세포는 적절한 임상전 및 임상 실험 및 시험에서 측정하고자 하는 투여량 및 경로 및 시점에 투여될 수 있다. 세포 조성물은 상기 범위 내의 투여량으로 수회에 걸쳐 투여될 수 있다. 본 발명의 세포의 투여는 당업자에 의해 결정되는 바와 같이, 원하는 질환 또는 병태의 치료에 유용한 다른 방법과 조합될 수 있다.
- [0170] 투여하고자 하는 본 발명의 세포는 요법을 받고 있는 대상체와 관련하여 자가 유래, 동종이계 또는 이종발생성 일 수 있다.
- [0171] 본 발명의 세포의 투여는 당업자에게 공지된 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본 발명의 세포는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 또는 이식에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 경동맥, 피하, 진피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 (iv) 주사에 의해, 또는 복강내로 환자에게 투여될 수 있다. 다른 경우에서, 본 발명의 세포는 대상체의 염증 부위, 대상체의 국소 질환 부위, 림프절, 기관, 종양 등에 직접 주사된다.
- [0172] 제약 조성물
- [0173] 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석체, 또는 부형제와 함께 조합하여, 본원에 기술된 변형된 세포를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 완충제, 예컨대, 중성 완충처리된 염수, 포스페이트 완충처리된 염수 등; 탄수화물, 예컨대, 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 벡스트란, 만낫톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대, 글리신; 항산화제; 퀼레이트제, 예컨대, EDTA 또는 글루타티온; 애주번트 (예컨대, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제제화된다.
- [0174] 본 발명의 제약 조성물은 치료하고자 (또는 예방하고자) 하는 질환에 적절한 방식으로 투여할 수 있다. 비록 적절한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있기는 하지만, 투여량 및 투여 빈도는 환자의 상태, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.
- [0175] "면역학상 유효량," "항-면역 반응 유효량," "면역 반응-억제 유효량," 또는 "치료량"이 지시될 때, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자 (대상체)의 연령, 체중, 면역 반응 및 상태의 개별적인 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로는 본원에 기술된 변형된 세포를 포함하는 제약 조성물은  $10^4$  내지  $10^9$

개의 세포/kg (체중), 바람직하게,  $10^5$  내지  $10^6$  개의 세포/kg (체중) (상기 범위 내의 모든 정수값 포함)인 투여량으로 투여될 수 있다고 명시될 수 있다. 세포 조성물은 또한 상기 투여량으로 수회에 걸쳐 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에 일반적으로 공지된 주입 기법을 사용하여 투여될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988] 참조). 특정 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 섭생은 의학 분야의 숙련가에 의해 환자를 질환의 정후에 대해 모니터링하고, 그에 따라 치료를 조절함으로써 쉽게 결정될 수 있다.

[0176] 본 발명의 특정 실시양태에서, 세포를 본원에 기술된 방법, 또는 세포를 치료 수준으로 확장시키는 당업계에 공지된 다른 방법을 사용하여 변형시키고, 예컨대, 항바이러스 요법, 시도포비어 및 인터류킨-2와 같은 작용제를 이용하는 치료, MS 환자를 위한 시타라빈(이는 또한 ARA-C로도 공지됨) 또는 나탈리주맙 치료 또는 전선 환자를 위한 에팔리주맙 치료, 또는 PML 환자를 위한 다른 치료를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 임의 개수의 관련된 치료 양상과 함께 (예컨대, 그 이전에, 그와 동시에 또는 그 이후에) 환자에게 투여된다. 추가 실시양태에서, 본 발명의 변형된 세포는 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대, 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역제거제, 예컨대, CAM PATH, 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 사이토신, 플루다리빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토킨 및 방사선 조사와 함께 조합하여 사용될 수 있다. 상기 약물은 칼슘 의존성 포스파타제 칼시뉴린 (시클로스포린 및 FK506)을 억제하거나, 또는 성장 인자 유도성 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다 (라파마이신). (문헌 [Liu et al., Cell 66:807-815, 1991]; [Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991]; [Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993]). 추가의 실시양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 화학요법제, 예컨대, 플루다라빈, 외부-빔 조사 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 또는 항체, 예컨대, OKT3 또는 CAMPATH를 사용하는 T 세포 제거 요법과 함께 (예컨대, 그 이전에, 그와 동시에 또는 그 이후에) 환자에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 작용제, 예컨대, 리툭산과 같은 B 세포 제거 요법 이후에 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체는 고용량의 화학요법을 이용하는 표준 치료를 받은 후, 이어서, 말초 혈액 줄기 세포 이식을 받을 수 있다. 특정 실시양태에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 이전 또는 이후에 투여된다.

[0177] 환자에게 투여하고자 하는 상기 치료의 투여량은 치료되는 병태의 정확한 성질 및 치료 수용자에 따라 달라질 것이다. 인간 투여를 위한 투여량의 크기 조정은 당업계에서 승인되는 관례에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어, CAMPATH에 대한 용량은 일반적으로 성인 환자의 경우, 1 내지 약 100 mg 범위이고, 일반적으로는 1 내지 30 일 동안 매일 투여될 것이다. 비록 일부 경우에는 최대 40 mg/일 이하의 더욱 큰 용량이 사용될 수도 있지만 (미국 특허 번호 6,120,766에 기술됨), 바람직한 1일 용량은 1 내지 10 mg/일이다.

[0178] 본 발명에 유용한 방법 및 조성물이 실시예에 기술된 특정 제제들로 제한되는 것은 아니라는 것을 이해하여야 한다. 하기 실시예는 당업계의 숙련가에게 본 발명의 세포 제조 및 사용 방법, 확장 및 배양 방법, 및 치료 방법에 관한 완전한 개시내용 및 설명을 제공하기 위해 제시되는 것이며, 이는 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0179] 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 실시는 분자 생물학 (재조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기법들을 사용하며, 이들은 충분히 당업자의 이해 범위 내에 있다. 상기 기법들은 문헌, 예컨대, 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012)]; ["Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010)]; ["Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997)]; ["Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987)]; ["Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002)]; ["Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011)]; ["Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002)]에 충분히 설명되어 있다. 이들 기법은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩ти드의 생성에 적용될 수 있으며, 따라서, 이는 본 발명의 제조 및 실시에서 고려될 수 있다. 특정 실시양태에 특히 유용한 기법들은 하기의 섹션에서 논의될 것이다.

#### 실험 실시예

[0181] 본 발명은 추가로 하기 실험 실시예를 참조로 하여 상세히 기술된다. 이들 실시예는 단지 예시 목적으로 제공되는 것이며, 달리 명시되지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 결코 하기 실시예로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 하며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 자명해지는 임의의 모든 변형을 포함하는 것으로서 해석되어야 한다.

- [0182] 추가의 설명 없이도, 당업계의 숙련가는 상기 설명 및 하기의 예시적인 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 사용하고, 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 간주된다. 그러므로, 하기의 실험 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 구체적으로 지적하여 알려주는 것이며, 본 개시내용의 나머지 부분을 어느 방식으로든 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.
- [0183] 이제, 본 실험에서 사용된 물질 및 방법을 기술한다.
- [0184] 구축물 클로닝. T7 프로모터하에서 발현된 인간 코돈 최적화된 Cas9는 양빙 자오 박사(Dr. Yangbing Zhao)로부터 기증받았다. mMessege mM머신 T7 울트라(mMessage mMachine T7 Ultra) 키트 (엠비온(Ambion), AM1345)를 사용하여 Cas9 mRNA를 시험관내에서 전사시켰다. 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 가이드 RNA (gRNA)를 pUC57-sgRNA 플라스미드 (애드진 51132(Addgene 51132))로 클로닝하였다. T7-스크라이브 스탠다드 RNA IVT(T7-Scribe Standard RNA IVT) 키트 (셀스크립트(Cellscript), C-AS2607)를 사용하여 gRNA를 시험관내에서 전사시켰다. RN이지 미티 키트(RNeasy Mini Kit) (퀴아젠(Qiagen), 74104)를 사용하여 정제하였다.
- [0185] 1차 CD34+ 세포 단리. 펜실베이니아 대학(University of Pennsylvania)의 스템 셀 앤드 제노그래프트 코어 (Stem Cell and Xenograft Core)로부터 냉동된 CD34+ 세포를 구입하였다. 대안적으로, 펜실베이니아 대학 병원(Hospital of the University of Pennsylvania)에서 더 이상 사용되고 있지 않은 임상 표본으로부터 자가 유래 줄기 세포 기증자로부터의 G-CSF 동원 말초 혈액을 입수하였고, CD34 마이크로비드 키트(CD34 Microbead Kit) (밀테니이(Miltenyi), 130-046-702)를 사용하여 CD34+ 선별을 수행하였다. CD34+ 세포 순도는 유세포 분석법에 의해 >95%인 것으로 확인되었다. 전기천공 이전에 세포를 밤새도록 휴지시켰다.
- [0186] 세포 배양. 10% FBS로 보충된 RPMI-1640 배지 (R10) 중에서 Molm14 세포를 배양하였다. 인간 시토카인 (SCF 100 ng/ul, Flt3 리간드 100 ng/ul, TPO 50 ng/ul, IL-6 50 ng/ul)으로 보충된 스템스판 SFEM(StemSpan SFEM) (스템 셀 테크놀로지즈(Stem Cell Technologies), 09650) 중에서 CD34+ 세포를 배양하였다.
- [0187] 전기천공. Molm14 또는 CD34+ 세포를 한번 세척하고, 옵티-MEM(Opti-MEM) 중에 재현탁시키고, 400 V 및 5 msec의 단일 펄스를 사용하여 BTX ECM 830 스퀘어 웨이브 일렉트로포레이션 시스템(BTX ECM 830 Square Wave Electroporation System) (하버드 애퍼레이터스(Harvard Apparatus))을 이용함으로써 Cas9 mRNA로 전기천공시켰다. 세포를 32°C에서 밤새도록 인큐베이션시키고, 다음날 동일한 기계 및 설정 환경을 사용하여 gRNA로 다시 전기천공시켰다. 세포를 그 다음날까지 32°C에서 유지시키고, 이후, 세포를 분석시까지 37°C에서 배양하였다. 대안적으로, 동일한 설정 환경을 사용하여 CD33 표적화된 gRNA와 복합체를 형성한 Cas9 단백질 (PNA 바이오(PNA Bio), CP02)로 1회에 걸쳐 전기천공시켰다. 세포를 32°C에서 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 이어서, NSG 마우스에 주사하거나, 또는 추가 분석을 위해 37°C에서 유지시켰다.
- [0188] 마우스 이식 연구. 생체내 연구를 위해, 8-12주령된 NOD-SCID-IL2rg<sup>-/-</sup> (NSG) 마우스를 원래는 잭슨 라보라토리즈(Jackson Laboratories)로부터 입수하였고, 펜실베이니아 대학의 스템 셀 앤드 제노그래프트 코어로부터 구입하였다. 마우스에 부술판 30 mg/kg을 주사하였고, 그 다음날 1-5x10<sup>5</sup>개의 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 주사하였다. 인간 생착 프로파일을 모니터링하기 위해 매 4주마다 마우스를 안와 후방으로 출혈시켰다. 생착 12주 후, 마우스에 1-5x10<sup>6</sup>개의 자가 유래 CD33 표적화 CAR T 세포를 주사하였다. 실험 종료시, 골수 및 비장을 수확하여 계통 조성에 대해 사정하였다.
- [0189] 콜로니 형성 세포 (CFC) 검정법. 전기천공 다음날, 1,000개의 CD34+ 세포를 6 웰 플레이트 상에 1.1 ml의 메틸 셀룰로스 (메쏘컬트 H4435 인리치트(MethoCult H4435 Enriched), 스템 셀 테크놀로지즈) 중에 이중으로 플레이팅하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 습도 95%에서 2주 동안 배양하였다. 이어서, 콜로니를 계수하고, 점수화하였다. 개별 콜로니를 채취하고, 50 mM NaOH 및 0.2 mM EDTA를 함유하는 40 μl 용해 완충제 중에서 용해시켰다. 샘플을 20 분 동안 95°C까지 가열한 후, 냉각시키고, 그 이후, 1 μl의 1 M 트리스C1(TrisC1)을 첨가하였다. PCR을 위해 제조사의 설명서에 따라 어쿠프라임 Pfx 수퍼믹스(AccuPrime Pfx SuperMix) (인비트로겐(Invitrogen), 12344-040)와 함께 2 μl의 반응물을 사용하였다. 또한, 메쏘컬트 웰을 밤새도록 R10 배지로 가용화시키고, 단일 세포 혼탁액에 대해 유세포 분석법을 수행하였다. 시토스핀에 의해 세포 형태를 분석하고, 디프록 염색 방법으로 염색하였다.
- [0190] 유세포 분석법. 전기천공 후 7일째에 CD34+ 세포를 평가하는 데 하기 항-인간 항체를 사용하였다: CD34-APC (바이오레전드(BioLegend), 343510), CD38-BV711 (바이오레전드, 303528), CD33-PE (e바이오사이언스(eBioscience), 12-0339-41), CD45-BV421 (바이오레전드, 304032), 및 라이브/데드 픽서블 아쿠아(Live/Dead

Fixable Aqua) (라이프 테크놀로지즈(Life Technologies), L34957). 음성 세포 백분율을 계이팅하는 데 FMO 대조군을 사용하였다. 메쏘컬트 분화된 세포의 경우, 상기와 같은 CD45-BV421, CD33-PE 및 라이브/데드 픽서블 아쿠아 이외에도, CD11b-FITC (바이오레전드, 301329), CD14-APC (BD, 340436)를 사용하였다. 마우스 말초 혈액 분석을 위해, 마우스 CD45-APC/Cy7, 인간 CD45-BV421, CD3-BV605, CD19-PE/Cy7, CD33-PE, CD11b-FITC, 및 CD14-APC를 사용하였다.

