



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0073006
(43) 공개일자 2024년05월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/39 (2015.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0676 (2013.01)
A61K 35/39 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7007975
- (22) 출원일자(국제) 2022년08월11일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/074878
- (87) 국제공개번호 WO 2023/019229
국제공개일자 2023년02월16일
- (30) 우선권주장
63/232,161 2021년08월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
사나 바이오테크놀로지, 인크.
미국 워싱턴 (우편번호 98102) 시애틀 이스트 블레인 스트리트 188 스위트 400
- (72) 발명자
후, 샤오멩
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188 사나 바이오테크놀로지, 인크. 내
슈레퍼, 소나
미국 워싱턴 98102 시애틀 스위트 400 이스트 블레인 스트리트 188 사나 바이오테크놀로지, 인크. 내
- (74) 대리인
박장원

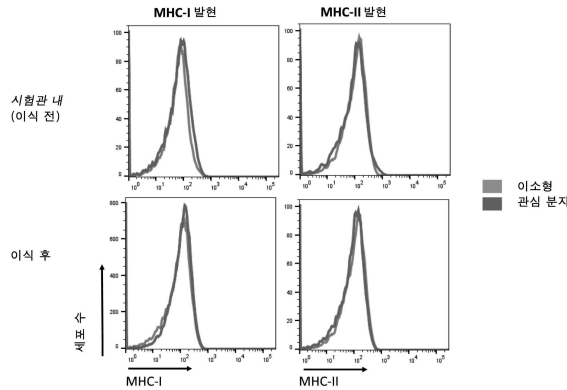
전체 청구항 수 : 총 381 항

(54) 발명의 명칭 동종이계 세포 요법을 위한 유전자 변형된 1차 세포

(57) 요약

동종이계 세포 요법에서 사용하기 위한, 유전자 변형과 같은 하나 이상의 변형을 함유하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 저면역원성 세포이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61P 3/10 (2018.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2527/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

63/297,694	2022년01월07일	미국(US)
63/344,502	2022년05월20일	미국(US)
63/348,990	2022년06월03일	미국(US)
63/353,531	2022년06월17일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

세포 집단의 변형을 촉진하기 위한 움직임의 용도로서, 상기 세포 집단이 움직이게 하기 전에 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키기 위해 하나 이상의 시약과 접촉되었던 것인, 용도.

청구항 2

세포 집단의 변형을 향상시키는 방법으로서,

- i) 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키기 위해 세포 집단을 하나 이상의 시약과 접촉시키는 단계; 및
 - ii) 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포 집단을 움직이게 하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 3

세포 집단을 변형시키는 방법으로서,

- i) 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키는 위해 세포 집단을 하나 이상의 시약과 접촉시키는 단계; 및
 - ii) 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포 집단을 움직이게 하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 1차 세포인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 줄기 세포로부터 유래되는 세포인, 용도 또는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 줄기 세포가 다능성 줄기 세포(PSC), 유도 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 생식계열 줄기 세포, 폐 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 및 다분화성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 줄기 세포가 다능성 줄기 세포인, 용도 또는 방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포가 유도 다능성 줄기 세포, 간엽 줄기 세포(MSC), 조혈 줄기 세포(HSC), 또는 배아 줄기 세포(ESC)인, 용도 또는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 간세포, 신경교 전구 세포, 도파민성 뉴런, 망막 색소 상피 세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경교 전구 세포, 신경 세포, 심장 세포, 및 혈액 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 3D 네트워크에 자연적으로 존재하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 현탁액에 있는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 낮은 부착 표면을 갖는 용기에 있는 것인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 세포를 덮기에 충분한 최소 부피의 배지로 용기에서 유지되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 현탁액 내 세포 집단이 접촉시키는 단계 이전에 부착 배양물 또는 세포 클러스터로부터 세포를 해리시킴으로써 생성되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 섬 세포인, 용도 또는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 베타 섬 세포를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 베타 섬 세포를 포함하는 세포 집단이 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포를 포함하는 세포의 현탁액으로 해리시킴으로써 생성되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 세포를 움직이게 하는 단계 전에 2일 미만 동안 수행되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 세포를 움직이게 하는 단계 전에 30초 내지 24시간 동안 수행되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 세포를 움직이게 하는 단계 전에 1분 내지 60분, 2분 내지 30분, 5분 내지 15분 동안 수행되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단을 움직이게 하는 단계는 세포 응집체의 형성을 촉진하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단을 움직이게 하는 단계는 세포 클러스터를 형성하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 움직이게 하는 단계 후에 정적 조건 하에 세포를 인큐베이

선하는 것을 추가로 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 접촉시키는 단계 후 및 세포를 움직이게 하는 단계 전에 정적 조건 하에 세포를 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이 적어도 2개의 상이한 시약을 포함하되, 임의적으로 상기 적어도 2개의 상이한 시약 각각이 상이한 유전자의 발현을 조절하기 위한 것인, 용도 또는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법의 단계가 반복되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 방법의 첫번째 반복에서 하나 이상의 시약이 방법의 반복된 반복(repeated iteration)에서 하나 이상의 시약과 상이하되, 임의적으로 상기 방법의 첫번째 반복에서 하나 이상의 시약이 방법의 반복된 반복에서 하나 이상의 시약과 상이한 것인, 용도 또는 방법.

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포를 움직이게 하는 단계 전에, 임의적으로 접촉시키기 전의 세포에 비해 변형된 유전자 발현을 갖는 세포를 선택하는 것을 추가로 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 29

1차 섬 세포를 변형시키는 방법으로서,

i) 1차 섬 클러스터를 1차 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계;

ii) 1차 섬 세포의 현탁액을 하나 이상의 시약과 접촉시켜 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및

iii) 상기 접촉시킨 후에 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 섬 세포를 인큐베이션하되, 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 30

제17항 또는 제29항에 있어서, 상기 1차 섬 클러스터가 인간 1차 사체(cadaveric) 섬 클러스터인, 용도 또는 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 인큐베이션이 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함하는 것인, 방법

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인큐베이션이 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션 하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 33

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인큐베이션이 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.

청구항 34

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 i)-iii)을 반복하는 것인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 방법의 첫번째 반복에서 하나 이상의 시약이 방법의 반복된 반복에서 하나 이상의 시약과 상이한 것인, 방법.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이 하나 이상의 첫번째 시약이고 재클러스터링된 섬 세포가 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터이며 상기 방법이

- iv) 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계;
- v) 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 하나 이상의 추가의 시약과 추가로 접촉시켜 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및
- vi) 두번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 추가 접촉시킨 후 추가로 변형된 1차 섬 세포를 인큐베이션하되, 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 37

제29항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 iii)에서의 인큐베이션 전에, 방법이 임의적으로 접촉시키기 전에 1차 섬 세포에 비해 변형된 유전자 발현을 갖는 섬 세포를 선택하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 v) 이전에, 방법이 iv)에서의 해리된 섬 세포로부터 임의적으로 접촉시키기 전에 1차 섬 세포에 비해 변형된, 변형된 유전자 발현을 갖는 섬 세포를 선택하고, 임의적으로 선택된 섬 세포에 대해 단계 iii) 및 iv)를 반복하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 vi)에서의 인큐베이션 후에, 방법이 두번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 섬 세포를 포함하는 현탁액으로 해리시키고 변형된 유전자 발현, 임의적으로 접촉 또는 추가 접촉 전에 1차 섬 세포에 비해 변형된 유전자 발현을 갖는 섬 세포를 선택하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 40

제28항, 제38항 및 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 선택된 변형된 섬 세포를 인큐베이션하는 것을 포함하되, 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 방법.

청구항 41

제29항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1차 섬 세포의 현탁액이 낮은 부착 표면을 갖는 용기에 존재하는 것인, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 용기가 세포를 덮기에 충분한 최소 부피의 배지를 갖는 것인, 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 약 20 rpm 내지 약 180 rpm, 약 40 rpm 내지 약 125 rpm 또는 약 60 rpm 내지 약 100 rpm (각각 경계값 포함)의 속도인, 용도 또는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 약 85 rpm 내지 약 95 rpm (경계값 포함)의 속도인, 용도 또는 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 진탕인, 용도 또는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 진탕이 궤도 움직임을 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 파동(undulating) 움직임인, 용도 또는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 파동 움직임이 궤도 이동 및 진동 이동을 조합하는 진탕기 장치를 사용하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 양방향 선형 이동을 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 궤도 진탕기를 사용하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 움직임이 경사각으로 이루어지되, 임의적으로 상기 경사각이 1° 내지 8° 인, 용도 또는 방법.

청구항 52

제28항 및 제38항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 선택이 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키거나 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 54

제36항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첫번째 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 것이고 추가의 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 것인, 용도 또는 방법

청구항 55

제36항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첫번째 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 것이고 추가의 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 것인, 용도 또는 방법.

청구항 56

제36항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첫번째 하나 이상의 시약이 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 것이고 추가의 하나 이상의 시약이 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 것인, 용도 또는 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이 내인성 단백질을 암호화하는 표적 유전자를 유전자 편집하기 위한 게놈-변형 단백질 및/또는 외인성 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 58

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 시약이 게놈-변형 단백질을 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질이 서열-특이적 뉴클레아제, CRISPR-연관 트랜스포사제 (CAST), 프라임 편집, 또는 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램화가능 추가(PASTE)에 의한 유전자 편집과 연관되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질이 서열 특이적 뉴클레아제인, 용도 또는 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 서열 특이적 뉴클레아제가 RNA-가이드 DNA 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 서열 특이적 뉴클레아제가 RNA-가이드 뉴클레아제인, 용도 또는 방법.

청구항 63

제61항 또는 제62항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제가 Cas 뉴클레아제 및 가이드 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 뉴클레아제를 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 용도 또는 방법.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제가 유형 II 또는 유형 V Cas 단백질인, 용도 또는 방법.

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질이 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 및 CRISPR-연관 트랜스포사제, 또는 임의의 전술한 것의 동족체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 67

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas가 Cas9 또는 Cas12인, 용도 또는 방법.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고/시키거나 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 것인, 용도 또는 방법.

청구항 69

제36항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 첫번째 시약이 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고/시키거나 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 것인, 용도 또는 방법.

청구항 70

제68항 및 제69항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자가 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질인, 용도 또는 방법.

청구항 71

제68항 또는 제69항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자가 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질인, 용도 또는 방법.

청구항 72

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 시약 또는 추가의 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 및/또는 NFY-C 중 하나 이상의 발현을 감소시키는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 73

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,

- a. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 시약 또는 추가의 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 B-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키고/시키거나;
- b. 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 시약 또는 추가의 하나 이상의 시약 중 적어도 하나가 CIITA의 발현을 감소시킴으로써 이루어지는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 74

제53항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 하나 이상의 시약이 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 프로모터가 구성적 프로모터인, 용도 또는 방법.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 상기 프로모터가 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 폴로니 바이러스의 프로모터,

엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 및 UBC 프로모터로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 78

제74항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 외인성 단백질이 하나 이상의 관용원성 인자인, 용도 또는 방법.

청구항 79

제53항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 제제를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 80

제54항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가의 시약이 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 제제를 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 81

제74항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제가 지질 입자 또는 바이러스 벡터이되, 임의적으로 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터인, 용도 또는 방법.