- [0191] DNA 분석. 하이 퓨어 PCR 템플레이트 프레페레이션 키트(High Pure PCR Template Preparation Kit) (로슈 (Roche), 11796828001)를 사용하여 Molm14 및 CD34+ 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 하기 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다:
- [0192] CD33F: 5'-AGCTGCTTCCTCAGACATGC-3', 서열 번호: 1.
- [0193] CD33R: 5'-CTGTATTGGTACTTCCTCTCTCCA-3', 서열 번호: 2.
- [0194] 서베이어 뮤테이션 디텍션(Surveyor Mutation Detection) 키트 (트랜스제노믹스(Transgenomics))를 사용하여 돌연변이를 검출하고, 이미지J(ImageJ) 소프트웨어를 사용하여 밴드 강도를 분석하였다. 생어 서열분석에 의해 PCR 앰플리콘을 분석하고, TIDE (분석에 의한 In/dels 추적(Tracking of In/dels by Decomposition)) 소프트웨어를 사용하여 대립유전자 변형 빈도를 산출하였다.
- [0195] 세포독성. 대조군 (EMX1) 또는 CD33 표적화 gRNA로 전기천공된 CD34+ 세포를 1:1 비율로 T 세포와 함께 72시간 동안 인큐베이션시켰다. 하기 항체를 사용하여 배양물 중에 남아있는 T 세포 및 CD34+ 세포의 개수를 분석하였다: CD3-PE Cy7 (e바이오사이언스, 24-0038-42), CD34-APC (바이오레전드, 343510), CD38-BV711 (바이오레전드, 303528), CD33-PE (e바이오사이언스, 12-0339-41), CD45-BV421 (바이오레전드, 304032), 및 라이브/데드 픽서블 아쿠아. 카운트브라이트(Countbright) 절대 계수용 비드 (인비트로겐, C36950)를 첨가하여 세포 분획의 절대 개수를 정량화하였다.
- [0196] 이제, 본 실험의 결과를 기술한다.
- [0197] **실시예 1: CD33 넉아웃 (KO) HSPC 생성 및 조혈 재생**
- [0198] 인간 HSC의 CRISPR/Cas9 매개 유전자 편집에 관한 선행 연구를 통해 *CCR5* 유전자의 30%의 동형 접합성 넉아웃을 달성하였고, 이는 본원에 기술된 접근법의 실행 가능성을 입증하는 것이다 (문헌 [Mandal et al. Cell Stem Cell. 2014;15: 643-652]). 선행 연구에서는 Cas9 및 sgRNA를 G-CSF 동원 말초 혈액 CD34+ 세포 내로 도입시키는 데 뉴클레오팩션을 사용하였다. 본원에 기술된 연구는 Cas9 및 gRNA를 CD34+ 세포의 다중 공급원으로 전달하는 상이한 방법을 이용함으로써 HSC에서 CRISPR/Cas9로 이루어지는 유전자 편집에 대한 이해를 촉진시킨다.
- [0199] 원리 증명으로서, *CD33* 유전자가 넉아웃된 인간 조혈 줄기 세포 (CD33 KO HSC)를 시험하였다. *CD33*은 골수계 계통의 세포 상에서 및 대부분의 AML 상에서 발현되는 세포 표면 수용체이다. 이는 시아릴화된 당단백질을 인식하는, 시알산-결합, 면역글로불린-유사 렙틴 (siglec) 패밀리에 속한다. 상기 단백질은 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기반 억제성 모티프 (ITIM)를 보유하는데, 이는 억제성 신호전달 기능을 제안하는 것이다. 조혈계에서의 *CD33*의 정확한 역할은 잘 알려져 있지 않고, 골수계 세포 기능에는 필수적이지 않을 수도 있다. *CD33* 손실의 영향을 이해하기 위해 *CD33* KO HSC의 기능적 능력을 사정하였다.
- [0200] 도엔크(Doench) 등 (문헌 [(Nat Biotechnol. 2014;32: 1262-1267)])에 의해 확인된 *CD33*에 대하여 고도의 활성을 띠는 4개의 gRNA를 Molm14 세포주에서 스크리닝하였다. *CD33* CART 세포가 비-*CD33* 발현 세포를 인식하고, 그를 표적화하는지 여부를 측정하기 위해, Molm14 세포를 1일째에는 Cas9 mRNA로, 및 2일째에는 gRNAv1-5로 전기천공시켰다. 유세포 분석법 및 서베이어 뉴클레아제 검정법에 의해 측정된 바, *CD33*의 표현형상의 손실을 발생시키는 데 있어 gRNAv5가 최고의 효능을 보였다 (도 1a-1b).
- [0201] 동원 말초 혈액으로부터의 CD34+ 세포를 처음에는 Cas9 mRNA로, 및 이어서, *CD33* 표적화 gRNA로 2회에 걸쳐 전기천공시키거나, 또는 대안적으로, 동일한 gRNA와 복합체를 형성한 Cas9 단백질로 1회에 걸쳐 전기천공시켰다. 도 2a는 전기천공 후 7일째 수행된 유세포 분석법에 의한 *CD33* 발현에 관한 대표적인 플롯을 보여주는 것이다. 도 2b는 gRNA 표적 부위에 걸쳐 있는 PCR 앰플리콘에 관한 TIDE 분석에 의해 측정된 indel 빈도로서, 상이한 기증자; RNA의 경우, n=4 및 RNP의 경우, n=2에 대한 평균값으로 제시된 것인 indel 빈도를 보여주는 그래프이다.
- [0202] *CD33* 양성 (D6 및 주르카트 세포) 및 음성 세포(Molm14 세포)를 *CD33* CART 세포와 함께 공동 배양하였다. 도 3a-3b는, *CD33*이 *CD33* 양성 세포를 선택적으로 표적화한 반면, *CD33* 음성 세포는 탈파립화 또는 용해를 보이지

않았다는 것을 보여주는 것이다.

- [0203] Cas9 mRNA 및 gRNA의 RNA 전기천공을 사용하여 G-CSF 동원 말초 혈액 (mPB) CD34+ 세포로부터 CD33 네아웃 (KO) HSC를 생성하는 데 상기의 gRNA를 사용하였다 (도 4a-4d). CD33 KO HSC는 CD33 발현 손실을 입증하였다. 4명의 기증자로부터의 세포를 사용하여, 본 방법은 30-50%의 생존력을 보이는, 30-60%의 편집된 세포를 생성하였다.
- [0204] CD33 KO HSC 콜로니의 생어 서열분석 결과, 많은 비율의 돌연변이체 클론이 Cas9 절단 부위에 단일 A 뉴클레오티드 삽입 (+A 돌연변이)을 보유한 것으로 밝혀졌다 (도 4c). 상기 프레임시프트 돌연변이체는 CD33 단백질 코딩 서열에서 일찍 정지 코돈을 생성하였고, 이로써, CD33은 확실하게 발현되지 못했다. 상동성-유도 수복 (HDR) 주형을 Cas9/gRNA에 부가하면, 이는 가능하게는 무손상 자매 염색체보다는 대체 수복 주형을 제공하기 때문에, 돌연변이의 빈도를 증가시킬 수 있다고 보고된 바 있다. 그러므로, CD33 KO HSC의 개수를 추가로 증가시키고자 하는 것을 목표로 하여, +A 돌연변이를 포함하는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드 HDR 수복 주형을 가장 효과적인 전기천공 방법에 추가시킬 수 있다.
- [0205] 임상 환경에서, CD34+ 세포의 상이한 공급원 (mPB, 제대혈, 및 콜수)은 HLA 매칭된 기증자의 이용가능성에 기초하여 사용되어야 할 필요가 있다. 각 공급원은 독특한 특징을 가지고 있으며, CRISPR 매개 유전자 편집의 효능은 공급원에 기초하여 달라진다. CD34+ 세포의 상이한 공급원을 사용하였을 때의 CD33 KO HSC 생성 효능을 비교하였다. 본원에서 사용된 본 발명의 프로토콜을 통해 공급원에는 상관없이, CD34+ 세포에서 높은 비율의 CD33 KO가 생성되었다 (도 4d).
- [0206] RNA 전기천공 사용시, 최대 60% 효능으로 CD33 KO HSC가 생성되었다. 본 방법의 한계는 2회의 전기천공 이후, 세포의 생존력인데, 이는 생체내 생착 실험을 위해 충분한 개수의 세포를 수득하기 위해서는 큰 출발 집단을 필요로 한다. 대신, 증가된 세포 생존력과 함께 고효율의 전기천공이 이루어질 수 있도록 하기 위해 동일한 gRNA와 복합체를 형성한 Cas9 단백질로 수행되는 단일 전기천공을 사용하였다 (도 2a-2b).
- [0207] 현재까지, 대조군 HSC와 비교하였을 때, CD33 KO HSC가 어떤 식으로든 결핍이라는 증거는 발견되지 않았다. 대조군으로서, 뇌 발생에 관여하는 전사 인자를 코딩하는 유전자인 EMX1을 표적화하는 gRNA로 세포를 전기천공시켰다. EMX1 및 CD33 KO HSC, 둘 모두 배양물 중에서 유사한 속도로 성장하였고 (도 5a), 메틸셀룰로스 콜로니 형성 검정법 결과, 골수계 및 적혈구계 콜로니, 둘 모두 개수가 등가인 것으로 나타났다 (도 5b 및 6). CD33 KO 세포의 시토스핀을 통해 중성구 및 대식세포 세포의 형태는 정상적인 것으로 나타났다 (도 5c).
- [0208] CD33 KO HSC의 분석 결과, 세포가 대조군 HSC와 유사한 CD3 및 CD45 발현을 보인 것으로 나타났다 (도 7a). 대조군 HSC를 시험판내에서 CART33과 함께 인큐베이션시켰을 때, 수일 동안의 시험판내 배양 이후 대다수를 차지한 것인 CD33 양성 세포 집단의 CART33 매개 사멸에 기인하여 세포 계수는 현저히 감소되었다. 그에 반해, CD33 KO HSC는 CART33 처리 후에 남아있는 상당수의 잔존 세포를 가졌다 (도 7b).
- [0209] KO HSC와의 비교로 CD33 KO HSC에 관한 더욱 상세한 기능적 평가를 수행하였다. NSG 마우스에 EMX1 또는 CD33 KO HSC를 생착시켰다. EMX1 또는 CD33 KO HSC가 생착된 마우스는 정상적인 골수계 발생을 보였다. CD33 KO HSC는 성숙한 골수계 세포 (중성구 및 대식세포)로 분화하였다. 시토스핀 및 유세포 분석법에 의한 특징적인 세포 표면 마커 (CD11b, CD15, CD14, CD16, CD45, CD66b, 및 HLA-DR)에 의해 세포 형태를 분석하였다 (도 8).
- [0210] CD33 KO 인간 CD34+ 세포는 장기간 다중 계통 생착이 가능하였다 (도 9a-9b). 1차 인간 CD34+ 세포는 G-CSF 동원 말초 혈액으로부터 유래되었고 (도 9a), 이는 등가인 개수 및 형태의 조혈 골수계 및 적혈구계 콜로니로 유도하였다 (도 9b). 8-12주령된 NSG 마우스에 대조군 또는 CD33-KO CD34+ 세포를 주사하였다. 12주 경과 후, 말초 혈액 중 hCD45의 백분율 (생착)을 측정하였다 (도 9c). B 세포(CD19+), CD3+ T 세포(CD3+), 및 비-림프 계 세포가 검출되었고, 두 군 사이에는 어떤 유의적인 차이도 없는 것으로 나타났다 (도 9d). CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서 인간 골수계 세포는 유의적으로 감소된 수준의 CD33 발현을 보였지만, 대조군 HSPC 생착된 마우스와 비교하였을 때, CD11b+14+ 발현에 있어서는 어떤 차이도 관찰되지 않았다 (도 9e 및 9i). 추가로, 16주 후에 수확된 골수는 마우스 및 CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서 동일 수준의 인간 CD45+ 생착을 보였다 (도 9f). 대조군 또는 CD33 KO HSPC가 생착된 마우스의 골수에서 인간 줄기 세포 및 골수계 전구체 수준에 있어서는 어떤 유의적인 차이도 없었다 (도 9g). 골수를 1차 생착 후 16주 경과하였을 때, NSG 마우스로부터 수확한 후, 이어서, 2차 수혜자로 전달하고, 추가로 12주 후에 분석하였다. 지속적인 CD33 KO 표현형과 함께 지속적인 인간 생착이 관찰되었다 (도 9h). 골수에서, CD33KO 또는 CD33WT 군 사이에서 전체 인간 생착에 있어서 (도

9i, 좌측 상단), 림프계 및 골수계 계통으로의 분화에 있어서는 어떤 차이도 관찰되지 않았고 (도 9i, 우측 상단), 단, 예외적으로, CD33 발현이 감소되었다 (도 9i, 좌측 하단). CD33KO로부터의 골수계 세포는 대조군과 유사한 수준의 CD11b 및 CD14 발현을 보였다 (도 9i, 우측 하단). 16주 동안의 1차 이식 종료시, 비-림프계 인간 세포 상의 CD33의 발현은 이종이식편 생착된 마우스의 골수에서의 장기간에 걸쳐 CD33이 안정적으로 존재하지 않음을 나타내었다 (도 9j).