청구항 82

제78항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, ID01, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 또는 Serpinb9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 83

제78항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 a) CD47; b) HLA-E; c) CD24; d) PD-L1; e) CD46; f) CD55; f) CD59; h) CR1; i) MANF; j) A20/TNFAIP3; k) HLA-E 및 CD47; l) CD24, CD47, PD-L1, 및 이의 임의의 조합; m) HLA-E, CD24, CD47, 및 PD-L1, 및 이의 임의의 조합; n) CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; o) HLA-E, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; p) HLA-E, CD24, CD47, PDL1, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; q) HLA-E 및 PDL1; r) HLA-E, PDL1, 및 A20/TNFAIP, 및 이의 임의의 조합; s)HLA-E, PDL1, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; t) HLA-E, PDL1, A20/TNFAIP, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; 및 u) CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 84

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 시약이

(i)

(a) MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; (b) MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; (c) CD47, 및 임의적으로 CD24 및 PD-L1의 발현을 증가시키고; 및 (d) CD46, CD55, CD59 및 CR1의 발현을 증가시키는 것이거나;

(ii)

(a) MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고; (b) MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; (c) TXNIP의 발현을 감소시키고; (d) PD-L1 및 HLA-E의 발현을 증가시키고; (e) 임의적으로 A20/TNFAIP3 및 MANF의 발현을 증가시키는 것이거나;

(iii)

(a) CCL21, PD-L1, FASL, SERPINB9, HLA-G, CD47, CD200, 및 MFGE8의 발현을 증가시키고; (b) MICA 및/ 또는 MICB의 발현을 감소시키는 것이거나;

(iv)

(a) MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; (b) CD47의 발현을 증가시키는 것이거나;

(v) 하나 이상의 추가적인 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시키며, 임의적으로 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, 산화성 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y 및/또는 RHD의 발현을 감소시키는 것을 추가로 포함하는 상기 (i)-(iv) 중 임의의 것이되, 추가로 임의적으로 산화성 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질은 티오레독신-상호작용 단백질 (TXNIP), PKR-유사 ER 키나제(PERK), 이노시톨-요구 효소 1 α (IRE1 α), 및 DJ-1(PARK7)을 포함하는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 85

제74항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 세포의 게놈 내로 통합되는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 멀티시스트로닉 벡터인, 용도 또는 방법.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서, 상기 통합이 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입시킴으로써 이루어지는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 88

제85항 또는 제86항에 있어서, 상기 통합이 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지는 것인, 용도 또는 방법.

청구항 89

제9항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 섬 세포가 베타 섬 세포인, 용도 또는 방법.

청구항 90

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법에 의해 생성된 세포의 생존력이 약 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 그 초과보다 더 큰 것인, 용도 또는 방법.

청구항 91

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법에 의해 변형된 집단의 세포 백분율이 약 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 그 초과보다 더 큰 것인, 용도 또는 방법.

청구항 92

(i) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포로서, 상기 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현이 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적인 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 (ii)에서의 변형 중 하나 이상이 다음의 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포:

a. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자;

- b. 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자; 또는
- c. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 및/또는 NFY-C 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 분자의 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 95

제92항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 분자를 발현하지 않는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 96

제92항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 또는 Serpinb9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 97

제92항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 a) CD47; b) HLA-E; c) CD24; d) PD-L1; e) CD46; f) CD55; f) CD59; h) CR1; i) MANF; j) A20/TNFAIP3; k) HLA-E 및 CD47; l) CD24, CD47, PD-L1, 및 이의 임의의 조합; m) HLA-E, CD24, CD47, 및 PD-L1, 및 이의 임의의 조합; n) CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; o) HLA-E, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; p) HLA-E, CD24, CD47, PDL1, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; q) HLA-E 및 PDL1; r) HLA-E, PDL1, 및 A20/TNFAIP, 및 이의 임의의 조합; s)HLA-E, PDL1, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; t) HLA-E, PDL1, A20/TNFAIP, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; 및 u) CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 98

제92항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가

- (i)
 - (a) MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; (b) MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; (c) CD47, 및 임의적으로 CD24 및 PD-L1의 발현을 증가시키고; (d) CD46, CD55, CD59 및 CR1의 발현을 증가시키거나;
- (ii)
 - (a) MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고; (b) MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; (c) TXNIP의 발현을 감소시키고; (d) PD-L1 및 HLA-E의 발현을 증가시키고; (e) 임의적으로 A20/TNFAIP3 및 MANF의 발현을 증가시키거나;
- (iii)
 - (a) CCL21, PD-L1, FASL, SERPINB9, HLA-G, CD47, CD200, 및 MFGE8의 발현을 증가시키고; (b) MICA 및/ 또는 MICB의 발현을 감소시키거나;
- (iv)
 - (a) MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; (b) CD47의 발현을 증가시키거나;
- (v) 하나 이상의 추가적인 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시키며, 임의적으로 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA,

HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, 산화성 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y 및/또는 RHD의 발현을 감소시키기 위한 변형을 추가로 포함하는 상기 (i)-(iv) 중 임의의 것에 따른 변형을 포함하되, 추가로 임의적으로 상기 산화성 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질은 티오레독신-상호작용 단백질(TXNIP), PKR-유사 ER 키나제(PERK), 이노시톨-요구 효소 1 α (IRE1 α), 및 DJ-1(PARK7)을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 99

(i) CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포로서, 상기 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현이 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적인 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 100

제92항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 발현을 증가시키는 변형(들)이 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형이 감소된 표면 발현을 포함하되, 임의적으로 검출가능한 표면 발현이 없는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 101

제92항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형이 하나 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 102

제92항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 103

제101항 또는 제102항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47이고 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 암호화하고, 조작된 1차 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 104

제103항에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2에 제시된 서열을 암호화하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 105

제101항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 프로모터가 구성적 프로모터인, 조작된 1차 세포.

청구항 107

제105항 또는 제106항에 있어서, 상기 프로모터가 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1 α 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 및 UBC 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포..

청구항 108

제101항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 조작된 1차 세포의 계놈 내로 통합되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 109

제108항에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 하나 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 멀티시스트로닉 벡터 및 제2 이식유전자를 암호화하는 추가의 이식유전자인, 조작된 1차 세포.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, 상기 통합이 조작된 1차 세포의 계놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입시킴으로써 이루어지는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 111

제108항 또는 제109항에 있어서, 상기 통합이 세포의 표적 계놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 표적 계놈 유전자좌가 *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *MICA* 유전자좌, *MICB* 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌, 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌인, 조작된 1차 세포.

청구항 113

제111항에 있어서, 상기 표적 계놈 유전자좌가 *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 유전자좌, *SHS231* 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, *ROSA26* 유전자 유전자좌, *ABO* 유전자 유전자좌, *F3* 유전자 유전자좌, *FUT1* 유전자 유전자좌, *HMGB1* 유전자 유전자좌, *KDM5D* 유전자 유전자좌, *LRP1* 유전자 유전자좌, *RHD* 유전자 유전자좌, *ROSA26* 유전자 유전자좌, 및 *SHS231* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 114

제92항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 115

제92항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키는 변형인, 조작된 1차 세포.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 mRNA 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 117

제115항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 118

제115항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 *B2M* 유전자 활성을 제거하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 119

제115항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 120

제115항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 세포에서 모든 *B2M* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 121

제119항 또는 제120항에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 *B2M* 유전자에 indel을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 122

제115항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 *B2M* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 조작된 1차 세포.

청구항 123

제115항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 *B2M* 유전자가 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 124

제114항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질의 발현을 감소시키는 변형이되, 임의적으로 상기 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자는 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 125

제92항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 126

제92항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 발현을 감소시키는 변형인, 조작된 1차 세포.

청구항 127

제126항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 감소된 mRNA 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 128

제126항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 129

제126항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 *CIITA* 유전자 활성을 제거하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 130

제126항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 131

제126항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 세포에서 모든 *CIITA* 코딩 서열의 불활성화 또는

과피를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 132

제130항 또는 제131항에 있어서, 상기 불활성화 또는 과피가 *CIITA* 유전자에 indel을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포

청구항 133

제126항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 indel이 *CIITA* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 조작된 1차 세포.

청구항 134

제125항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키는 변형이되, 임의적으로 상기 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자는 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 135

제92항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 게놈-변형 단백질에 의해 이루어지는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질이 서열-특이적 뉴클레아제, CRISPR-연관 트랜스포사제(CAST), 프라임 편집, 또는 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램화가능 추가(PASTE)에 의한 유전자 편집과 연관되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 137

제135항 또는 제136항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질에 의한 변형이 뉴클레아제-매개 유전자 편집인, 조작된 1차 세포.

청구항 138

제137항에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *B2M* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지되, 임의적으로 상기 Cas는 Cas9인, 조작된 1차 세포.

청구항 139

제137항 또는 제138항에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 내인성 유전자의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 조작된 1차 세포.

청구항 141

제92항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포 또는 동물 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 142

제141항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 143

제92항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1차 세포가 혈액에 노출되는 세포 유형인, 조작된 1차 세포.

청구항 144

제92항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 공여자 대상체로부터 단리된 1차 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 공여자 대상체가 건강하거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 취득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 146

제92항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 대식세포 세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 뉴런, 망막 색소 상피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경교 전구 세포, 신경 세포, 심장 세포, 및 혈액 세포로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 147

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 내피 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 148

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 상피 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 149

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 망막 색소 상피 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 150

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 T 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 151

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 NK 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 152

제150항 또는 제151항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 153

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포, 임의적으로 베타 섬 세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 154

제92항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 간세포인, 조작된 1차 세포.

청구항 155

제92항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 ABO 혈액형 0형인, 조작된 1차 세포.

청구항 156

제92항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 레서스 인자 음성(Rh-)인, 조작된 1차 세포.

청구항 157

제92항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 제1항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법에 의해 만들어지는 것인, 조작된 1차 세포.

청구항 158

조작된 1차 세포를 생성하는 방법으로서,

- a) 1차 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 단계; 및,
- b) 1차 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 159

제158항에 있어서, 상기 a)의 증가된 발현 및 b)의 감소된 발현이 방법을 거치지 않은 동일한 세포 유형의 세포에 상대적인 것인, 방법.

청구항 160

제158항 또는 제159항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 분자의 발현을 감소시키는 것이 다음으로부터 선택되는 것인, 방법:

- a. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자;
- b. 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자; 또는
- c. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자.

청구항 161

제158항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 것이 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입함으로써 이루어지되, 임의적으로 상기 하나 이상의 변형은 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 및/또는 NFY-C 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 분자의 발현을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 162

제158항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 또는 Serpinb9, 및 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 163

제158항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 a) CD47; b) HLA-E; c) CD24; d) PD-L1; e) CD46; f) CD55; f) CD59; h) CR1; i) MANF; j) A20/TNFAIP3; k) HLA-E 및 CD47; l) CD24, CD47, PD-L1, 및 이의 임의의 조합; m) HLA-E, CD24, CD47, 및 PD-L1, 및 이의 임의의 조합; n) CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; o) HLA-E, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; p) HLA-E, CD24, CD47, PDL1, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; q) HLA-E 및 PDL1; r) HLA-E, PDL1, 및 A20/TNFAIP, 및 이의 임의의 조합; s)HLA-E, PDL1, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; t) HLA-E, PDL1, A20/TNFAIP, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; 및 u) CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9,

CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 164

제158항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형이 세포 내로 도입되고, 하나 이상의 변형이

(i)

(a) MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; (b) MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; (c) CD47, 및 임의적으로 CD24 및 PD-L1의 발현을 증가시키고; (d) CD46, CD55, CD59 및 CR1의 발현을 증가시키거나;

(ii)

(a) MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고; (b) MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; (c) TXNIP의 발현을 감소시키고; (d) PD-L1 및 HLA-E의 발현을 증가시키고; (e) 임의적으로 A20/TNFAIP3 및 MANF의 발현을 증가시키거나;

(iii)

(a) CCL21, PD-L1, FASL, SERPINB9, HLA-G, CD47, CD200, 및 MFGE8의 발현을 증가시키고; (b) MICA 및/ 또는 MICB의 발현을 감소시키거나;

(iv)

(a) MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; (b) CD47의 발현을 증가시키거나;

(v) 하나 이상의 추가 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시키며, 임의적으로 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B, 산화성 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y 및/또는 RHD의 발현을 감소시키는 것을 추가로 포함하는 상기 (i)-(iv) 중 임의의 것에 따르되, 추가로 임의적으로 상기 산화성 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질은 티오레독신-상호작용 단백질(TXNIP), PKR-유사 ER 키나제(PERK), 이노시톨-요구 효소 1a (IRE1a), 및 DJ-1(PARK7)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 165

조작된 1차 세포를 생성하는 방법으로서,

- a. 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계; 및,
- b. 세포 내 CD47의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 166

제157항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 167

제157항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 168

제157항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현을 증가시키는 것이 하나 이상의 관용원성 인자의 표면 발현을 증가시키는 것을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 것이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 표면 발현을 포함하는 것인, 방법.

청구항 169

제157항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 것이 하나 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 170

제157항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 방법.

청구항 171

제169항 또는 제170항에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 암호화하고, 조작된 1차 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2에 제시된 서열을 암호화하는 것인, 방법.

청구항 173

제169항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 방법.

청구항 174

제169항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합되는 것인, 방법.

청구항 175

제174항에 있어서, 상기 통합이 조작된 1차 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 조작된 1차 세포 내로 도입함으로써 이루어지는 것인, 방법.

청구항 176

제175항에 있어서, 상기 통합이 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지되, 임의적으로 상기 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 방법.

청구항 177

제176항에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌가 *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *MICA* 유전자좌, *MICB* 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌, 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌인, 방법.

청구항 178

제176항에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌가 *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1* 로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 유전자좌, *SHS231* 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, *ROSA26* 유전자 유전자좌, *ABO* 유전자 유전자좌, *F3* 유전자 유전자좌, *FUT1* 유전자 유전자좌, *HMGB1* 유전자 유전자좌, *KDM5D* 유전자 유전자좌, *LRP1* 유전자 유전자좌, *RHD* 유전자 유전자좌, *ROSA26* 유전자 유전자좌, 및 *SHS231* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 179

제157항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 것이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형을 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 180

제157항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형

이 B2M의 감소된 발현을 포함하는 것인, 방법.

청구항 181

제157항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 방법.

청구항 182

제180항 또는 제181항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M 유전자 활성을 제거하는 것인, 방법.

청구항 183

제160항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.

청구항 184

제160항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.

청구항 185

제183항 또는 제184항에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 내인성 B2M 유전자에 indel 또는 내인성 B2M 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함하는 것인, 방법.

청구항 186

제185항에 있어서, 상기 indel이 B2M 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 방법.

청구항 187

제180항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내인성 B2M 유전자가 녹아웃되는 것인, 방법.

청구항 188

제160항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-A 단백질 발현, HLA-B 단백질 발현, 또는 HLA-C 단백질 발현을 감소시키되, 임의적으로 상기 단백질 발현은 상기 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써 감소되는 것인, 방법.

청구항 189

제160항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현 또는 감소시키는 것이 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현을 감소시키는 변형을 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 190

제189항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 것인, 방법.

청구항 191

제160항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 방법.

청구항 192

제160항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변

형이 CIITA를 제거하는 것인, 방법.

청구항 193

제160항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.

청구항 194

제160항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 세포에서 모든 CIITA 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.

청구항 195

제193항 또는 제194항에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 CIITA 유전자에 indel 또는 CIITA 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함하는 것인, 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, 상기 indel이 CIITA 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 방법.

청구항 197

제157항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CIITA 유전자가 녹아웃되는 것인, 방법.

청구항 198

제160항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키되, 임의적으로 상기 HLA-DP 단백질 발현, 상기 HLA-DR 단백질 발현, 또는 상기 HLA-DQ 단백질 발현은 상기 HLA-DP 단백질, 상기 HLA-DR 단백질, 또는 상기 HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써 감소되는 것인, 방법.

청구항 199

제160항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 세포 내로의 게놈-변형 단백질에 의해 이루어지되, 임의적으로 상기 게놈-변형 단백질 또는 게놈-변형 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포 내로 도입되는 것인, 방법.

청구항 200

제199항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질이 서열 특이적 뉴클레아제, CRISPR-연관 트랜스포사제(CAST), 프라이밍 편집, 또는 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램화가능 추가(PASTE)에 의한 유전자 편집과 연관되는 것인, 방법.

청구항 201

제199항 또는 제200항에 있어서, 상기 게놈-변형 단백질에 의한 변형이 뉴클레아제-매개 유전자 편집인, 방법.

청구항 202

제201항에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 B2M 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지되, 임의적으로 상기 Cas는 Cas9인, 방법.

청구항 203

제201항 또는 제202항에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 내인성 유전자의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함

하는 것인, 방법.

청구항 204

제203항에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 방법.

청구항 205

제202항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 뉴클레아제가 유형 II 또는 유형 V Cas 단백질인, 방법.

청구항 206

제202항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 케놈-변형 단백질이 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Mad7, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 및 CRISPR-연관 트랜스포사제, 또는 임의의 진술한 것의 동족체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 207

제202항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas가 Cas9 또는 Cas12인 방법.

청구항 208

제157항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포 또는 동물 세포이되, 임의적으로 상기 동물 세포는 돼지과 세포, 소과 세포, 또는 양과 세포인, 방법.

청구항 209

제157항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포인, 방법.

청구항 210

제157항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 혈액에 노출되는 세포 유형인 방법.

청구항 211

제157항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 공여자 대상체로부터 단리되는 것인, 방법.

청구항 212

제157항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 대식세포 세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 뉴런, 망막 색소 상피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경교 전구 세포, 신경 세포, 심장 세포, 및 혈액 세포로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 213

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포인, 방법.

청구항 214

제157항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 베타 섬 세포인, 방법.

청구항 215

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 간세포인, 방법.

청구항 216

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 T 세포인, 방법.

청구항 217

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 내피 세포인, 방법.

청구항 218

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 갑상선 세포인, 방법.

청구항 219

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 피부 세포인, 방법.

청구항 220

제157항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 망막 색소 상피 세포인, 방법.

청구항 221

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 조작된 세포.

청구항 222

제221항에 있어서, 상기 세포가 1차 세포인, 조작된 세포.

청구항 223

제158항 내지 제220항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 조작된 세포.

청구항 224

제222항 또는 제223항에 있어서, 상기 세포가 1차 섬 세포인, 조작된 세포.

청구항 225

제224항에 있어서, 상기 섬 세포가 베타 섬 세포인, 조작된 세포.

청구항 226

제92항 내지 제156항 및 제221항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조작된 세포가 수용자 환자에게 투여 시 NK 세포 매개 세포독성을 회피할 수 있고/있거나;
조작된 세포가 수용자 환자에게 투여 시 성숙 NK 세포에 의한 세포 용해로부터 보호되는 것인, 조작된 세포.

청구항 227

제92항 내지 제156항 및 제221항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 것인, 조작된 세포.

청구항 228

제92항 내지 제156항 및 제221항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조작된 세포가 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 전신 염증성 반응을 유도하지 않고/않거나; 조작된 세포가 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 국소 염증성 반응을 유도하지 않는 것인, 조작된 세포.

청구항 229

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 조작된 세포 집단.

청구항 230

제92항 내지 제157항 및 제221항 내지 제228항 중 어느 한 항의 복수의 조작된 세포를 포함하는 조작된 세포 집단.

청구항 231

제229항 또는 제230항에 있어서, 상기 복수의 조작된 것이 1명 초과와 공여자 대상체로부터의 세포 풀로부터 유래된 1차 세포이되, 임의적으로 상기 1명 초과와 공여자 대상체 각각은 건강한 대상체이거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 취득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는 것인, 조작된 세포 집단.

청구항 232

제229항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형을 포함하는 것인, 집단.

청구항 233

제229항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 집단.

청구항 234

제229항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.

청구항 235

제229항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.

청구항 236

제229항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.

청구항 237

제229항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M 및 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.

청구항 238

제229항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 내인성 B2M 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함하는 것인, 집단.

청구항 239

제229항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 내인성 CIITA 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함하는 것인, 집단.

청구항 240

제229항 내지 제239항 중 어느 한 항의 집단을 포함하는, 조성물.

청구항 241

제15항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생성된 조작된 1차 섬 클러스터를 포함하는, 조성물.

청구항 242

조작된 1차 섬 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 섬 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 243

제242항에 있어서, 상기 조작된 1차 섬 세포 집단이 1차 섬 세포의 클러스터인, 조성물.

청구항 244

제242항에 있어서, 상기 조작된 1차 섬 세포 집단이 조작된 1차 베타 섬 세포 집단인, 조성물.

청구항 245

제242항 내지 제244항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드 및 *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 246

조작된 1차 T 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 T 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 247

조작된 1차 갑상선 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 갑상선 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 248

조작된 1차 피부 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 피부 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 249

조작된 1차 내피 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 내피 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 250

조작된 1차 망막 색소 상피 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 망막 색소 상피 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 251

제240항 내지 제250항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 *B2M* 유전자의

두 대립유전자에 indel을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 252

제240항 내지 제251항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 추가로 포함하되, 임의적으로 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자에 indel을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 253

제240항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 표현형 B2M^{indel/indel}; *CIITA*^{indel/indel}; CD47 tg 를 갖는 것인, 조성물.

청구항 254

제240항 내지 제253항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 조성물인, 조성물.

청구항 255

제240항 내지 제254항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 조성물.

청구항 256

제240항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 동결보호제를 포함하는 무혈청 동결보존 배지에 제형화되는 것인, 조성물.

청구항 257

제256항에 있어서, 상기 동결보호제가 DMSO이고 동결보존 배지가 5% 내지 10% DMSO(v/v)인, 조성물.

청구항 258

제256항 및 제257항에 있어서, 상기 동결보호제가 10% DMSO(v/v) 또는 약 10% DMSO(v/v)인, 조성물.

청구항 259

제240항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 멸균되는 것인, 조성물.

청구항 260

제240항 내지 제259항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 용기.

청구항 261

제260항에 있어서, 멸균 백인, 용기.

청구항 262

제261항에 있어서, 상기 백이 동결보존-호환성 백인, 멸균 백.

청구항 263

유효량의 제229항 내지 제239항 중 어느 한 항에 따른 집단, 제240항 내지 제253항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 또는 제254항의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 질환, 병태, 또는 세포 결핍증의 치료를 필요로 하는 환자에서 질환, 병태, 또는 세포 결핍증을 치료하는, 방법.

청구항 264

263에 있어서, 상기 집단이 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 제형화되는 것인, 방법.

청구항 265

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 베타 섬 세포를 포함한 섬 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 266

제263항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 섬 세포 집단이 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.

청구항 267

제263항 내지 제266항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 섬 세포 집단이 베타 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.

청구항 268

제263항 내지 제266항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 집단이 간세포인, 방법.

청구항 269

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 T 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 270

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 갑상선 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 271

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 피부 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 272

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 내피 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 273

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 망막 색소 상피 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 274

제263항 내지 제273항에 있어서, 상기 병태 또는 질환이 당뇨병, 암, 혈관신생 장애, 안구 질환, 갑상선 질환, 피부 질환, 및 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 275

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 결핍증이 당뇨병과 연관되거나 세포 요법이 당뇨병의 치료를 위한 것이되, 임의적으로 상기 당뇨병은 제I형 당뇨병인, 방법.