[0211] 실시예 2: CD33 KO HSPC는 CD33 표적화 요법에 대하여 내성을 띤다.

[0212] 대조군 또는 CD33 KO HSPC가 생착된 NSG 마우스에 자가 유래 CART33 세포를 제공하고, 4주 경과 후에 잔존 인간 골수계 세포를 사정하였다 (도 10a). CART33으로 처리된 마우스의 말초 혈액 중에서 CD33을 제거하였고, 이를 통해 대조군 HSPC 생착된 마우스에서는 골수계 세포 (CD11b14+)가 제거된 반면, CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서는 골수계 세포가 지속되었다 (도 10b). 대조군 HSPC 생착된 마우스에서는 골수 제거가 관찰된 반면, CART33 처리 후 CD33 KO HSPC 생착된 마우스의 말초 혈액, 비장, 및 골수에서는 골수계 세포가 검출되었다 (도 10c). 대조군과 비교하였을 때 CD33 KO HSPC 생착된 마우스에서는 CART33 처리 후 인간 전구 세포가 유의적으로 증가되었다 (도 10d).

[0213] 추가로, CART33이 CD33 KO HSPC에는 해를 가하지 않으면서, AML을 근절시킬 수 있다는 것이 본원에서 입증되었다. 먼저, NSG 마우스에 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 생착시킨 후, 녹색 형광 단백질 및 루시페라제를 발현하도록 조작된 AML 세포주인 Molm14를 주사한 후, CART33으로 처리하였다 (도 11a). AML 질환 부담은 생체발광 영상화 (BLI)에 의해 측정한 반면, 인간 HSPC는 말초 혈액의 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 대조군 및 CD33 KO HSPC 생착된 마우스, 둘 모두 CART33 처리 후 AML 질환 관해가 시작되었다 (도 11b). CART33 처리 후 1-2주 이내에 대조군 및 CD33 KO HSPC 생착된 마우스, 둘 모두에서 종양 부담이 감소되었다 (도 11c). AML의 CART33 처리 후, CD33 KO HSPC 생착된 마우스는 대조군과 대조적으로 말초 혈액 (PB), 비장, 및 골수 (BM)에서 지속적인 CD14+ 골수계 세포를 나타내었다 (도 11d). 인간 전구 세포는 오직 CD33 KO HSPC 군에서만 CART33 매개 독성으로부터 해를 입지 않았다 (도 11e).

[0214] 실시예 3: CD33 KO 골수계 세포는 정상적인 기능을 유지할 수 있다.

[0215] 본원에 기술된 실험을 통해 CD33 KO HSPC 자손은 어떤 기능적 결함도 없다는 것이 입증되었다 (도 12a-12f). HSPC 생착된 마우스 골수로부터 수득된 인간 세포는 일반적인 줄기 세포 (아세포), 골수계 전구체 (전골수세포), 및 최종 이펙터 세포(단핵구 및 중성구)의 특징적인 형태적 특성을 보였다 (도 12a). 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 시험관내에서 골수계 시토카인 (SCF, TPO, Flt3L, IL-6, GM-CSF, IL-3)으로 분화시키고, 파고솜에서 산성화되었을 때, 녹색 형광을 보이는 pH로도 녹색 E. 콜라이 생체입자와 함께 인큐베이션시켰다 (도 12b). 대조군과 CD33 KO HSPC 사이에서 식세포 작용(%)에서의 어떤 유의적인 차이도 관찰되지 않았다 (도 12b). 차별적으로 발현된 유전자는 도 12c에 도시되어 있으며, 여기서, 각 행은 유전자에 상응하고, 각 열은 대조군 (ctrl) 또는 CD33 KO (KO)로부터의 한 샘플을 나타내고; 번호는 원 기증자를 나타낸다. 본 결과는 개별 유전자의, 또는 CD33 단독의 KO에 의한 경로의 유의적인 변화는 없었다는 것을 시사한다. 대조군 및 CD33 KO 샘플의 유전자 발현 값은 서로 강력한 상관관계를 가졌다 (도 12d). 마우스에 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 생착시키고, rhG-CSF를 주사하였다. 말초 혈액 인간 단핵구 (CD11b+14+) 및 중성구 (CD11b+14-)의 절대 개수를 측정하였다. 기준선 수준과 비교하였을 때, 세포 개수에 있어 어떤 유의적인 변화도 없었다 (도 12e). 마우스에 대조군 또는 CD33 KO HSPC를 생착시키고, 지질다당류를 주사하였다. 혈청내 인간 시토카인 수준은 두 군 간에 유사하였다 (도 12f).

[0216] CD33 KO 프로토콜에 의해 생성된 잠재적 오프-타겟 돌연변이를 조사하였다. 2가지 웹 도구 (<http://cripsr.mit.edu>, <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)를 사용하여 인실리코 예측된 상위 12개의 오프-타겟 부위를 확인하였다 (도 13a). 슈도진인 SIGLEC22P가 CD33 유전자와 고도의 상동성을 가지며, 여기서, CD33 표적화 gRNA의 결합 부위와 100% 동일하다 (도 13b). 다르게는, CD33 및 SIGLEC22P에서는 고도의 온-타겟 돌연변이가 검출되었음에도 불구하고, 다른 SIGLEC 유전자에서는 서베이어 미스매치 검정법에 의해 어떤 돌연변이도 검출되지 않았다 (도 13b).

[0217] 실시예 4: 레서스 마카크에서의 자가 유래 CD33 KO 줄기 세포 이식

[0218] G-CSF 및 플레릭사포르를 사용하여 레서스 마카크 CD34+ HSPC를 동원하고, 성분채집술에 의해 제거하고, CD33의 CRISPR/Cas9 기반 유전자 넉아웃으로 유전자 편집을 수행한다. 그 동안, 원숭이를 방사선 조사 (TBI)로 조절하고, 이후, 편집된 HSPC의 재주입을 받도록 한다. 시험관내에서 분화된 HSPC의 CD33 발현을 대조군 및 KO 세포

에서 측정한다. CD33 유전자좌의 서열분석의 TIDE 분석 또한 수행한다. 이식을 받은 동물의 PB로부터의 선택된 하위집단 상에서의 CD33의 발현을 분석한다.

[0219] 본원에 기술된 조성물 및 방법을 통해 이환된 세포 상에서 선택적으로 발현되는 식별가능한 세포 표면 마커 없이도, CART 요법 및 다른 강력한 항체 기반 치료제, 예컨대, BITE는 질환을 치료할 수 있게 될 것이다. 본원에 기술된 조성물 및 방법은 유전적으로 조작된 치료에서 수직적 진보를 제공한다.

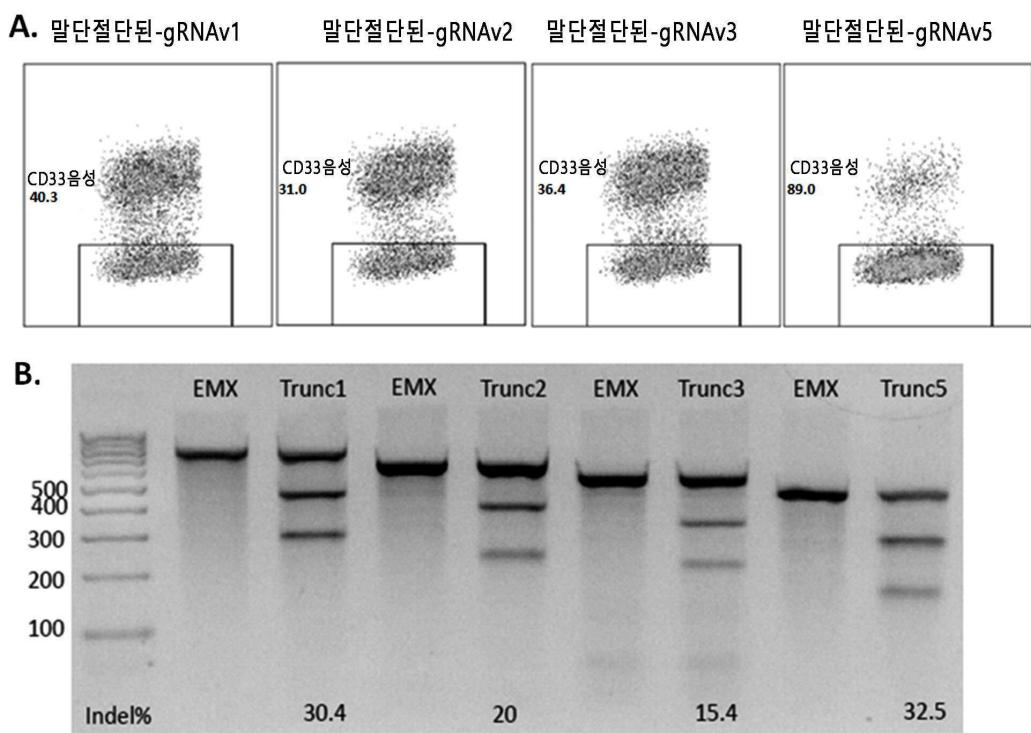
#### [0220] 다른 실시양태

[0221] 본원에서 변수에 관한 임의의 정의에서 요소들의 목록을 열거한 것은 상기 변수의 정의를 임의의 단일 요소로서 또는 열거된 요소들의 조합 (또는 하위조합)으로서 포함한다. 본원의 실시양태를 열거한 것은 상기 실시양태를 임의의 단일 실시양태로서 또는 임의의 다른 실시양태 또는 그의 일부와 함께 조합으로 포함한다.

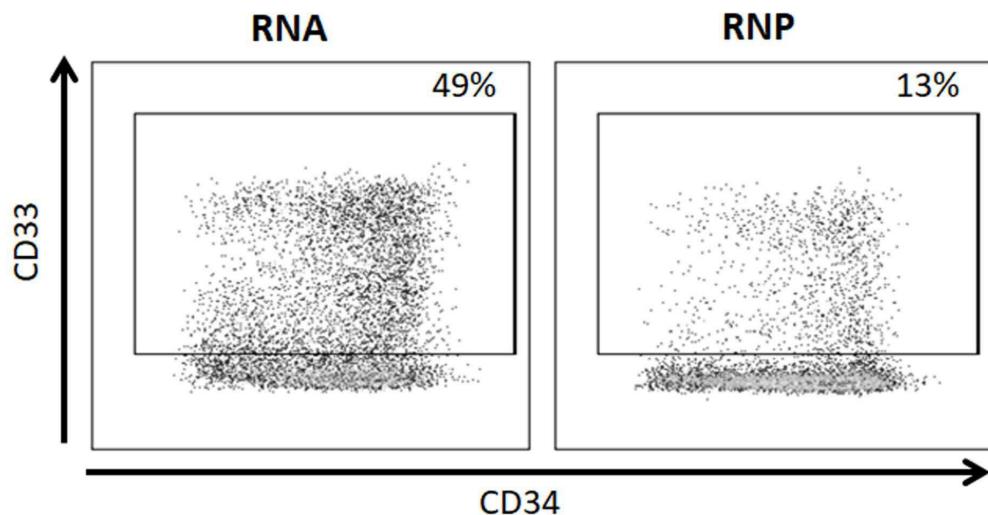
[0222] 본원에서 인용된 각각의 모든 특허, 특히 출원 및 공개문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다. 본 발명이 구체적인 실시양태를 참조로 하여 개시되었지만, 본 발명의 진정한 정신 및 범주로부터 벗어남 없이 당업자에 의해 본 발명의 다른 실시양태 및 변형이 고안될 수 있다는 것은 자명하다. 첨부된 특허청구범위는 상기와 같은 모든 실시양태 및 등가인 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 하는 것으로 의도된다.