청구항 276

제275항에 있어서, 상기 세포 집단이 베타 섬 세포를 포함한 섬 세포 집단인, 방법.

청구항 277

제276항에 있어서, 상기 세포 집단이 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.

청구항 278

당뇨병 치료를 필요로 하는 환자에서 당뇨병을 치료하는 방법으로서, 유효량의 제229항 내지 제239항 중 어느 한 항에 따른 섬 세포 집단, 제240항 내지 제253항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 또는 제254항의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하되, 임의적으로 상기 세포 집단은 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.

청구항 279

제276항 내지 제278항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 섬 세포의 클러스터가 베타 섬 세포의 클러스터인, 방법.

청구항 280

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 결핍증이 혈관 병태 또는 질환과 연관되거나 세포 요법이 혈관 병태 또는 질환의 치료를 위한 것인, 방법.

청구항 281

제280항에 있어서, 상기 세포 집단이 내피 세포 집단인, 방법.

청구항 282

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 결핍증이 자가면역 갑상선염과 연관되거나 세포 요법이 자가면역 갑상선염의 치료를 위한 것인, 방법.

청구항 283

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 결핍증이 간 질환과 연관되거나 세포 요법이 간 질환의 치료를 위한 것인, 방법.

청구항 284

제283항에 있어서, 상기 간 질환이 간경변을 포함하는 것인, 방법.

청구항 285

제283항 또는 제284항에 있어서, 상기 세포 집단이 간세포 집단인, 방법.

청구항 286

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 결핍증이 각막 질환과 연관되거나 세포 요법이 각막 질환의 치료를 위한 것인, 방법.

청구항 287

제286항에 있어서, 상기 각막 질환이 폭스(Fuchs) 이영양증 또는 선천성 유전성 각막 내피 이영양증인, 방법.

청구항 288

제286항 또는 제287항에 있어서, 상기 세포 집단이 각막 내피 세포 집단인, 방법.

청구항 289

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 결핍증이 신장 질환과 연관되거나 세포 요법이 신장 질환의 치료를 위한 것인, 방법.

청구항 290

제289항에 있어서, 상기 세포 집단이 신세포 집단인, 방법.

청구항 291

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 요법이 암의 치료를 위한 것인, 방법.

청구항 292

제291항에 있어서, 상기 암이 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 293

제263항 또는 제264항에 있어서, 상기 세포 집단이 T 세포 또는 NK 세포의 집단인, 방법.

청구항 294

제263항 내지 제293항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 투여 전에 확장되고 동결보존되는 것인, 방법.

청구항 295

제263항 내지 제294항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단을 투여하는 것이 집단의 정맥내 주사, 근육내 주사, 혈관내 주사, 또는 이식을 포함하는 것인, 방법.

청구항 296

제295항에 있어서, 상기 집단이 신장 캡슐 이식물 또는 근육내 주사를 통해 이식되는 것인, 방법.

청구항 297

제263항 내지 제296항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단이 공여자 대상체로부터 유래되며, 상기 공여자의 HLA 유형은 환자의 HLA 유형과 일치하지 않는 것인, 방법.

청구항 298

제263항 내지 제297항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 집단이 인간 세포 집단이고 환자가 인간 환자인, 방법.

청구항 299

제276항 내지 제279항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 베타 섬 세포가 대상체에서 내당능(glucose tolerance)을 개선하는 것인, 방법.

청구항 300

제299항에 있어서, 상기 대상체가 당뇨병 환자인, 방법.

청구항 301

제300항에 있어서, 상기 당뇨병 환자가 제I형 당뇨병 또는 제II형 당뇨병을 갖는 것인, 방법

청구항 302

제276항 내지 제278항 및 제299항 내지 제301항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내당능이 섬 세포의 투여 전에 대상체의 내당능에 비해 개선되는 것인, 방법.

청구항 303

제276항 내지 제278항 및 제299항 내지 제302항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 베타 섬 세포가 대상체에서 외인성 인슐린 사용량을 감소시키는 것인, 방법.

청구항 304

제301항 내지 제303항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내당능이 HbA1c 수준에 의해 측정된 바와 같이 개선되는 것인, 방법.

청구항 305

제301항 내지 제304항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 공복 상태인, 방법.

청구항 306

제276항 내지 제278항 및 제297항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 섬 세포가 대상체에서 인슐린 분비를 개선하는 것인, 방법.

청구항 307

제306항에 있어서, 상기 인슐린 분비가 섬 세포의 투여 전에 대상체의 인슐린 분비에 비해 개선되는 것인, 방법.

청구항 308

제263항 내지 제307항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 309

제263항 내지 제307항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자에게 하나 이상의 면역억제제가 투여되었던 것인, 방법.

청구항 310

제308항 또는 제309항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 소분자 또는 항체인, 방법.

청구항 311

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 사이클로스포린, 아자티오프린, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드, 프레드니손, 메토트렉세이트, 금 염, 술파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노미드, 미조리빈, 15-테옥시스페르구알린, 6-메르캅토피린, 사이클로포스파미드, 라파마이신, 타크롤리무스(FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로블린, 티모펜틴(티모신- α), 및 면역억제 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 312

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 사이클로스포린을 포함하는 것인, 방법.

청구항 313

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 마이코페놀레이트 모페틸을 포함하는 것인, 방법.

청구항 314

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 코르티코스테로이드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 315

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 사이클로포스파미드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 316

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 라파마이신을 포함하는 것인, 방법.

청구항 317

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 타크롤리무스(FK-506)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 318

제308항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 항-흉선세포 글로블린을 포함하

는 것인, 방법.

청구항 319

제308항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 하나 이상의 면역조절제인, 방법.

청구항 320

제319항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역조절제가 소분자 또는 항체인, 방법.

청구항 321

제310항 또는 제320항에 있어서, 상기 항체가 IL-2 수용체의 p75, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-감마, TNF-알파, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58, 및 임의의 그들의 리간드에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체 또는 리간드 중 하나 이상에 결합하는 것인, 방법.

청구항 322

제308항 내지 제321항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여하기 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 323

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 324

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 325

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 326

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 지 적어도 1주 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 327

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 지 적어도 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 이상 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 328

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포의 첫번째 투여와 동일한 날에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 329

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 330

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 331

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 332

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 333

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 334

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 335

제308항 내지 제322항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 이상 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.

청구항 336

제308항 내지 제335항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포의 변형을 포함하지 않는 면역원성 세포의 면역 거부를 감소시키기 위해 투여된 하나 이상의 면역억제제의 투여량과 비교하여 더 낮은 투여량으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 337

제308항 내지 제336항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 조작된 세포의 사멸을 제어할 수 있는 것인, 방법.

청구항 338

제308항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 포함하는 것인, 방법.

청구항 339

제338항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 약물 또는 전구약물의 존재 하에, 또는 선택적 외인성 화합물에 의한 활성화 시 제어된 세포 사멸을 유도하는 것인, 방법.

청구항 340

제338항 또는 제339항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 조작된 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질인, 방법.

청구항 341

제340항에 있어서, 상기 조작된 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질이 카스파제 단백질인, 방법.

청구항 342

제341항에 있어서, 상기 카스파제 단백질이 카스파제 9인, 방법.

청구항 343

제338항 내지 제342항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 사이토신 테아미나제 (CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 344

제338항 내지 제343항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.

청구항 345

제338항 내지 제343항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하기 전에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.

청구항 346

제338항 내지 제345항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 환자에게 조작된 세포를 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.

청구항 347

제338항 내지 제346항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 세포독성 또는 환자에 대한 부정적인 결과가 생길 경우 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.

청구항 348

제308항 내지 제347항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 고갈을 허용하는 체제를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 349

제348항에 있어서, 상기 조작된 세포의 고갈을 허용하는 체제가 조작된 세포의 표면 상에서 발현되는 단백질을 인식하는 항체인, 방법.

청구항 350

제349항에 있어서, 상기 항체가 CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, 및 RQR8 을 인식하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 351

제349항 또는 제350항에 있어서, 상기 항체가 모가물리주맙, AFM13, MOR208, 오비누투주맙, 유블리톡시맙, 오카라투주맙, 리톡시맙, 리톡시맙-R11b, 토무조톡시맙, R05083945(GA201), 세톡시맙, Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 디니톡시맙, c.60C3-R11c, 및 이의 바이오시밀러로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 352

제263항 내지 제307항 및 제348항 내지 제351항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 세포의 표면 상에서 하나 이상의 관용원성 인자를 인식하는 체제를 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 353

제352항에 있어서, 상기 조작된 세포가 하나 이상의 관용원성 인자를 발현하도록 조작되는 것인, 방법.

청구항 354

제352항 또는 제353항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 방법.

청구항 355

제263항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 하나 이상의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 356

제263항 내지 제355항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자에게 하나 이상의 추가의 치료제가 투여되었던 것인, 방법.

청구항 357

제263항 내지 제356항 중 어느 한 항에 있어서, 방법의 치료적 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 358

제263항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 방법의 예방적 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 359

제263항 내지 제358항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 질환 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 반복되는 것인, 방법.

청구항 360

제92항 내지 제156항 및 제221항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조작된 세포.

청구항 361

제360항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.

청구항 362

제360항 또는 제361항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조작된 세포.

청구항 363

제360항 또는 제361항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 하나 이상의 관용원성 인자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조작된 세포.

청구항 364

제362항 또는 제363항에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 통합되는 것인, 조작된 세포.

청구항 365

제364항에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어 지되, 임의적으로 상기 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 통합되는 것인, 조작된 세포.

청구항 366

제359항 내지 제365항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 조작된 세포.

청구항 367

제157항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 368

제367항에 있어서, 상기 자살 유전자가 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 369

제367항 또는 제368항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 방법.

청구항 370

제367항 또는 제368항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 하나 이상의 관용원성 인자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 방법.

청구항 371

제369항 또는 제370항에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해 통합되는 것인, 방법.

청구항 372

제371항에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되는 것인, 방법.

청구항 373

제367항 내지 제372항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 방법.

청구항 374

제240항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단의 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 375

제374항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.

청구항 376

제374항 또는 제375항에 있어서, 상기 자살 유전자 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자가 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조성물.

청구항 377

제374항 또는 제375항에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 외인성 CD47이 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조성물.

청구항 378

제376항 또는 제377항에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 조작된 세포 집단의 조작된 세포 내로 도입함으로써 통합되는 것인, 조성물.

청구항 379

제376항 또는 제377항에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되며, 임의적으로 상기 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 조성물.

청구항 380

제1항 내지 제379항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 자가조직 세포인, 방법 또는 세포.

청구항 381

제1항 내지 제380항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 동종이계 세포인, 방법 또는 세포.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2021년 8월 11일 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/232,161, 2022년 1월 7일 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/297,694, 2022년 5월 20일 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/344,502, 2022년 6월 3일 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/348,990, 및 2022년 6월 17일 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/353,531에 대한 우선권을 주장하며, 각각의 내용은 모든 목적을 위해 그들의 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 전자 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 전자 서열 목록(186152005440SEQLIST.xml; 크기: 32,413 바이트; 및 생성일: 2022년 8월 11일)의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0005] 분야
- [0006] 특정 측면에서, 본 개시내용은 동종이계 세포 요법에 사용하기 위한 유전자 변형과 같은 하나 이상의 변형을 함유하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 저면역원성(hyopimmunogenic) 세포이다.

발명의 내용

- [0007] 일부 측면에서, (i) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포가 본원에 제공되며, 여기서 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적이다.
- [0008] 일부 구현예에서, (ii)에서의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, (ii)에서의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시킨다. 임의의 제공된 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1 및/또는 Serpinb9이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, 및 SERPINB9, 및 이의

임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나는 CD47이다.