### 도면

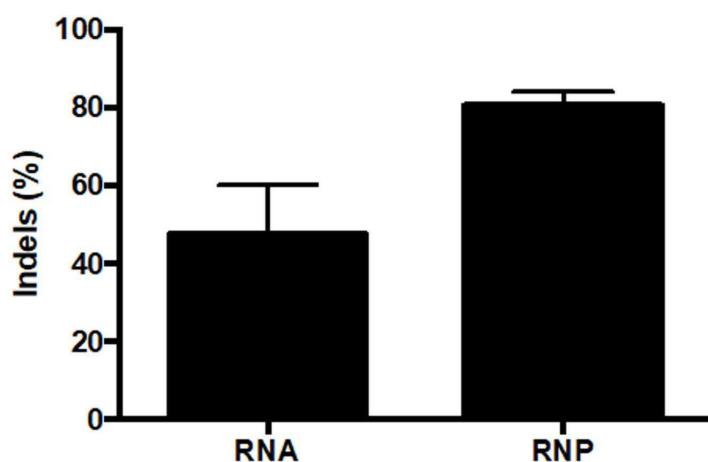
#### 도면1



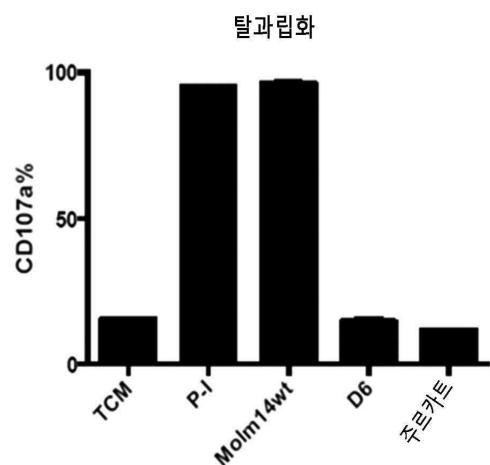
도면2a



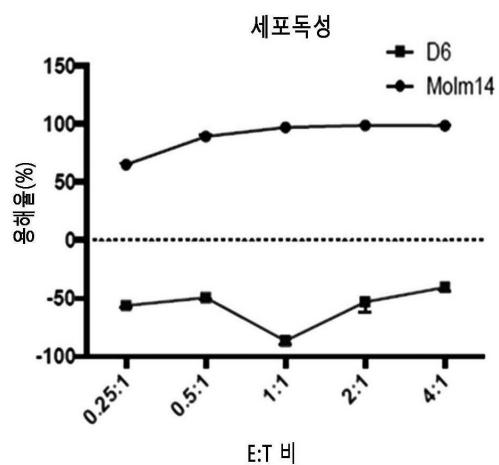
도면2b



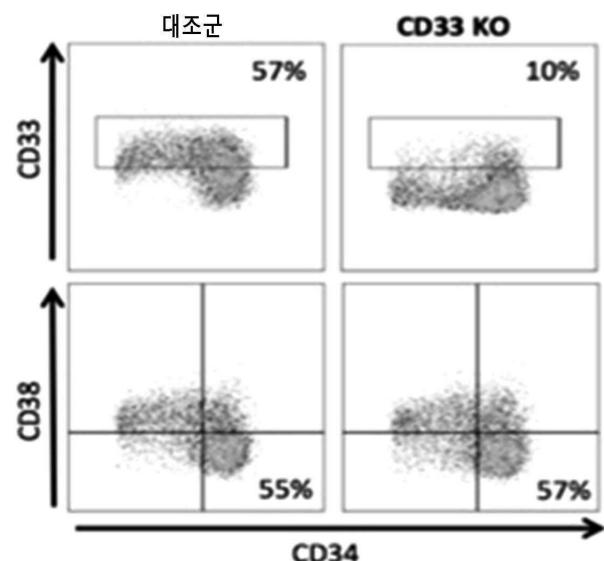
도면3a



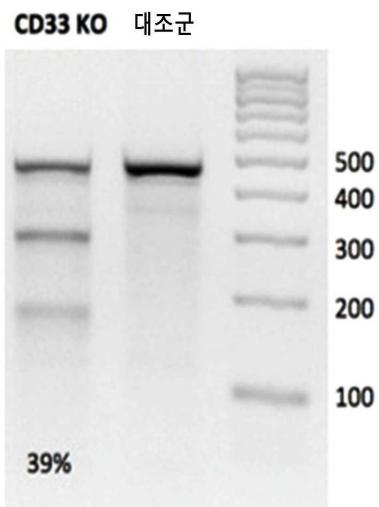
도면3b



도면4a



## 도면4b



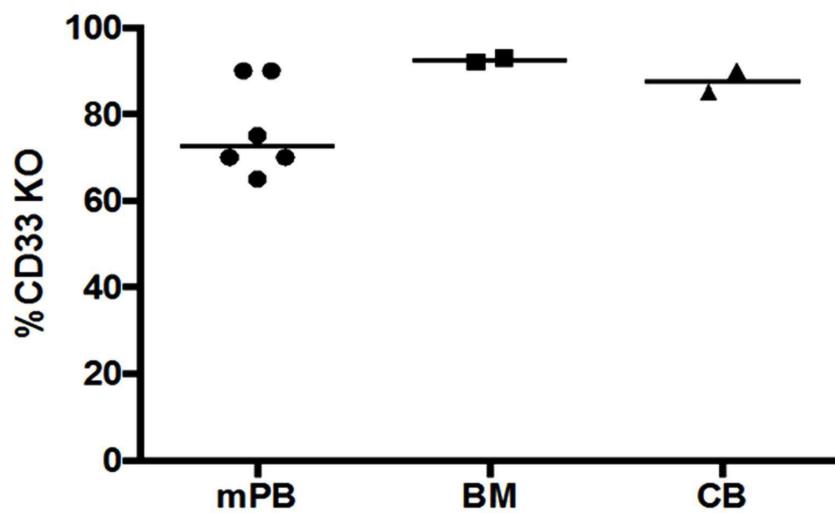
## 도면4c

**CD33-gRNA ▼ PAM**

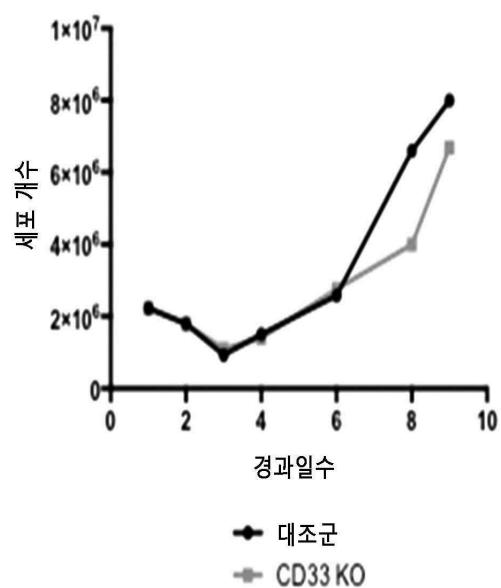
5'-GCAGGAGTCAGTGACGGTACAGGAGGGTTGTGCGTCC-3'

|           |  |                    |
|-----------|--|--------------------|
| <u>wt</u> | GCAGGAGTCAGTGACGGTACA                  | GGAGGGTTGTGCGTCC   |
| +1        | GCAGGAGTCAGTGACGGTACAAGGAGGGTTGTGCGTCC |                    |
| D2        | GCAGGAGTCAGTGACGGTA--                  | GGAGGGTTGTGCGTCC   |
| D14       | GCAGGAGTCAGTGACGGT----                 | ----- GCGTCC       |
| D15       | GCAGGAGTCAGTGACG-----                  | ----- TGCGTCC      |
| D18       | GCAGGGAG-----                          | ----- GTTTGTGCGTCC |
| D20       | GCAGGAGTCAGTG-----                     | ----- CGTCC        |