- [0009] 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47; HLA-E; CD24; PD-L1; CD46; CD55; CD59; CR1; MANF; A20/TNFAIP3; HLA-E 및 CD47; CD24, CD47, PD-L1, 및 이의 임의의 조합; HLA-E, CD24, CD47, 및 PD-L1, 및 이의 임의의 조합; CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; HLA-E, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; HLA-E, CD24, CD47, PDL1, CD46, CD55, CD59, 및 CR1, 및 이의 임의의 조합; HLA-E 및 PDL1; HLA-E, PDL1, 및 A20/TNFAIP, 및 이의 임의의 조합; HLA-E, PDL1, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; HLA-E, PDL1, A20/TNFAIP, 및 MANF, 및 이의 임의의 조합; 및 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0010] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형은 MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; CD47, 및 임의적으로 CD24 및 PD-L1의 발현을 증가시키고; CD46, CD55, CD59 및 CR1의 발현을 증가시키는 변형으로부터 선택된다.
- [0011] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형은 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고; MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고; TXNIP의 발현을 감소시키고; PD-L1 및 HLA-E; 및 임의적으로 A20/TNFAIP3 및 MANF의 발현을 증가시키는 변형으로부터 선택된다.
- [0012] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형은 CCL21, PD-L1, FASL, SERPINB9, HLA-G, CD47, CD200, 및 MFGE8의 발현을 증가시키고; MICA 및/ 또는 MICB의 발현을 감소시키는 변형으로부터 선택된다.
- [0013] 일부 구현예에서, 변형은 MHC I 및/또는 MHC II의 발현을 감소시키고; CD47의 발현을 증가시키는 변형으로부터 선택된다.
- [0014] 일부 구현예에서, 임의의 상기 변형은 세포에서 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시키는 하나 이상의 추가적인 편집과 함께 제공된 조작된 세포에 존재한다. 일부 구현예에서, 추가 변형 중 임의의 하나 이상은 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B의 발현을 파괴하거나, 불활성화하거나, 녹아웃(knockout)시키는 것과 같이 발현을 감소시키는 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 변형 중 임의의 하나 이상은 산화성 또는 ER 스트레스, TRAC, TRB, CD142, ABO, CD38, PCDH11Y, NLGN4Y 및/또는 RHD에 수반되는 단백질의 발현을 감소시키는 변형일 수 있다. 일부 구현예에서, 산화성 또는 ER 스트레스에 수반되는 단백질은 티오레독신-상호작용 단백질(TXNIP), PKR-유사 ER 키나제(PERK), 이노시톨-요구 효소 1a(IRE1a), 및 DJ-1(PARK7)을 포함한다.
- [0015] 일부 구현예에서, 위에 기재된 표적 유전자(예를 들어 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, CTLA-4, PD-1, IRF1, MIC-A, MIC-B) 중 임의의 것의 발현이 감소된 임의의 제공된 구현예에 대해 표적 유전자는 조작된 세포에 의해 발현되지 않는다. 일부 구현예에서, 표적 유전자에 의해 암호화된 단백질은 세포 표면 상에서 발현되지 않는다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 복합체 및/또는 MHC 클래스 II 복합체는 세포 표면 상에서 발현되지 않는다.
- [0016] 일부 측면에서, (i) CD47의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포가 본원에 제공되며, 여기서 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적이다.
- [0017] 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47의 발현을 증가시키는 변형은 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 서열 번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 암호화하고, 조작된 1차 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시킨다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 2에 제시된 서열을 암호화한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터,

백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 폴로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 CD47을 암호화하는 멀티시스트로닉 벡터 및 제2 이식유전자를 암호화하는 추가의 이식유전자이다. 일부 구현예에서, 통합은 조작된 1차 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 표적 게놈 유전자좌는 안전한 항구(safe harbor) 유전자좌, *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌, 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 표적 게놈 유전자좌는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 유전자좌, *SHS231* 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, 및 *ROSA26* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0018] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 B-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 B2M의 감소된 mRNA 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자 활성을 제거한다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 *B2M* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴는 *B2M* 유전자에 indel을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, *B2M* 유전자는 녹아아웃된다(knocked out). 일부 구현예에서, 변형은 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *B2M* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합은 *B2M* 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR-Cas 조합은 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질의 발현을 감소시키는 변형이며, 임의적으로 여기서 상기 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자는 녹아아웃된다.

[0019] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA*의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA*의 감소된 mRNA 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA*의 감소된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *CIITA* 유전자 활성을 제거한다. 일부 구현예에서, 변형은 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 *CIITA* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴는 *CIITA* 유전자에 indel을 포함한다. 일부 구현예에서, indel은 *CIITA* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, *CIITA* 유전자는 녹아아웃된다. 일부 구현예에서, 변형은 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *CIITA* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합은 *CIITA* 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR-Cas 조합은 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키는 변형이며, 임의적으로 여기서 상기 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자는 녹아아웃된다.

[0020] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 인간 세포 또는 동물 세포이다. 일부 구현예에서, 동물 세포는 돼지(돼지과), 소(소과) 또는 양(양과) 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 1차 세포는 혈액에 노출되는 세포 유형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 공여자 대상체로부터 단리된 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 건강하거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 획득되는 당

시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 베타 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 간세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0021] 일부 측면에서, 조작된 1차 세포를 생성하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 a) 1차 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계; 및 b) 1차 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, 및 SERPINB9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나는 CD47이다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다.

[0022] 일부 측면에서, 조작된 1차 세포를 생성하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 a. 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계; 및 b. 세포 내 CD47의 발현을 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다.

[0023] 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47의 발현을 증가시키는 변형은 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 암호화하고, 조작된 1차 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시킨다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 서열번호: 2에 제시된 서열을 암호화한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 통합은 조작된 1차 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 조작된 1차 세포 내로 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 표적 게놈 유전자좌는 *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *CD142* 유전자 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌, 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 표적 게놈 유전자좌는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVSI)*로도 알려진 유전자, 알부민 유전자 유전자좌, SHS231 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, 및 *ROSA26* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 표적 게놈 유전자좌를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합은 표적 게놈 유전자좌의 표적 서열에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA) 및 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상동성 지시 복구 주형을 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR-Cas 조합은 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 저면역원성 1차 세포이다.

[0024] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형을 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 B2M의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 *B2M* 유전자 활성을 제거한다. 일부 구현예에서, 하

나 이상의 MHC 클래스 I 분자 발현을 감소시키는 변형은 *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 세포 내 모든 *B2M* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴는 내인성 *B2M* 유전자에 indel 또는 내인성 *B2M* 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, indel은 *B2M* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, 내인성 *B2M* 유전자는 녹아웃된다. 일부 구현예에서, 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키며 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *B2M* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합은 *B2M* 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR-Cas 조합은 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 HLA-A 단백질 발현, HLA-B 단백질 발현, 또는 HLA-C 단백질 발현을 감소시키며, 임의적으로 단백질 발현은 상기 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써 감소된다.

[0025] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형을 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 유전자 변형은 CIITA의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 유전자 변형은 CIITA의 감소된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 CIITA를 제거한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 *CIITA* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴는 *CIITA* 유전자에 indel 또는 *CIITA* 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, indel은 *CIITA* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, *CIITA* 유전자는 녹아웃된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II의 발현을 감소시키는 유전자 변형은 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키며, 임의적으로 여기서 상기 HLA-DP 단백질 발현, 상기 HLA-DR 단백질 발현, 또는 상기 HLA-DQ 단백질 발현은 상기 HLA-DP 단백질, 상기 HLA-DR 단백질, 또는 상기 HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써 감소된다.

[0026] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 인간 세포 또는 동물 세포이다. 일부 구현예에서, 동물 세포는 돼지(돼지과) 세포, 소(소과) 세포, 또는 양(양과) 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 혈액에 노출되는 세포 유형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 공여자 대상체로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포이다.

[0027] 일부 구현예에서, 1차 섬 세포는 1차 섬 클러스터로부터 해리되었다. 일부 구현예에서, 1차 섬 클러스터는 인간 1차 사체(cadaveric) 섬 클러스터이다. 일부 구현예에서, 단계 a) 후 및/또는 단계 b) 후 1차 섬 세포는 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션되며, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하기 전에, 방법은 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 선택은 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 이루어진다.

[0028] 일부 구현예에서, 방법은 i) 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; ii) 1차 베타 섬 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II HLA의 발현을 감소시키거나 제거하기 위해 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시키는 단계; iii) 변형된 1차 베타 섬 세포를 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계; iv) 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; v) 1차 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위해 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 추가로 변형시키는 단계; 및 vi) 추가의 변형된 1차 베타 섬 세포를 두번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링

하기 위한 조건 하에 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 포함한다.

- [0029] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I HLA는 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II HLA는 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질이다. 일부 구현예에서, 변형은 유전자 조작에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 움직임은 진탕(shaking)이다. 일부 구현예에서, 진탕은 궤도 움직임을 포함한다. 일부 구현예에서, 진탕은 양방향 선형 이동을 포함한다. 일부 구현예에서, 진탕은 궤도 진탕기를 사용하여 이루어진다. 일부 구현예에서, (iii)에서의 인큐베이션 및/또는 vi)에서의 인큐베이션은 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, iii)에서의 인큐베이션 및/또는 vi)에서의 인큐베이션은 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함한다.
- [0030] 일부 구현예에서, v) 이전에, 방법은 iv)의 해리된 섬 세포로부터 변형된 베타 섬 세포를 선택하고, 임의적으로 선택된 섬 세포에서 단계 iii) 및 iv)를 반복하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, vi)에서의 인큐베이션 후, 방법은 두번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키고 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 선택된 변형된 1차 베타 섬 세포를 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하며, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행된다.
- [0031] 일부 구현예에서, 세포 집단의 변형을 촉진하기 위한 움직임의 사용이 본원에 제공되며, 여기서 세포 집단은 움직임에 적용하기 전에 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키기 위해 하나 이상의 시약과 접촉되었다.
- [0032] 일부 구현예에서, 세포 집단의 변형을 향상시키는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 i) 세포 집단을 하나 이상의 시약과 접촉시켜 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및 ii) 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포 집단을 움직이게 하는 단계를 포함한다.
- [0033] 일부 구현예에서, 세포 집단의 생존력을 향상시키는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 i) 세포 집단을 하나 이상의 시약과 접촉시켜 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및 ii) 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포 집단을 움직이게 하는 단계를 포함한다.
- [0034] 일부 구현예에서, 세포 집단의 변형 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 i) 세포 집단을 하나 이상의 시약과 접촉시켜 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및 ii) 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포 집단을 움직이게 하는 단계를 포함한다.
- [0035] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 집단은 1차 세포이다. 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 집단은 줄기 세포로부터 유래된 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 줄기 세포(PSC), 유도 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 생식계열 줄기 세포, 폐 줄기 세포, 체대혈 줄기 세포, 및 다분화성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 유도 다능성 줄기 세포, 간엽 줄기 세포(MSC), 조혈 줄기 세포(HSC), 또는 배아 줄기 세포(ESC)이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 간세포, 신경교 전구 세포, 도파민성 뉴런, 망막 색소 상피 세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경교 전구 세포, 신경 세포, 심장 세포, 및 혈액 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0036] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 집단은 3D 네트워크에 자연적으로 존재한다.
- [0037] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 집단은 현탁액에 존재한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 낮은 부착 표면을 갖는 용기에 존재한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 세포를 덮기에 충분한 최소 부피의 배지로 용기에서 유지된다. 일부 구현예에서, 현탁액 내 세포 집단은 접촉시키기 전에 부착 배지 또는 세포 클러스터로부터 세포를 해리시킴으로써 생성된다.
- [0038] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 집단은 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 베타 섬 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포를 포함하는 세포 집단은 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포를 포함하는 세포 현탁액으로 해리시킴으로써 생성된다.
- [0039] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 2일 미만 동안 수행된

다. 일부 구현예에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 30초 내지 24시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 1분 내지 60분, 2분 내지 30분, 5분 내지 15분 동안 수행된다.

- [0040] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 집단을 움직이게 하는 것은 세포 응집체의 형성을 촉진한다. 일부 구현예에서, 세포 집단을 움직이게 하는 것은 세포 클러스터를 형성한다.
- [0041] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 방법 또는 용도는 세포를 움직이게 한 후에 정적 조건 하에 세포를 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다. 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 방법 또는 용도는 접촉시킨 후 및 세포를 움직이게 하기 전에 정적 조건 하에 세포를 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다.
- [0042] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 시약은 적어도 2개의 상이한 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 상이한 시약 각각은 상이한 유전자의 발현을 조절하기 위한 것이다.
- [0043] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 방법의 단계가 반복된다. 일부 구현예에서, 방법의 첫번째 반복에서 하나 이상의 시약은 방법의 반복된 반복에서 하나 이상의 시약과 상이하다. 일부 구현예에서, 방법의 첫번째 반복에서 또는 더 많은 시약은 방법의 두번째 반복에서 하나 이상의 시약과 상이하다.
- [0044] 제공된 용도 또는 방법의 임의의 구현예 중 일부에서, 이는 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포를 움직이게 하기 전에, 변형된 유전자 발현을 갖는 세포를 선택하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 유전자 발현을 갖는 세포를 선택하는 것은 접촉 전 세포에 상대적일 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 유전자 발현은 예컨대 접촉 전 세포에서 유전자의 발현에 상대적으로 증가된다. 일부 구현예에서, 변형된 유전자 발현은 예컨대 접촉 전 세포에서 유전자의 발현에 상대적으로 감소된다.
- [0045] 1차 섬 세포를 변형시키는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 i) 1차 섬 클러스터를 1차 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; ii) 1차 섬 세포의 현탁액을 하나 이상의 시약과 접촉시켜 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및 iii) 접촉시킨 후 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 포함한다.
- [0046] 일부 측면에서, 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 i) 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; ii) 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시키는 단계; 및 iii) 변형된 1차베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차베타 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 진탕하면서 수행되는 것인, 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 1차 섬 클러스터는 인간 1차 사체 섬 클러스터이다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시키거나 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키기 위해 세포 내로 하나 이상의 변형을 도입하는 것을 포함한다.
- [0047] 일부 구현예에서, (iii)에서의 인큐베이션 및/또는 vi)에서의 인큐베이션은 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 단계 i)-iii)은 반복된다. 일부 구현예에서, 방법의 첫번째 반복에서의 변형은 방법의 반복된 반복에서의 변형과 상이하다. 일부 구현예에서 방법의 첫번째 반복에서 하나 이상의 시약은 방법의 반복된 반복에서 하나 이상의 시약과 상이하다.
- [0048] 일부 구현예에서, 재클러스터링된 섬 세포는 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터이며 여기서 방법은 iv) 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; v) 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 추가로 변형시키는 단계; 및 vi) 추가로 변형된 1차 베타 섬 세포를 두번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 추가로 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 하나 이상의 시약은 하나 이상의 첫번째 시약이고 재클러스터링된 섬 세포는 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터이며 여기서 방법은 iv) 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; v) 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 하나 이상의 추가 시약과 추가로 접촉시켜 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및 vi) 추가 접촉시킨 후 추가로 변형된 1차 섬 세포를 두번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 추가로 포함한다.

- [0050] 일부 구현예에서, iii)에서의 인큐베이션 전에, 방법은 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, v) 전에, 방법은 iv)에서의 해리된 섬 세포로부터, 변형된 베타 섬 세포를 선택하고, 임의적으로 선택된 섬 세포에 대해 단계 iii) 및 iv)를 반복하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, vi)에서의 인큐베이션 후, 방법은 두번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 섬 세포의 현탁액으로 해리시키고 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 세포는 접촉시키기 전에 1차 섬 세포에 비해 변형된 것과 같은 변형된 유전자 발현을 갖는다.
- [0051] 일부 구현예에서, 선택된 변형된 1차 베타 섬 세포를 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하며, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행된다. 일부 구현예에서, 선택은 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다.
- [0052] 일부 구현예에서, 현탁액은 단일 세포 현탁액이다.
- [0053] 일부 구현예에서, 1차 섬 세포의 현탁액은 낮은 부착 표면을 갖는 용기에 존재한다. 일부 구현예에서, 용기는 세포를 달기에 충분한 최소 부피의 배지를 갖는다.
- [0054] 임의의 구현예 중 일부에서, 움직임은 약 20 rpm 내지 약 180 rpm, 약 40 rpm 내지 약 125 rpm 또는 약 60 rpm 내지 약 100 rpm (각각 경계값 포함)의 속도이다. 일부 구현예에서, 움직임은 약 85 rpm 내지 약 95 rpm (경계값 포함)의 속도이다.
- [0055] 일부 구현예에서, 움직임은 진탕이다. 일부 구현예에서, 진탕은 궤도 움직임을 포함한다. 일부 구현예에서, 움직임은 파동(undulating) 움직임이다. 일부 구현예에서, 파동 움직임은 궤도 이동 및 진동 이동을 조합하는 진탕기 장치로 이루어진다. 일부 구현예에서, 진탕은 양방향 선형 이동을 포함한다. 일부 구현예에서, 진탕은 궤도 진탕기로 이루어진다. 일부 구현예에서, 움직임은 경사각으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 경사각은 1° 내지 8° 이다.
- [0056] 일부 구현예에서, 첫번째 변형 또는 추가 변형 중 하나는 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것을 포함하고 첫번째 변형 또는 추가 변형 중 다른 하나는 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 첫번째 변형은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것을 포함하고 추가 변형은 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키는 것을 포함한다.
- [0057] 일부 구현예에서, 하나 이상의 시약은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키거나 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 첫번째 하나 이상의 시약 중 적어도 하나는 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 것이고 추가의 하나 이상의 시약 중 적어도 하나는 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 첫번째 하나 이상의 시약 중 적어도 하나는 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 것이고 추가의 하나 이상의 시약은 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 것이고 추가의 하나 이상의 시약은 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 시약은 내인성 단백질을 암호화하는 표적 유전자를 유전자 편집하기 위한 게놈-변형 단백질 및/또는 외인성 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제를 포함한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것은 유전자-편집 시스템을 세포 내로 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자-편집 시스템은 서열 특이적 뉴클레아제를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 시약은 게놈-변형 단백질을 포함한다. 게놈-변형 단백질은 서열-특이적 뉴클레아제, CRISPR-연관 트랜스포사제(CAST), 프라임 편집, 또는 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램가능 추가(PASTE)에 의한 유전자 편집과 연관된다. 일부 구현예에서, 게놈-변형 단백질은 서열 특이적 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, 서열 특이적 뉴클레아제는 RNA-가이드 뉴클레아제이다.
- [0059] 일부 구현예에서, 서열 특이적 뉴클레아제는 RNA-가이드 DNA 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 유전자-편집 시스템은 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드-뉴클레아제는 유형 II 또는 유형 V

Cas 단백질이다. 일부 구현예에서, RNA-가이드-뉴클레아제는 Cas9 동족체 또는 Cpf1 동족체이다. 일부 구현예에서, 게놈-변형 단백질은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, 및 Mad7로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, Cas는 Cas12이다.

[0060] 일부 구현예에서, 하나 이상의 시약은 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고/시키거나 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 첫번째 변형은 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 유전자 조작이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I HLA는 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II HLA는 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질이다.

[0061] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 시약은 B2M, TAP I, NLR5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 및/또는 NFY-C 중 하나 이상의 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I의 발현을 감소시키는 것은 B-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시킴으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II의 발현을 감소시키는 것은 CIITA의 발현을 감소시킴으로써 이루어진다.

[0062] 일부 구현예에서, 추가의 변형은 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 단백질은 하나 이상의 관용원성 인자이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 시약은 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 체제를 포함한다. 일부 구현예에서, 체제는 지질 입자 또는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0063] 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1, 또는 Serpinb9이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, 및 SERPINB9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나는 CD47이다.

[0064] 일부 구현예에서, 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키는 것은 외인성 폴리뉴클레오티드를 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터 및 UBC 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 멀티시스템론 벡터이다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 표적 게놈 유전자와 내로의 표적화된 삽입에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 베타 섬 세포이다.

[0065] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 간세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 갑상선 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 피부 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 망막 색소 상피 세포이다.

[0066] 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 조작된 세포가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 1차 세포이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포로부터 선택된다. 일부 구현예에

서, 1차 세포는 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 베타 섬 세포이다.

- [0067] 일부 구현예에서, 방법에 의해 생성된 세포의 생존력은 약 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 그 이상보다 더 크다. 일부 구현예에서, 방법에 의해 변형된 집단의 세포 백분율은 약 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 그 이상보다 더 크다.
- [0068] 임의의 구현예 중 일부에서, 임의의 제공된 조작된 세포에 기재된 바와 같은 변형은 조작된 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시킨다.
- [0069] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 수용자 환자에게 투여 시 NK 세포 매개 세포독성을 회피할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 수용자 환자에게 투여 시 성숙한 NK 세포에 의한 세포 용해로부터 보호된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 면역 반응을 유도하지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 전신 염증 반응을 유도하지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 국소 염증성 반응을 유도하지 않는다.
- [0070] 일부 측면에서, 복수의 임의의 본원에 기재된 조작된 1차 세포를 포함하는 조작된 1차 세포 집단이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 복수의 조작된 1차 세포는 1 명 초과와 공여자 대상체로부터 풀링된(pooled) 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 1 명 초과와 공여자 대상체 각각은 건강한 대상체이거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 수득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M 및 CIITA의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 내인성 B2M 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 내인성 CIITA 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다.
- [0071] 일부 측면에서, 본원에 기재된 집단 중 임의의 하나를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.
- [0072] 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 하나에 의해 생성된 조작된 1차 섬 클러스터를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.
- [0073] 일부 측면에서, 조작된 1차 섬 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 섬 세포의 집단은 1차 섬 세포의 클러스터이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 섬 세포의 집단은 조작된 1차 베타 섬 세포의 집단이다.
- [0074] 일부 측면에서, 조작된 1차 T 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 T 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0075] 일부 측면에서, 조작된 1차 갑상선 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 갑상선 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0076] 일부 측면에서, 조작된 1차 피부 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 피부 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