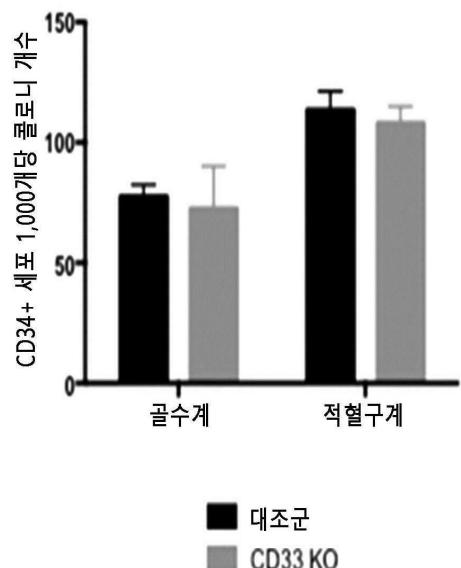
도면4d



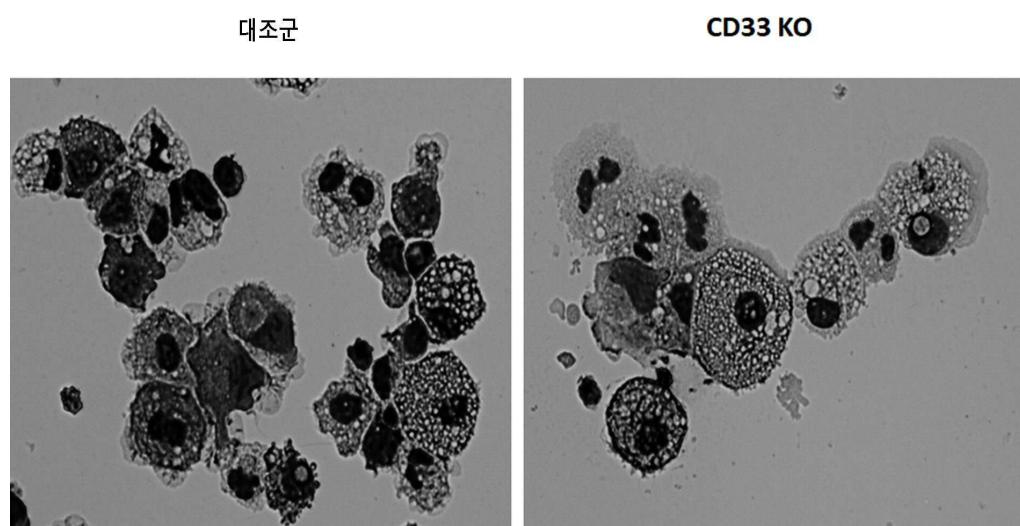
도면5a



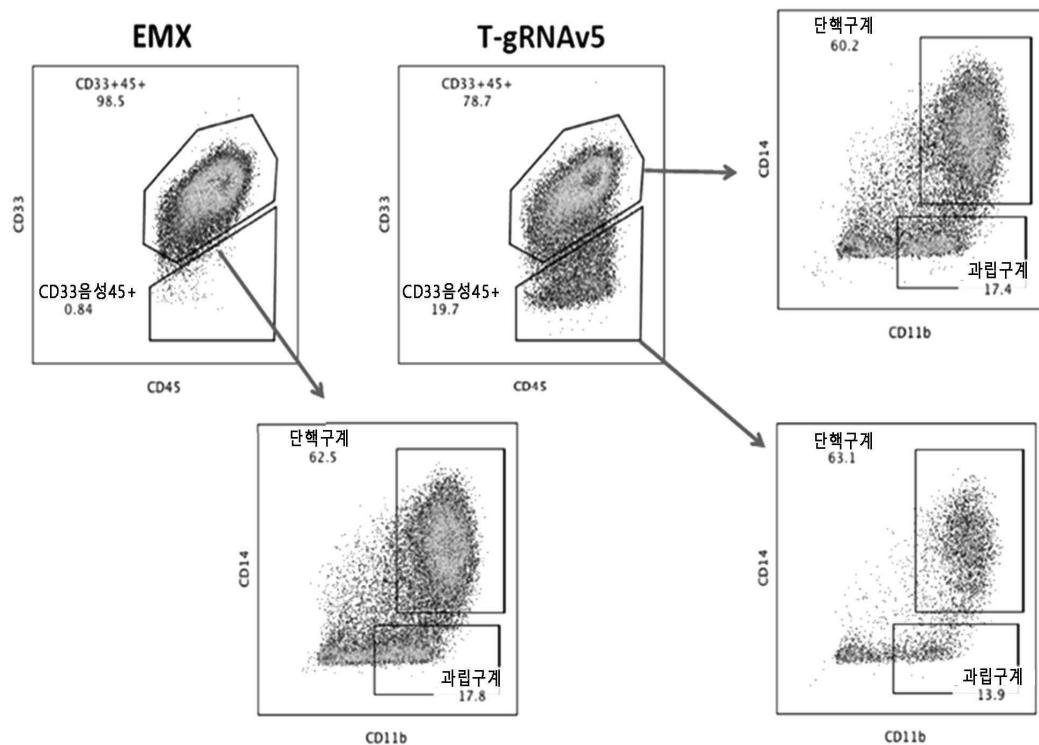
도면5b



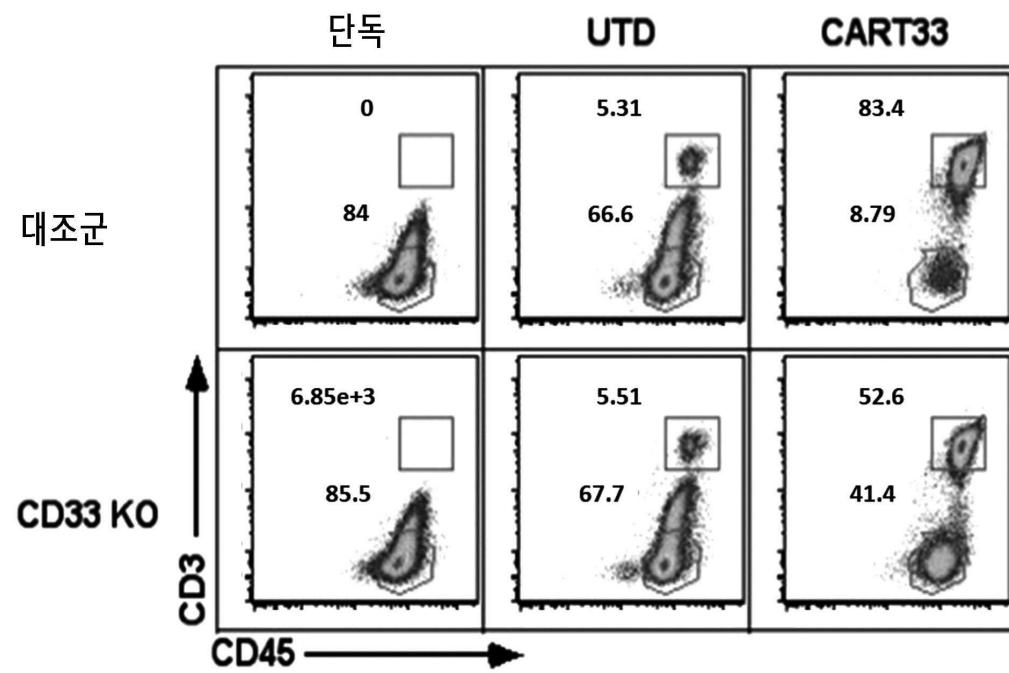
도면5c



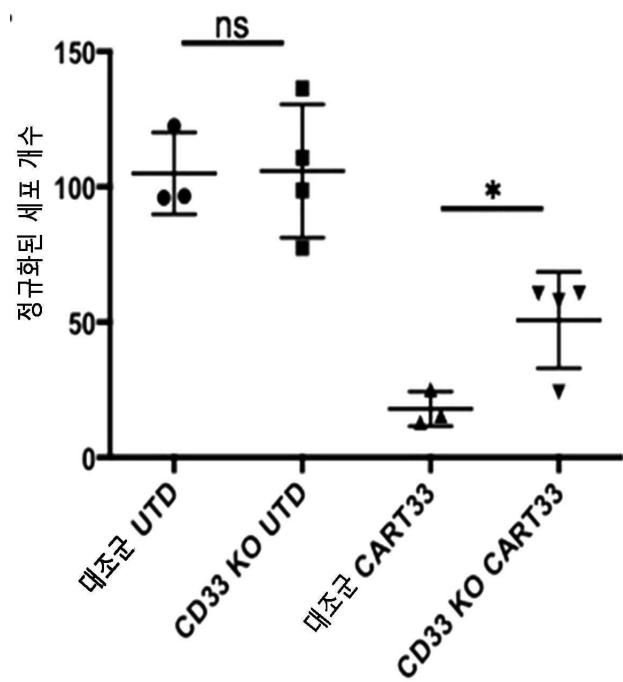
## 도면6



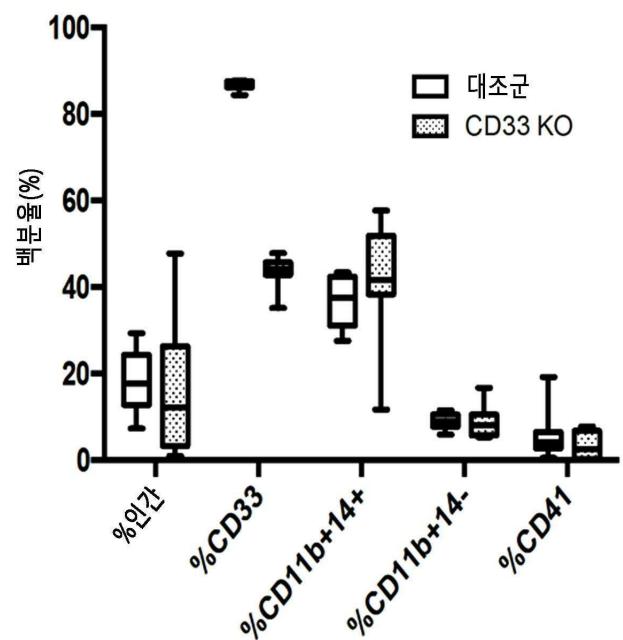
## 도면7a



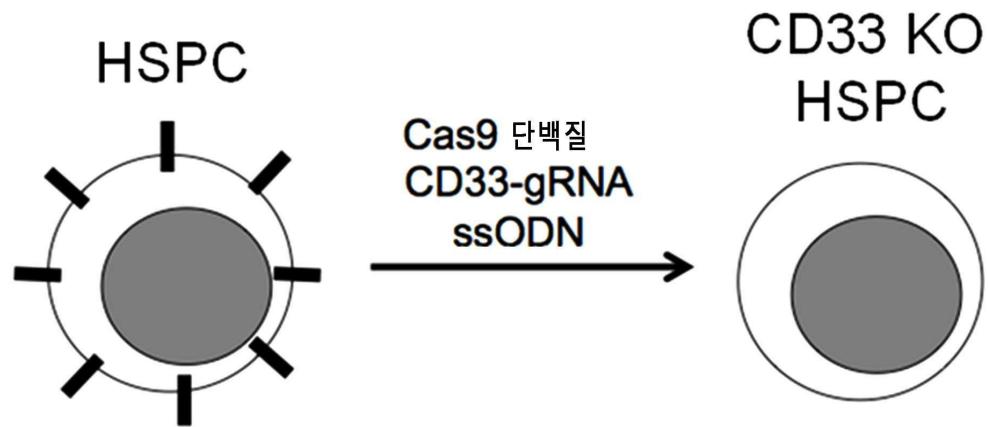
도면7b



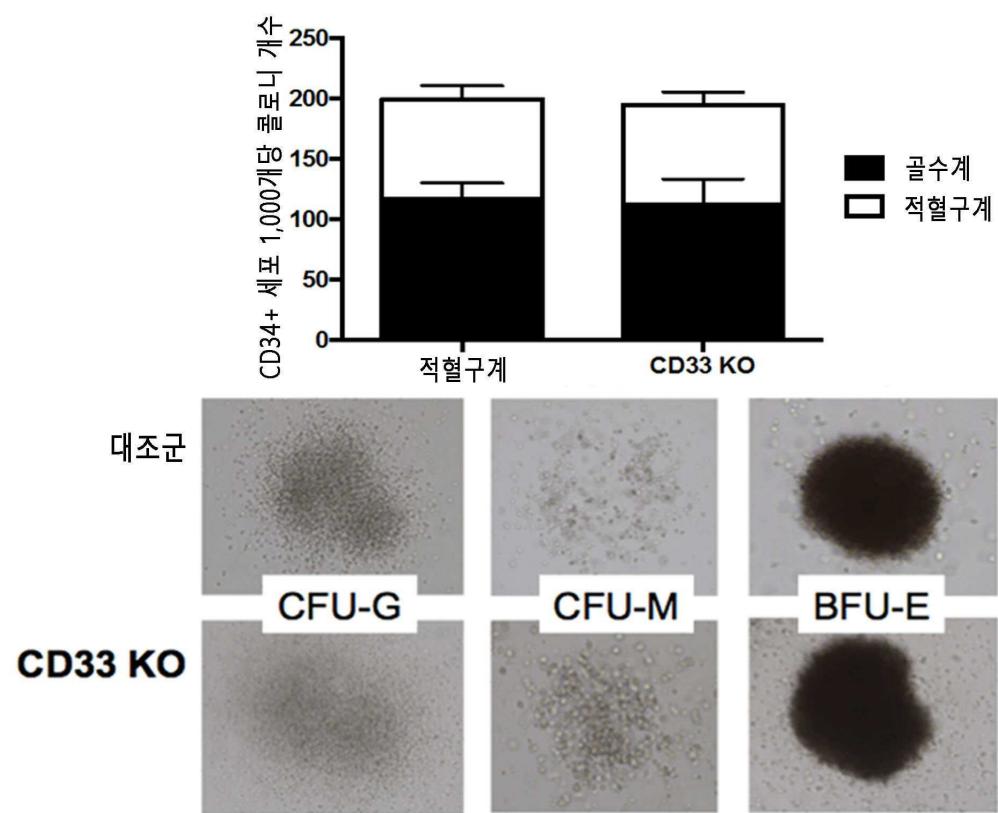
도면8



도면9a

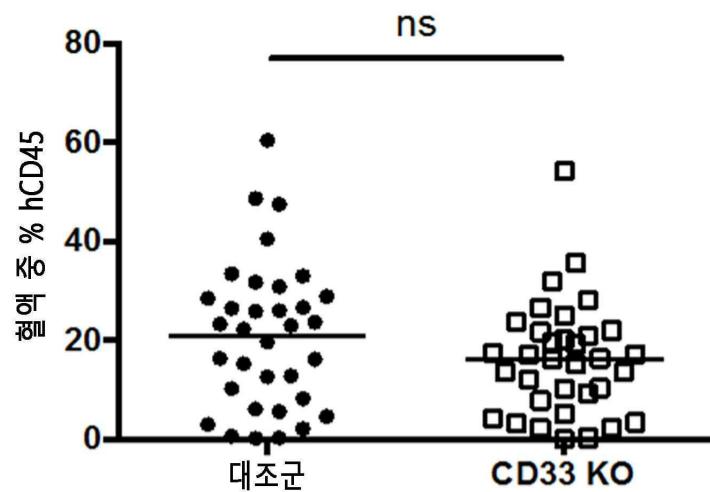


도면9b



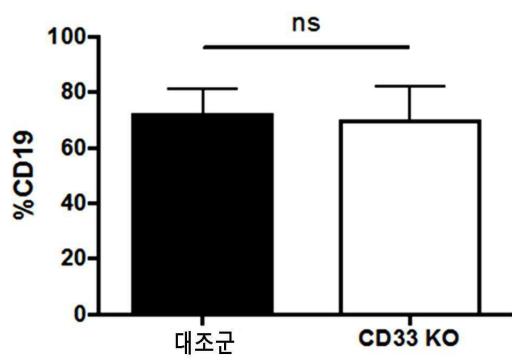
도면9c

## 말초 혈액

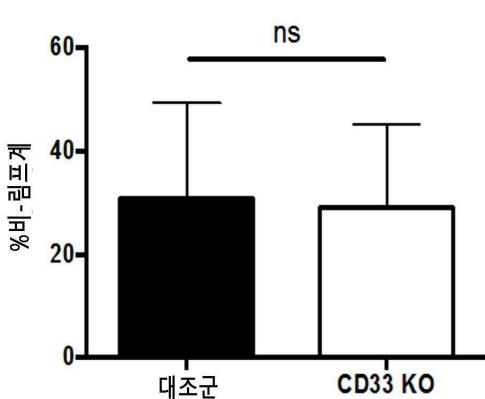


도면9d

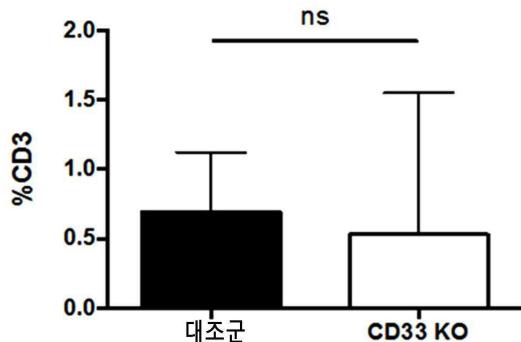
## B 세포



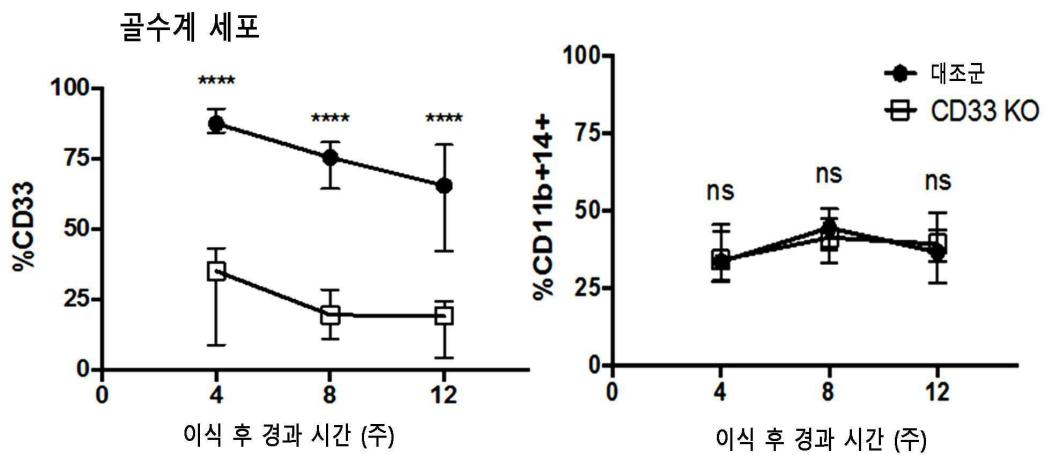
## 비-림프계



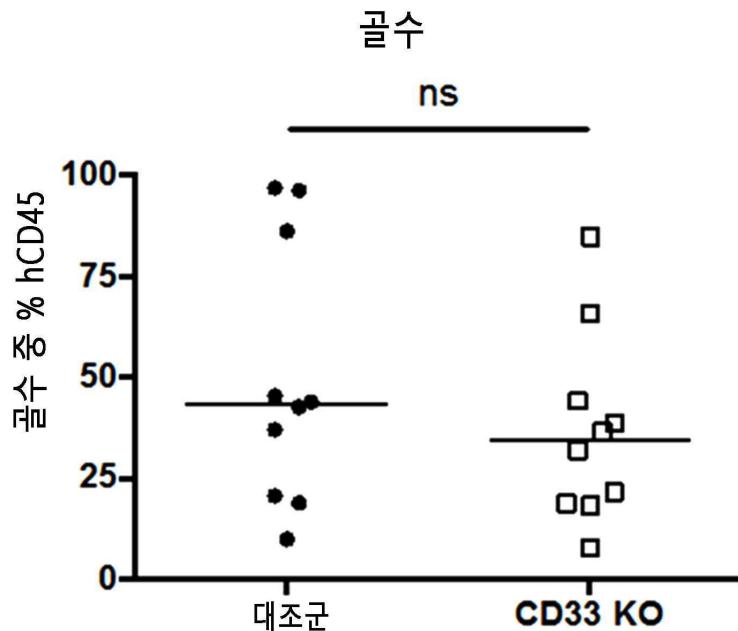
## T 세포



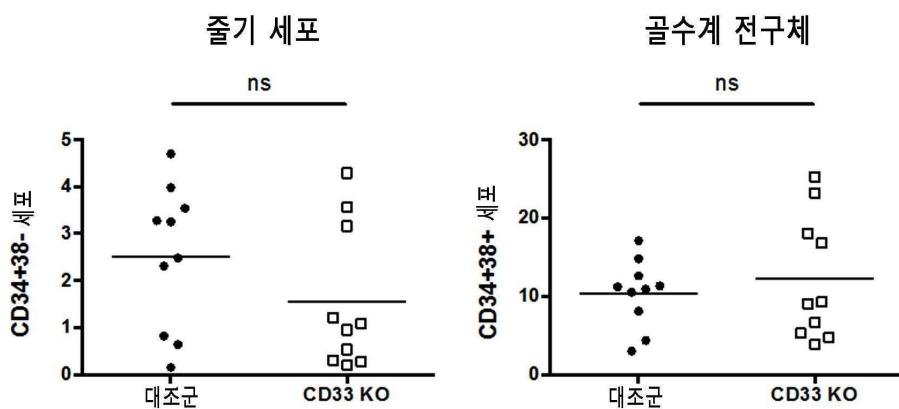
도면9e



도면9f



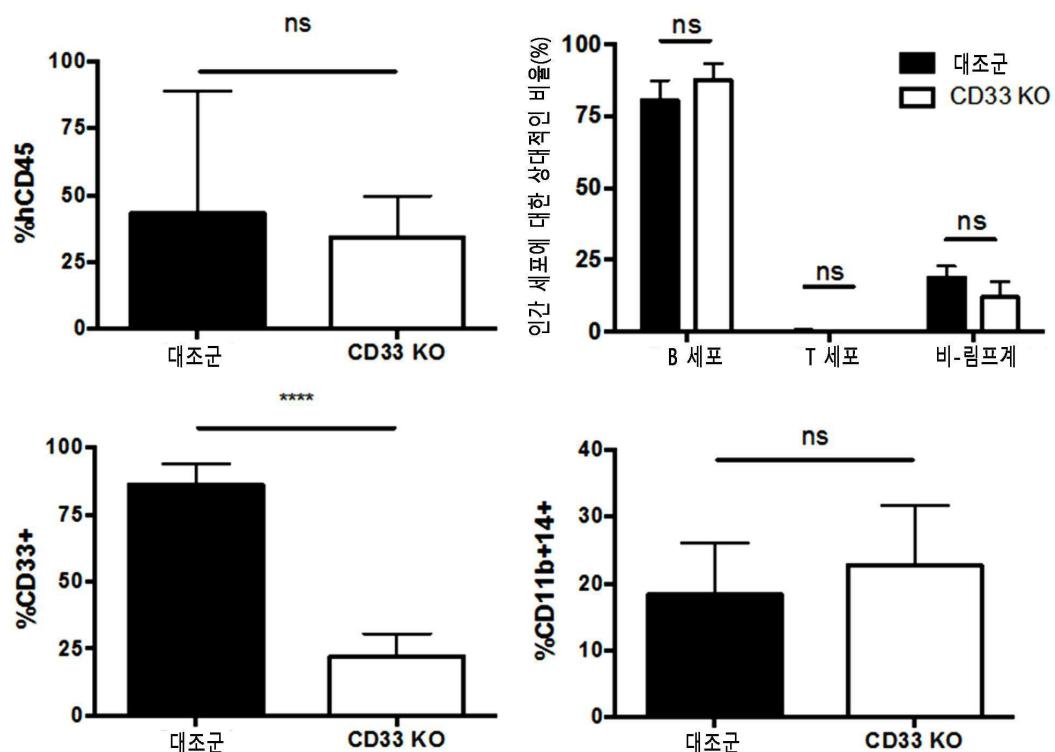
도면9g



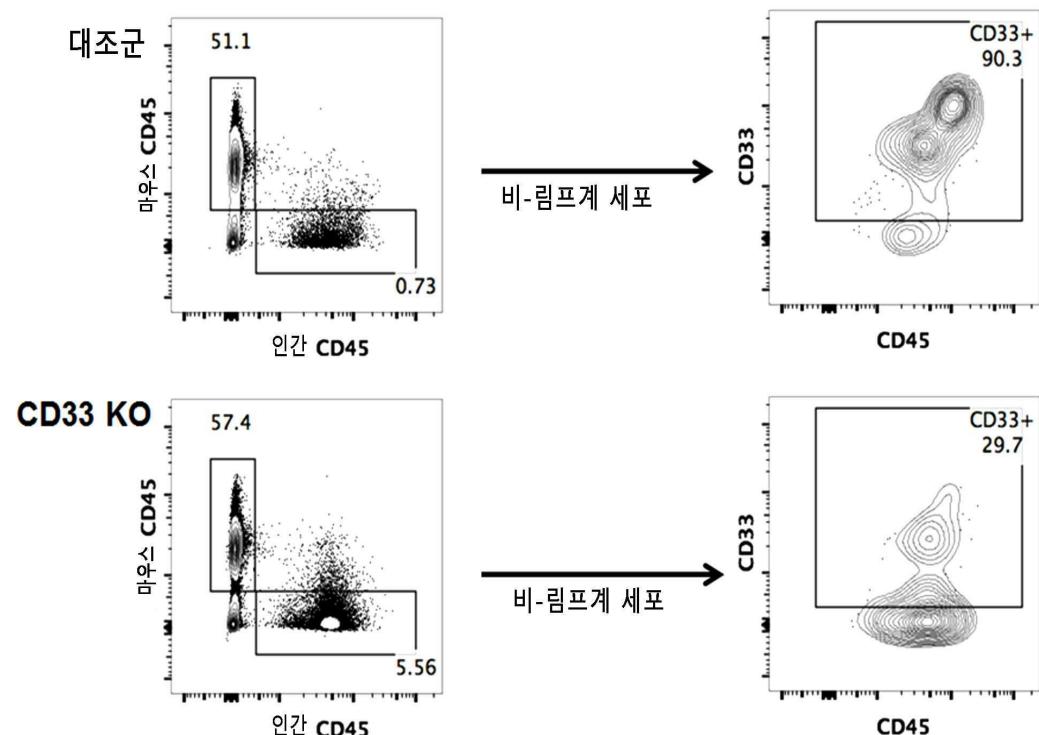
## 도면9h

|      | 1° hCD45% | CD33 KO | 2° hCD45% | CD33 KO |
|------|-----------|---------|-----------|---------|
| EMX  | 49.1      | 0       | 1.45      | 0       |
| EMX  | 20.1      | 0       | 0.04      | 0       |
| CD33 | 35.1      | 61%     | 8.6       | 66%     |
| CD33 | 30.3      | 72%     | 0.10      | 84%     |