- [0077] 일부 측면에서, 조작된 1차 내피 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 내피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0078] 일부 측면에서, 조작된 1차 망막 색소 상피 세포의 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 망막 색소 상피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0079] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포는 *B2M* 유전자의 두 대립유전자에 indel을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립 유전자에 indel을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포는 표현형 $B2M^{indel/indel}$; $CIITA^{indel/indel}$; CD47 tg 를 갖는다.
- [0080] 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 부형제는 식염수와 같은 완충 용액이다. 일부 구현예에서, 조성물은 동결보호제를 포함하는 무혈청 동결보존 배지에 제형화된다. 일부 구현예에서, 동결보호제는 DMSO이고 동결보존 배지는 5% 내지 10% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보호제는 이고 또는 약 10% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 조성물은 멸균된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 조성물을 포함하는 용기가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 용기는 멸균 백이다. 일부 구현예에서, 백은 동결보존-호환성 백이다.
- [0081] 일부 측면에서, 유효량의 본원에 기재된 임의의 집단, 조성물, 또는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환, 병태, 또는 세포 결핍증(cellular deficiency)의 치료를 필요로 하는 환자에서 질환, 병태, 또는 세포 결핍증을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 집단은 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 제형화된다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 베타 섬 세포를 포함한 섬 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 섬 세포 집단은 섬 세포의 클러스터로서 투여된다. 일부 구현예에서, 섬 세포 집단은 베타 섬 세포의 클러스터로서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 간세포이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 갑상선 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 피부 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 내피 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 망막 색소 상피 세포를 포함한다.
- [0082] 일부 구현예에서, 병태 또는 질환은 당뇨병(diabetes), 암, 혈관신생 장애(vascularization disorder), 안구 질환(ocular disease), 갑상선 질환(thyroid disease), 피부 질환(skin disease), 및 간 질환(liver disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 당뇨병과 연관되거나 세포 요법은 당뇨병의 치료를 위한 것이며, 임의적으로 여기서 당뇨병은 제I형 당뇨병이다.
- [0083] 일부 구현예에서, 세포 집단은 베타 섬 세포를 포함한 섬 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 섬 세포의 클러스터로서 투여된다.
- [0084] 일부 측면에서 당뇨병의 치료를 필요로 하는 환자에서 당뇨병을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 유효량의 본원에 기재된 임의의 섬세포 집단, 조성물, 또는 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 섬 세포의 클러스터는 베타 섬 세포의 클러스터이다. 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 혈관 병태 또는 질환과 연관되거나 세포 요법은 혈관 병태 또는 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 내피 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 자가면역 갑상선염(autoimmune thyroiditis)과 연관되거나 세포 요법은 자가면역 갑상선염의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 간 질환과 연관되거나 세포 요법은 간 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 간 질환은 간경변(cirrhosis of the liver)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 간세포 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 각막 질환(corneal disease)과 연관되거나 세포 요법은 각막 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 각막 질환은 폭스 이영양증(Fuchs dystrophy) 또는 선천성 유전성 각막 내피 이영양증(congenital hereditary endothelial dystrophy)이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 각막 내피 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 신장 질환(kidney disease)과 연관되거나 세포 요법은 신장 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 신세포(renal cell) 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 암의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 암은 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암,

교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 T 세포 또는 NK 세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 세포는 투여 전에 확장되고 동결보존된다.

[0085] 일부 구현예에서, 집단을 투여하는 것은 정맥내 주사, 근육내 주사, 혈관내 주사, 또는 집단의 이식을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단은 신장 캡슐 이식물 또는 근육내 주사를 통해 이식된다. 일부 구현예에서, 집단은 공여자 대상체로부터 유래되며, 여기서 공여자의 HLA 유형은 환자의 HLA 유형과 일치하지 않는다. 일부 구현예에서, 집단은 인간 세포 집단이고 환자는 인간 환자이다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 대상체에서 내당능(glucose tolerance)을 개선시킨다. 일부 구현예에서, 대상체는 당뇨병 환자이다. 일부 구현예에서, 당뇨병 환자는 제I형 당뇨병 또는 제II형 당뇨병을 갖는다. 일부 구현예에서, 내당능은 섬 세포 투여 전 대상체의 내당능에 비해 개선된다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 대상체에서 외인성 인슐린 사용량을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 내당능은 HbA1c 수준에 의해 측정된 바와 같이 개선된다. 일부 구현예에서, 대상체는 공복 상태이다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 대상체에서 인슐린 분비를 개선시킨다. 일부 구현예에서, 인슐린 분비는 섬 세포 투여 전 대상체의 인슐린 분비에 비해 개선된다.

[0086] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 방법은 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 환자에게 하나 이상의 면역억제제가 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 소분자 또는 항체이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 사이클로스포린, 아자티오프린, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드, 프레드니손, 메토티렉세이트, 금 염, 술파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노미드, 미조리빈, 15-데옥시시페르구알린, 6-메르캅토피린, 사이클로포스파미드, 라파마이신, 타크롤리무스(FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로불린, 티모펜탄(티모신- α), 및 면역억제 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 사이클로스포린을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 마이코페놀레이트 모페틸을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 코르티코스테로이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 사이클로포스파미드를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 라파마이신을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 타크롤리무스(FK-506)를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 항-흉선세포 글로불린을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 하나 이상의 면역조절제이다.

[0087] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역조절제는 소분자 또는 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 IL-2 수용체의 p75, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-감마, TNF-알파, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58, 및 그들의 리간드 중 임의의 것에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체 또는 리간드 중 하나 이상에 결합한다.

[0088] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 투여하기 전에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 투여한 지 적어도 1 주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7 주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 이상 후에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포의 첫번째 투여와 동일한 날에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 투여한 후에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 후에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 전에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 이상 후에 환자에게 투여되거나 투여되었다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역

억제제는 조작된 세포의 변형을 포함하지 않는 면역원성 세포의 면역 거부를 감소시키기 위해 투여된 하나 이상의 면역억제제의 투여량과 비교하여 더 낮은 용량으로 투여된다.

- [0089] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 조작된 세포는 조작된 세포의 사멸을 제어할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 자살 유전자 또는 자살 스위치를 포함한다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 약물 또는 전구약물의 존재 하에, 또는 선택적 외인성 화합물에 의한 활성화 시 제어된 세포 사멸을 유도한다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 조작된 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질은 카스파제 단백질이다. 일부 구현예에서, 카스파제 단백질은 카스파제 9이다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(ropaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하기 전에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 환자에게 조작된 세포를 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 환자에 대한 세포독성 또는 다른 부정적인 결과가 생길 경우 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화된다.
- [0090] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 방법은 조작된 세포 집단 중 조작된 세포를 고갈시키는 제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포를 고갈시키는 제제는 조작된 세포의 표면 상에서 발현된 단백질을 인식하는 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, 및 RQR8을 인식하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 항체는 모가몰리주맙(mogamulizumab), AFM13, MOR208, 오비누투주맙(obinutuzumab), 유틸리톡시맙(ublituximab), 오카라투주맙(ocaratuzumab), 리톡시맙(rituximab), 리톡시맙-R11b, 토무조톡시맙(tomuzotuximab), R05083945(GA201), 세톡시맙(cetuximab), Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 디니톡시맙(dinituximab), c.60C3-R11c, 및 이의 바이오시밀러로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0091] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 방법은 조작된 세포의 표면 상에서 하나 이상의 관용원성 인자를 인식하는 제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 관용원성 인자를 발현하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47이다.
- [0092] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 방법은 환자에게 하나 이상의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 환자에게 하나 이상의 추가의 치료제가 투여되었다.
- [0093] 질환을 치료하는 방법의 일부 구현예에서, 방법은 방법의 치료적 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 방법의 예방적 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 질환 증상의 원하는 억제 발생을 때까지 반복된다.
- [0094] 조작된 세포의 일부 구현예에서, 조작된 세포는 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(ropaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자는 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 하나 이상의 관용원성 인자는 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 비시스트로닉 카세트는 조작된 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 통합된다. 일부 구현예에서, 비시스트로닉 카세트는 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되며, 임의적으로 여기서 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47이다.
- [0095] 조작된 세포를 생성하는 방법의 일부 구현예에서, 조작된 세포는 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 자살 유전자는 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(ropaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자는 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 하나 이상의 관용원성 인자는 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트

로닉 카세트로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 비시스트로닉 카세트는 조작된 세포의 게놈에 비표적화 삽입에 의해 통합된다. 일부 구현예에서, 비시스트로닉 카세트는 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47이다.

[0096] 조작된 세포의 조성물의 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단의 조작된 세포는 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자는 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 외인성 CD47은 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현된다. 일부 구현예에서, 비시스트로닉 카세트는 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 조작된 세포 집단의 조작된 세포 내로 도입함으로써 통합된다. 일부 구현예에서, 비시스트로닉 카세트는 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되며, 임의적으로 여기서 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다.

[0097] 임의의 제공된 방법 또는 세포의 일부에서, 세포는 자가조직 세포이다.

[0098] 임의의 제공된 방법 또는 세포의 일부에서, 세포는 동종이계 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0099] 도 1은 C57BL/6(B6) 마우스로부터 단리된 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포가 주요 조직적합성 복합체 클래스 I(MHC-I) 또는 클래스 II(MHC-II) 분자를 발현하지 않음을 보여준다. 발현은 이식 전 및 이식 후 단리된 세포에서 분석하였다.

도 2a-2b는 마우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포(도 2a) 또는 CD47의 과발현을 위해 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포(도 2b)에서 CD47 과발현을 보여준다.

도 3a-3f는 조작된 및 야생형(WT) 1차 베타 섬 세포의 근육내(i.m.) 주사 이식 연구 결과를 제공한다. 이식된 마우스 WT 1차 베타 섬 세포(도 3a 정량화; 도 3b 상응하는 BLI 이미지) 및 이식된 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포(도 3c 정량화; 도 3d 상응하는 BLI 이미지)에 대해 루시퍼라제 발현의 생물발광 이미지화(BLI)의 정량화가 제공된다. 마우스 WT 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 3e) 및 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 3f)에 대해 혈당 측정이 제공된다.

도 4a-4f는 신장 캡슐 내로 주사된 조작된 및 마우스 WT 1차 베타 섬 세포의 연구 결과를 제공한다. 이식된 마우스 WT 1차 베타 섬 세포(도 4a 정량화; 도 4b 상응하는 BLI 이미지) 및 이식된 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포(도 4c 정량화; 도 4d 상응하는 BLI 이미지)에 대해 루시퍼라제 발현의 BLI의 정량화가 제공된다. 마우스 WT 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 4e) 및 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 4f)에 대해 혈당 측정이 제공된다.

도 5a-5c는 면역 반응을 평가하는 i.m. 주사 동종이계 이식 연구 결과를 제공한다. 동종이계 마우스 WT 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스 및 동종이계 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스에 대해 혈당 측정이 제공된다(도 5a). 동종이계 마우스 WT 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스 및 동종이계 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스에 대해 인터페론 감마(IFNγ) 수준이 제공된다(도 5b). 동종이계 마우스 WT 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스 및 동종이계 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스에 대해 공여자-특이적 항체(DSA) IgG 수준이 제공된다(도 5c).

도 6a-6f는 조작된 및 마우스 WT 1차 베타 섬 세포의 시험관 내 자연 살해(NK) 세포 매개 세포 사멸 결과를 제공한다. 마우스 WT 1차 베타 섬 세포(도 6a), 마우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포(도 6b), 및 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포(도 6c)에 대해 NK 세포 매개 세포 사멸이 제공된다. 마우스 WT 1차 베타 섬 세포(도 6d), 마

우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포(도 6e), 및 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포(도 6f)에 대해 항-CD47 항체의 존재 하에 NK 세포 매개 세포 사멸이 또한 제공된다.

도 7a-7f는 조작된 마우스 및 마우스 WT 1차 베타 섬 세포의 시험관 내 대식세포 세포 매개 세포 사멸 결과를 제공한다. 마우스 WT 1차 베타 섬 세포(도 7a), 마우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포(도 7b), 및 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포(도 7c)에 대해 대식세포 세포 매개 세포 사멸이 제공된다. 마우스 WT 1차 베타 섬 세포(도 7d), 마우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포(도 7e), 및 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포(도 7f)에 대해 항-CD47 항체의 존재 하에 대식세포 세포 매개 세포 사멸이 또한 제공된다.