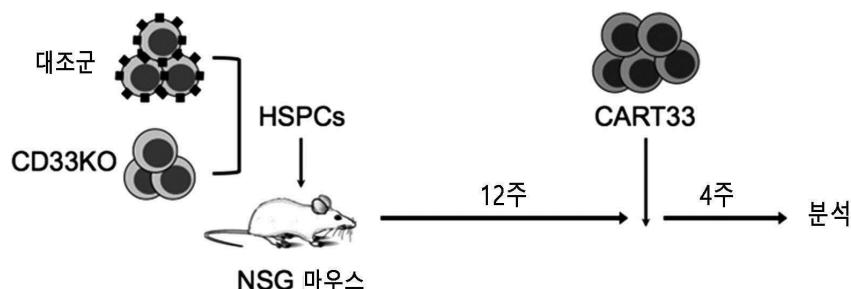
## 도면9i



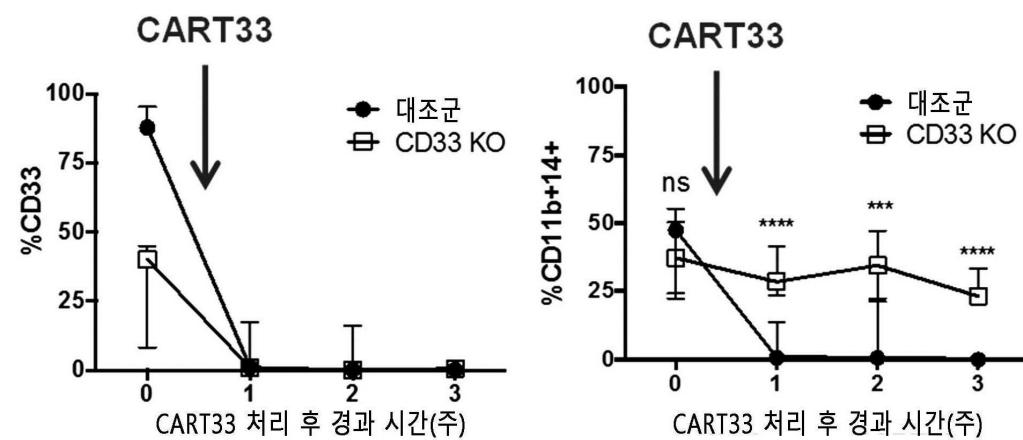
## 도면9j



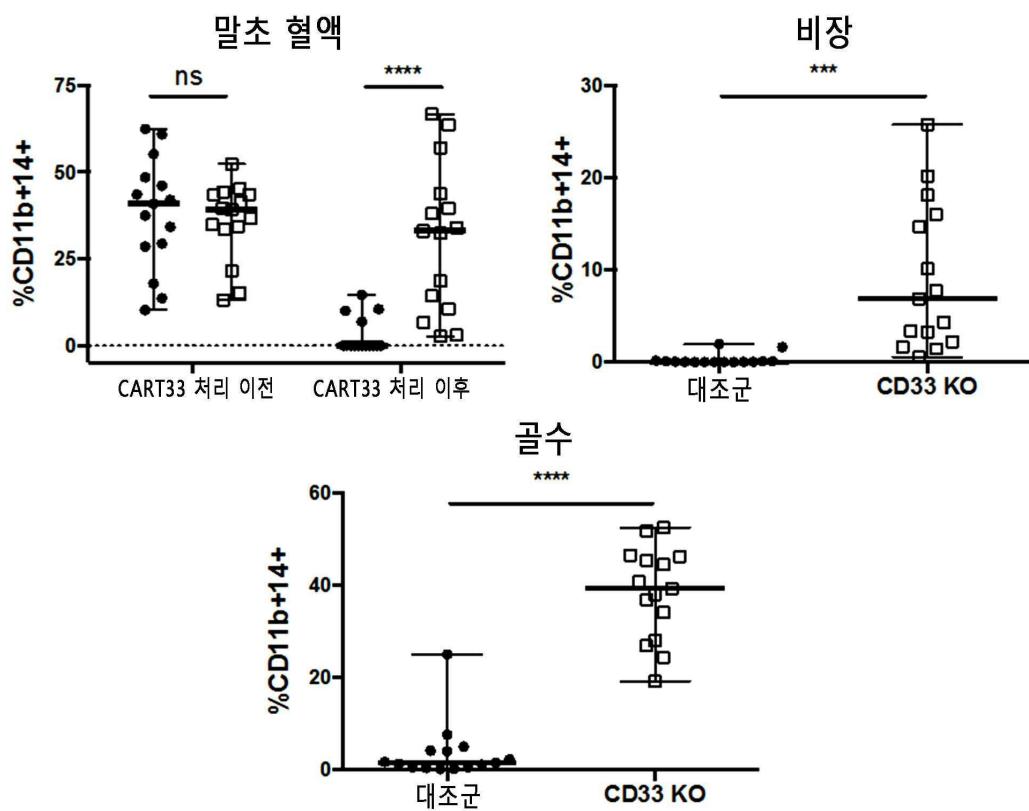
## 도면10a



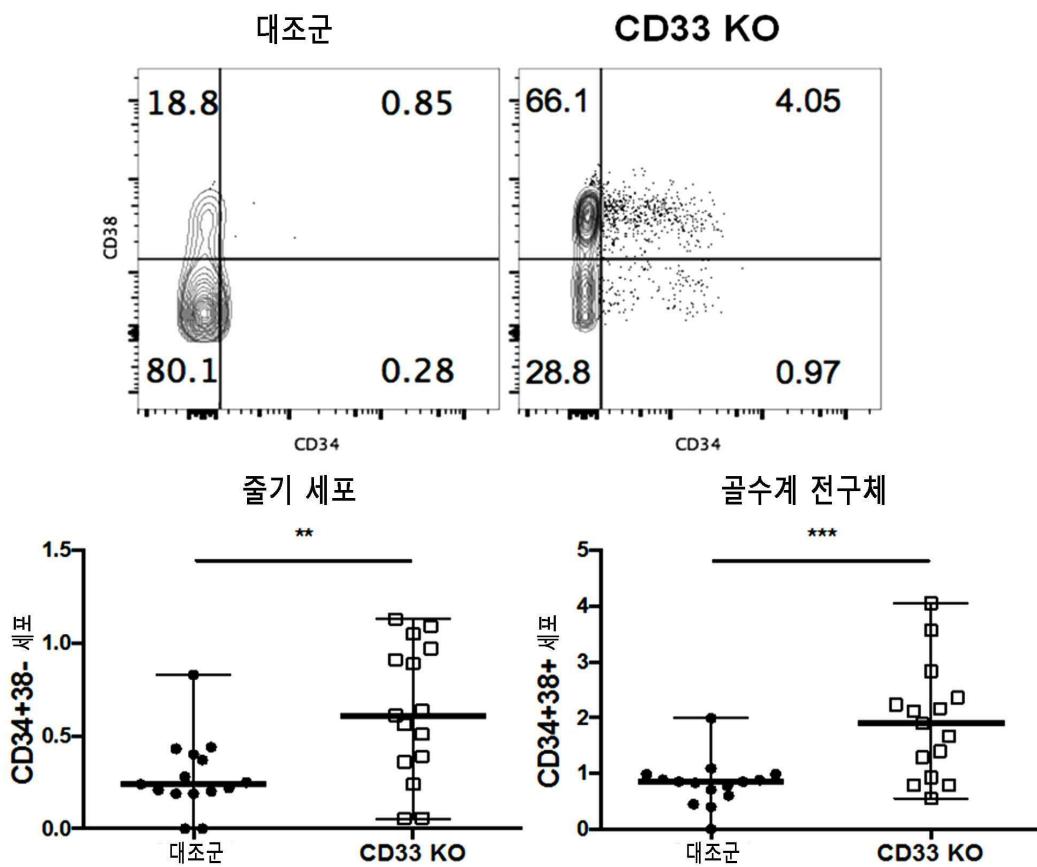
## 도면10b



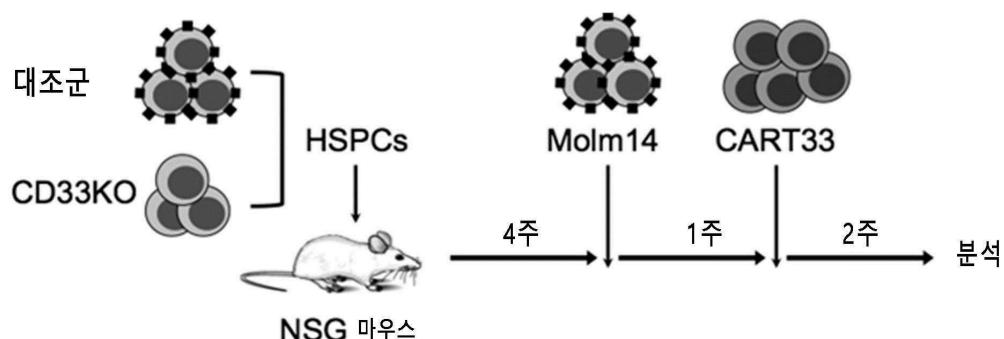
도면10c



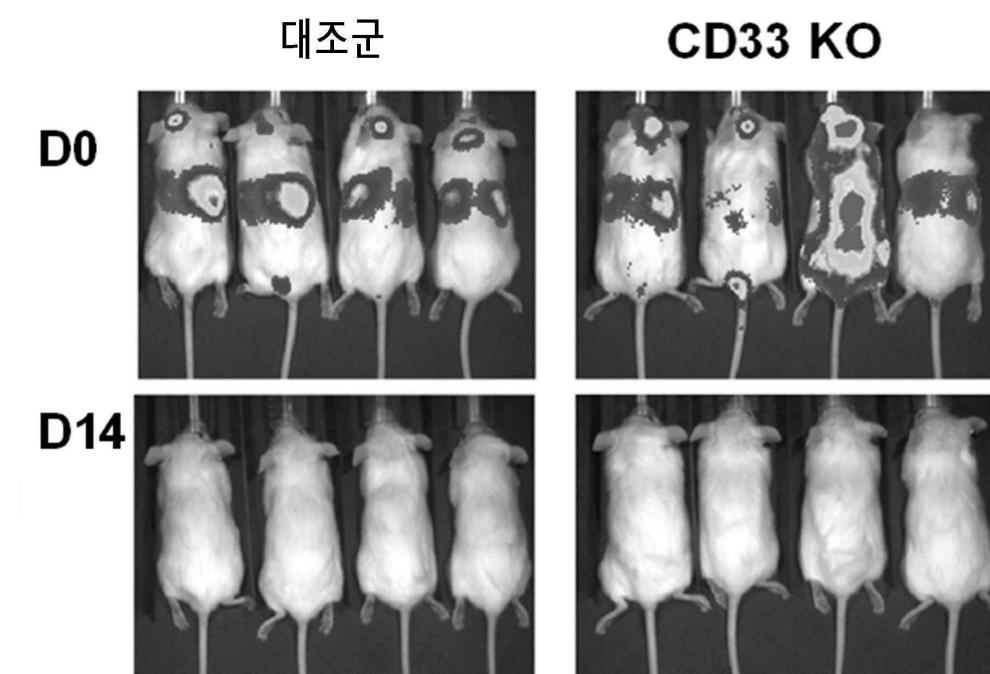
도면10d



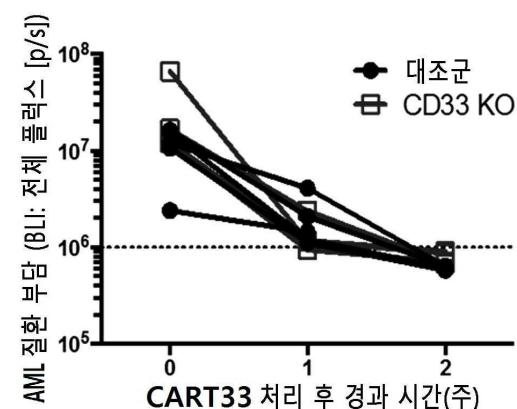
## 도면11a



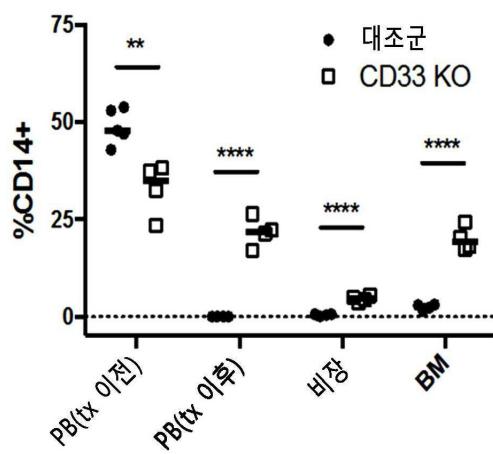
## 도면11b



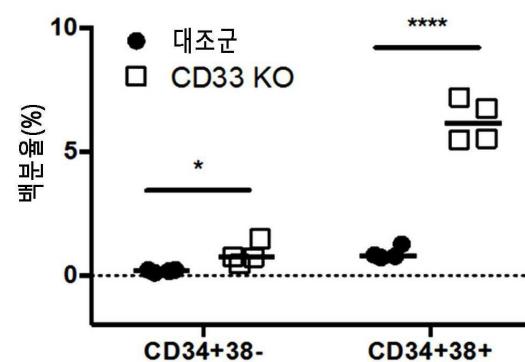
## 도면11c



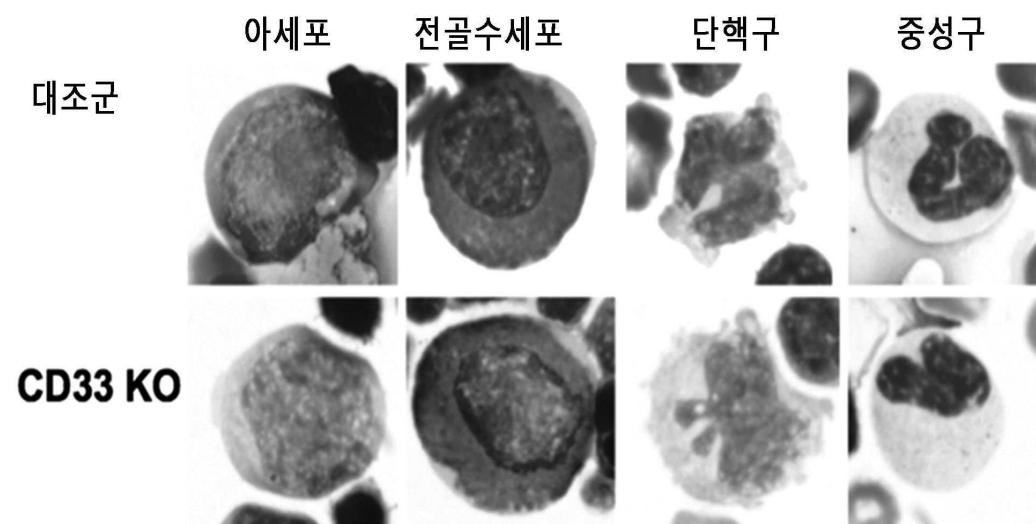
도면11d



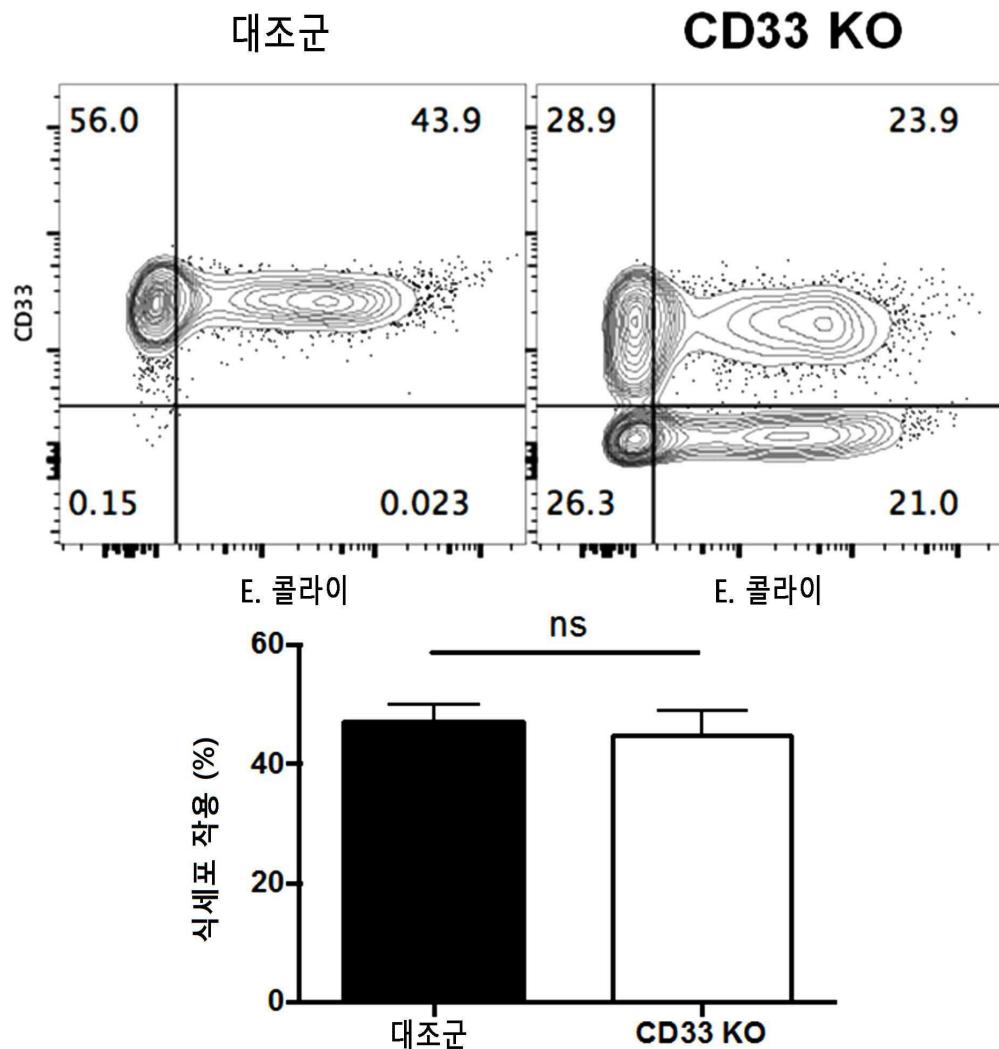
도면11e



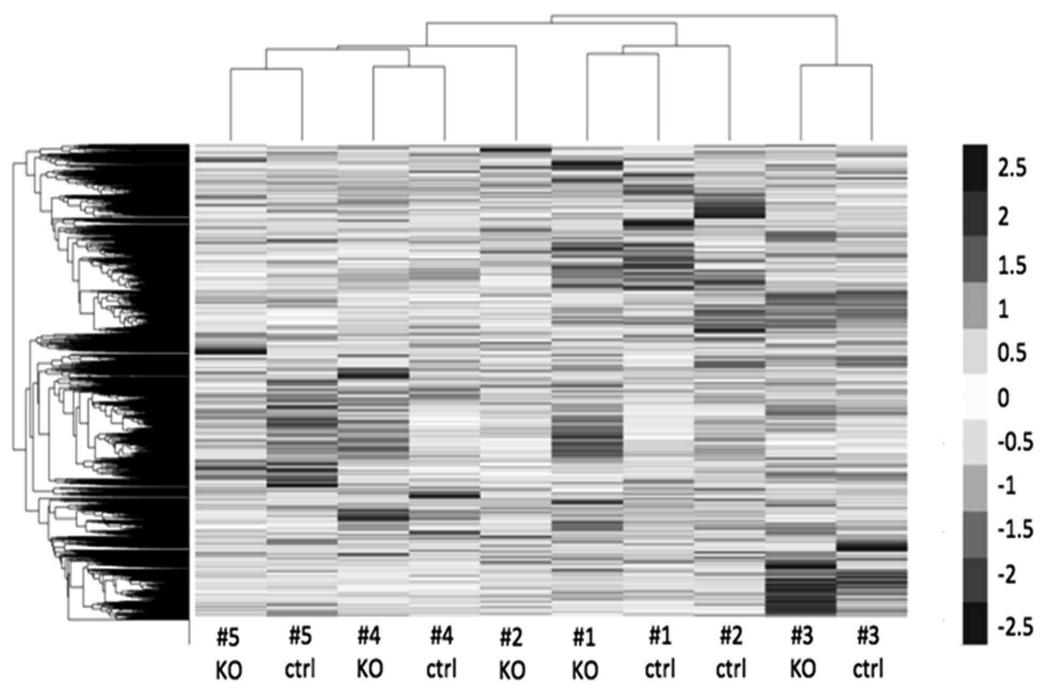
도면12a



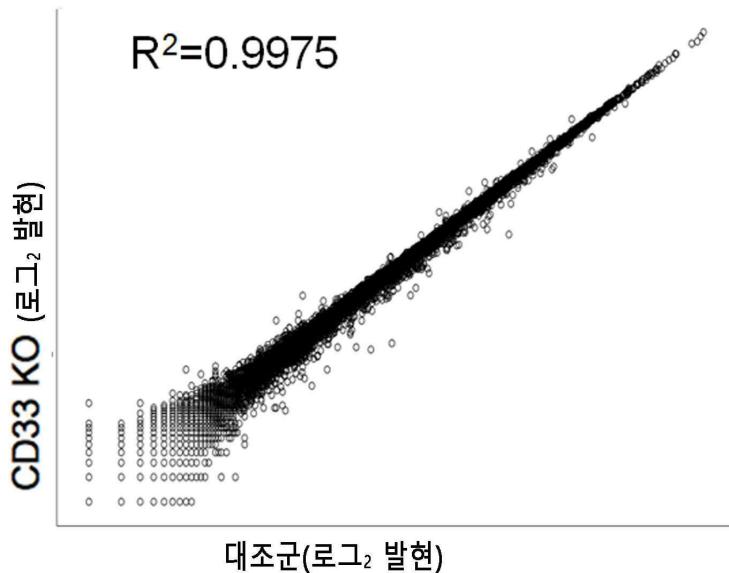
## 도면12b



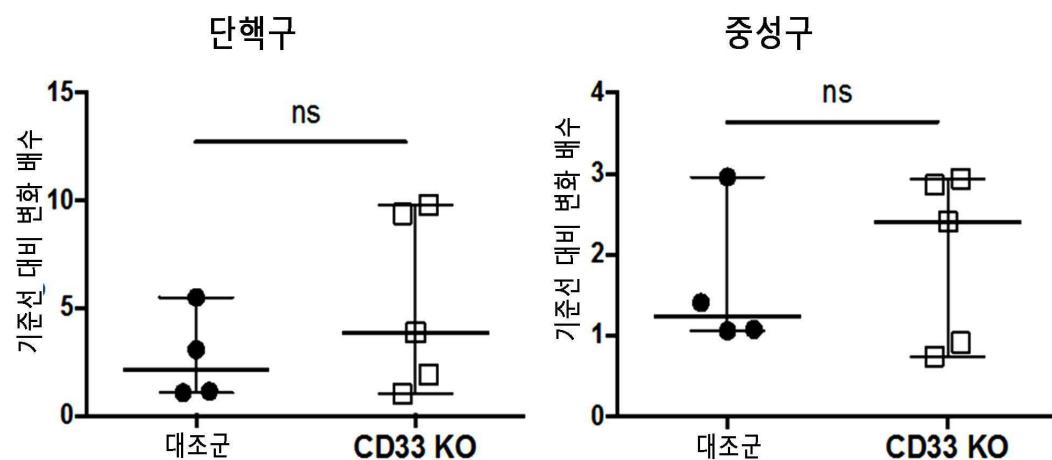
도면12c



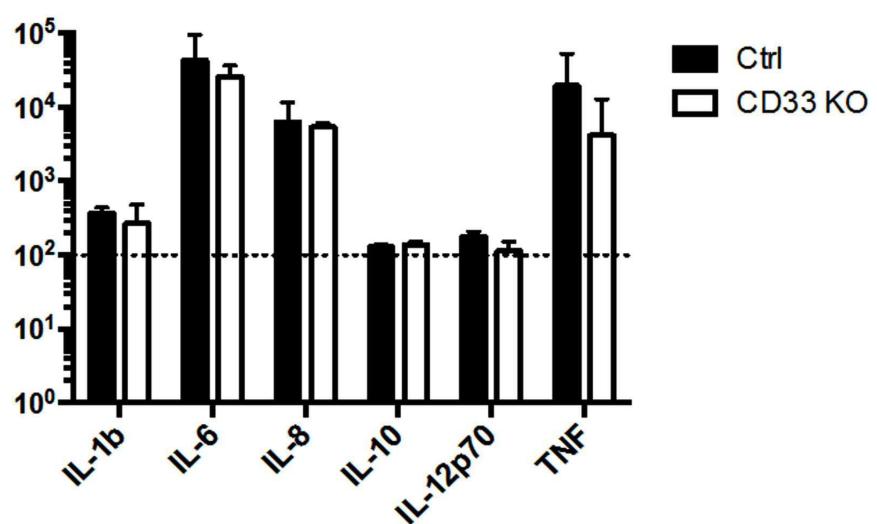
도면12d



도면12e



도면12f

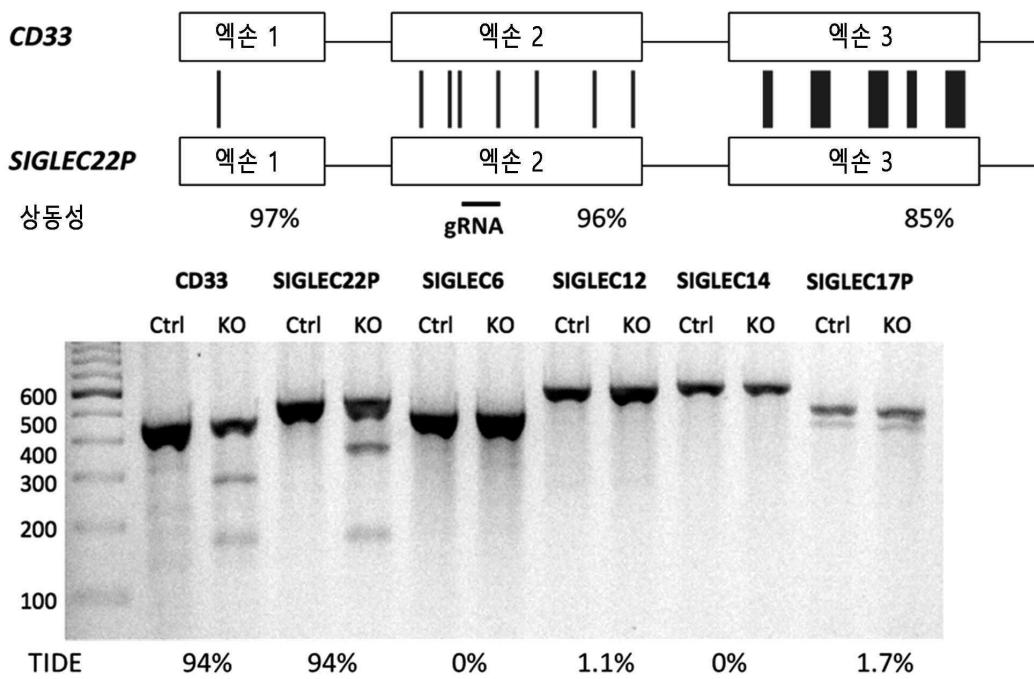


## 도면13a

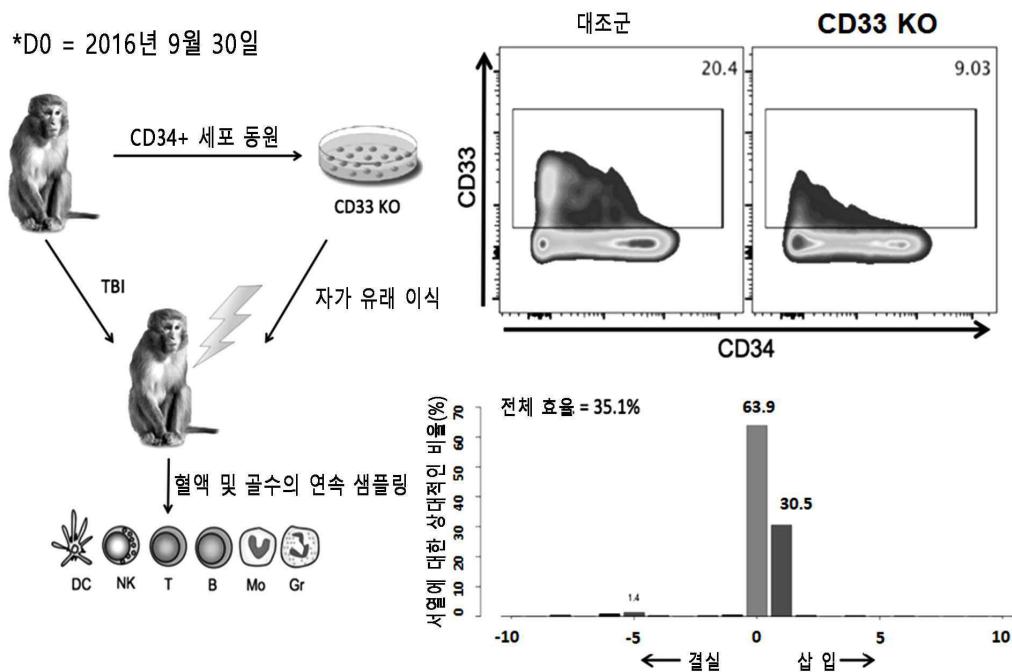
MIT (<http://crispr.mit.edu/>)CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)

|                  | 위치    | #MM | MIT 점수 | CC 상위 순위 | 자리   |
|------------------|-------|-----|--------|----------|------|
| <b>CD33</b>      | chr19 | 0   | 100    | 1        | 엑손   |
| <b>SIGLEC22P</b> | chr19 | 0   | 100    | 2        | 엑손   |
| Chr18            | chr18 | 3   | 1.56   |          | 유전자간 |
| <b>ARHGEF10</b>  |       |     |        |          |      |
| <b>L</b>         | chr1  | 3   | 1.52   | 3        | 인트론  |
| <b>SIGLEC6</b>   | chr19 | 2   | 1.38   | 7        | 엑손   |
| <b>SIGLEC17P</b> | chr19 | 2   | 1.31   | 5        | 엑손   |
| <b>GHDC</b>      | chr17 | 4   | 0.77   |          | 엑손   |
| <b>SIGLEC5</b>   | chr19 | 3   | 0.51   | 8        | 엑손   |
| <b>SIGLEC12</b>  | chr19 | 3   | 0.51   | 10       | 엑손   |
| <b>SIGLEC14</b>  | chr19 | 3   | 0.51   | 9        | 엑손   |
| <b>VMO1</b>      | chr17 | 4   | 0.38   |          | 엑손   |
| Chr2             | chr2  | 3   | 0.29   | 6        | 유전자간 |
| Chr1             | chr1  | 3   | 0      | 4        | 유전자간 |

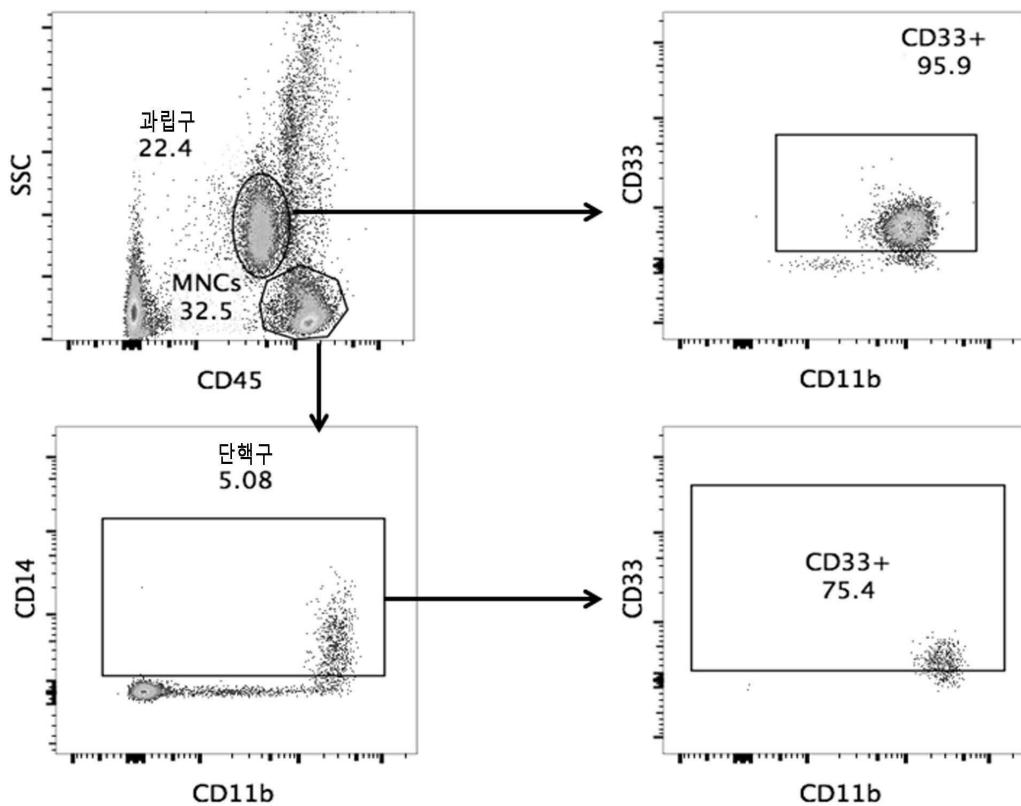
## 도면13b



## 도면14a



## 도면14b



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR GENE EDITING IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS

<130> IPA180534-CN

<150> US 62/250,561

<151> 2015-11-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer (CD33Forward)

<400> 1

agctgcttcc tcagacatgc

20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificially Synthesized Primer (CD33Reverse)

<400> 2

ctgtatttgg tacttcctct ctcca

25