도 8a-8n는 CD47의 과발현을 위해 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 마우스 B2M^{-/-}(B2M^{-/-}; CD47tg) 1차 베타 섬 세포에서 CD47 발현을 보여주고(도 8a, 8c, 8e, 8g, 8i, 8k, 8m), 다양한 감염 다중도(MOI)에 대해 조작된 마우스 1차 베타 섬 세포의 시험관 내 NK 세포 매개 세포 사멸의 상응하는 결과를 제공한다(도 8b, 8d, 8f, 8h, 8j, 8l, 8n).

도 9a는 WT 1차 인간 베타 섬 세포 및 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 인간 베타 섬 세포가 이식된 대표적인 마우스의 세포 조성을 도시한다.

도 9b-9g는 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스-I(도 9b-9c), HLA 클래스-II(도 9d-9e), 및 CD47 발현(도 9f-9g)의 표면 발현을 위한 대표적인 공여자로부터의 WT 1차 인간 베타 섬 세포로부터 생성된 WT 1차 인간 베타 섬 세포 및 B2M^{-/-}; CD47tg 조작된 인간 베타 섬 세포의 유세포 분석법 염색을 도시한다.

도 9h는 WT 1차 인간 베타 섬 세포 및 B2M^{-/-}; CD47tg 조작된 인간 베타 섬 세포로부터의 인슐린 분비를 도시한다.

도 9i-9k는 대표적인 공여자로부터의 WT 1차 인간 베타 섬 세포(도 9i), B2M^{-/-} 1차 인간 베타 섬 세포(도 9j), 및 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 인간 베타 섬 세포(도 9k)에 대한 시험관 내 NK 세포 매개 세포 사멸을 도시한다.

도 9l-9n은 대표적인 공여자로부터의 WT 1차 인간 베타 섬 세포(도 9l), B2M^{-/-} 1차 인간 베타 섬 세포(도 9m), 및 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 인간 베타 섬 세포(도 9n)에 대한 시험관 내 대식세포 매개 세포 사멸을 도시한다.

도 10a-10d는 동종이계 인간 1차 섬 세포에 대한 수용자의 면역 반응을 평가하는 동종이계 이식 연구의 연구 결과를 제공한다. 대표적인 공여자로부터의 이식된 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 인간 1차 섬 세포(도 10a 정량화; 도 10b 상응하는 BLI 이미지) 및 이식된 WT 인간 1차 섬 세포(도 10c 정량화; 도 10d 상응하는 BLI 이미지)에 대해 루시페라제 발현의 BLI의 정량화가 제공된다.

도 10e 및 10f는 대표적인 공여자로부터 수확된 동종이계 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 10e) 및 동종이계 WT 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 10f)에 대한 혈당 측정을 도시한다.

도 10g는 대표적인 공여자로부터의 동종이계 B2M^{-/-}; 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스에 대한 루시페라제 발현의 BLI를 제공한다.

도 10h는 대표적인 공여자로부터 수확된 동종이계 B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스에 대한 혈당 측정을 도시한다.

도 10i-10j는 면역 반응을 평가하는 i.m. 주사 동종이계 이식 연구 결과를 제공한다. WT 인간 1차 섬 세포, B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포, 및 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포(도 10i)가 이식된 당뇨병 마우스에 대해 인터페론 감마(IFN γ) 수준이 제공된다. WT 인간 1차 섬 세포, B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포, 및 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포(도 10j)가 이식된 당뇨병 마우스에 대해 공여자-특이적 항체(DSA) IgG 수준이 제공된다.

도 11a-11c는 대표적인 공여자로부터 수확된 동종이계 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포(도 11a), WT 인간 1차 섬 세포(도 11b), 및 B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포(도 11c)가 이식된 당뇨병 마우스에 대한 c-단백질 측정을 도시한다.

다.

도 12a는 이식된 WT 1차 인간 섬 세포, 이식된 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포, 및 심어진 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 1차 인간 섬 세포의 시험관 내 비장세포-매개 세포 사멸 결과를 제공한다.

도 12b는 이식된 WT 1차 인간 섬 세포, 이식된 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포, 및 이식된 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 1차 인간 섬 세포의 시험관 내 보체 의존적 세포독성(CDC) 검정 결과를 제공한다.

도 13a-13d는 당뇨병 환자 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 사용하는 PBMC 사멸 검정 결과를 제공한다. WT 인간 1차 섬 세포(**도 13a**) 및 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 13c**)에 대해 당뇨병 PBMC의 사멸 검정 결과가 제시된다. 대조군으로서, PBMC의 부재 하에서만 WT 인간 1차 섬 세포(**도 13b**) 및 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 13d**) 표적 세포에 대해 사멸이 또한 제시된다.

도 13e-13h는 건강한 공여자 PBMC를 사용하는 PBMC 사멸 검정 결과를 제공한다. 대표적인 WT 인간 1차 섬 세포(**도 13e**) 및 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 13g**)에 대해 건강한 PBMC의 사멸 검정 결과가 제시된다. 대조군으로서, PBMC의 부재 하에서만 WT 인간 1차 섬 세포(**도 13f**) 및 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 13h**) 표적 세포에 대해 사멸이 또한 제시된다.

도 13i-13j는 죽은 세포의 유세포 분석법 분석에 의한 세포 사멸 평가를 도시한다. 당뇨병 환자 PBMC 또는 건강한 공여자 PBMC를 갖는 대표적인 공여자로부터의 WT 인간 1차 섬 세포의 시험관 내 인큐베이션 후 죽은 세포의 백분율이 **도 13i**에 제시되어 있다. 당뇨병 환자 PBMC 또는 건강한 공여자 PBMC를 갖는 대표적인 공여자로부터의 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포의 시험관 내 인큐베이션 후 죽은 세포의 백분율이 **도 13j**에 제시되어 있다.

도 14a-14f는 조작된 1차 인간 베타 섬 세포 및 조작된 1차 인간 베타 섬 세포의 시험관 내 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포 세포 매개 세포 사멸 결과를 제공한다. $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 14a**), 항-CD47 IgG1Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 14b**), 및 항-CD47 IgG4Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 14c**)에 대해 NK 세포 매개 세포 사멸이 제공된다. $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 14d**), 항-CD47 IgG1Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 14e**), 및 항-CD47 IgG4Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 14f**)에 대해 대식세포 세포 매개 세포 사멸이 또한 제공된다.

도 15a-15c는 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포, 항-CD47 IgG1Fc를 발현하는 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포, 및 항-CD47 IgG4Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포에 대해 시험관 내 그랜자임 B(**도 15a**), 퍼포린(**도 15b**), 및 반응성 산소 종(ROS)(**도 15c**) 측정을 도시한다.

도 16은 WT 인간 1차 섬 세포, $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포, 및 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포에서 CD47 발현을 보여준다.

도 17은 WT 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성), $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성), $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성), 및 항-CD47 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성)에 대해 시험관 내 대식세포의 식세포작용 결과를 제공한다.

도 18은 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포, 항-CD47 IgG1Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 1차 인간 베타 섬 세포, 및 항-CD47 IgG4Fc의 존재 하에 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 1차 인간 베타 섬 세포에 대해 시험관 내 대식세포의 식세포작용 결과를 제공한다.

도 19a-19f는 동종이계 인간 1차 섬 세포에 대한 당뇨병 NSG 마우스 면역 반응을 평가하는 동종이계 이식 연구 결과를 제공한다. 대표적인 공여자로부터의 이식된 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포(**도 19a**) 및 WT 1차 인간 섬 세포(**도 19d**)에 대한 루시페라제 발현 이미지의 BLI가 제공된다. 대표적인 공여자로부터 수확된 동종이계 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 NSG 마우스(**도 19b**) 및 동종이계 WT 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(**도 19e**)에 대해 혈당 측정이 도시된다. 대표적인 공여자로부터 수확된 동종이계 $B2M^{-/-}$; $CD47^{tg}$ 인

간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 NSG 마우스(도 19c) 및 동종이계 WT 인간 1차 섬 세포가 이식된 당뇨병 마우스(도 19f)에 대해 C-단백질 측정이 또한 제공된다.

도 20a-20d는 국소로 투여된 항-CD47 및 이소형 대조군의 존재 하에 동종이계 인간 1차 섬 세포에 대한 당뇨병 인간화 마우스 면역 반응, 또는 이의 결핍을 평가하는 동종이계 이식 연구 결과를 제공한다. 대표적인 공여자로부터의 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 인간 1차 섬 세포가 이식되고, 이식 후 8일차에 국소로 이소형 대조군 항체(도 20a) 또는 국소로 항-CD47(도 20c)을 추가로 투여받은 당뇨병 인간화 마우스에 대한 루시페라제 발현 이미지의 BLI가 제공된다. 대표적인 공여자로부터의 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 인간 1차 섬 세포가 이식되고, 이식 후 8일차에 국소로 이소형 대조군 항체(도 20b) 또는 국소로 항-CD47(도 20d)을 추가로 투여받은 당뇨병 인간화 마우스에 대해 혈당 측정이 도시된다.

도 21a-21d는 전신으로 투여된 항-CD47 또는 이소형 대조군의 존재 하에 동종이계 인간 1차 섬 세포에 대한 당뇨병 인간화 마우스 면역 반응, 또는 이의 결핍을 평가하는 동종이계 이식 연구 결과를 제공한다. 대표적인 공여자로부터의 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 인간 1차 섬 세포가 이식되고, 이식 후 8일차에 전신으로 이소형 대조군 항체(도 21a) 또는 전신으로 항-CD47(도 21c)을 추가로 투여받은 당뇨병 인간화 마우스에 대해 루시페라제 발현 이미지의 BLI가 제공된다. 대표적인 공여자로부터의 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 인간 1차 섬 세포가 이식되고, 이식 후 8일차에 전신으로 이소형 대조군 항체(도 21b) 또는 전신으로 항-CD47(도 21d)을 추가로 투여받은 당뇨병 인간화 마우스에 대해 혈당 측정이 도시된다.

도 22a-22b는 동종이계 NHP 1차 섬 세포에 대한 비인간 영장류(NHP) 수용자의 면역 반응을 평가하는 동종이계 이식 연구의 연구 결과를 제공한다. 이식된 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} NHP 1차 섬 세포에 대해 루시페라제 발현의 BLI의 정량화가 제공된다(도 22a 정량화; 도 22b 상응하는 BLI 이미지).

도 23a-23d는 면역 반응을 평가하는 NHP에서 i.m. 주사 동종이계 이식 연구 결과를 제공한다. B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} NHP 1차 섬 세포가 이식된 NHP에 대해 인터페론 감마(IFNg) 수준이 제공된다(도 23a). B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} NHP 1차 섬 세포가 이식된 NHP에 대해 공여자-특이적 항체(DSA) IgM 수준(도 23b) 및 IgG 수준(도 23c)이 제공된다. 이식 전에 IgG 수준이 상승된 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} NHP 1차 섬 세포가 이식된 감염된 NHP에 대해 DSA IgG 수준이 또한 제공된다(도 23d).

도 24는 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} NHP 1차 섬 세포의 시험관 내 자연 살해(NK) 세포 매개 세포 사멸 결과를 제공한다.

도 25는 WT 인간 1차 RPE 세포(상단 패널), 이중 녹아웃(B2M^{-/-} CIITA^{-/-}) 1차 RPE 세포(중간 패널) 및 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 1차 RPE 세포(하단 패널)에 대한 MHC-I 또는 MHC-II 분자 및 CD47의 발현을 보여준다.

도 26a-26i는 WT 인간 1차 RPE 세포(상단 패널), 인간 이중 녹아웃(B2M^{-/-} CIITA^{-/-}) 1차 RPE 세포(중간 패널) 및 인간 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 1차 RPE 세포(하단 패널)의 시험관 내 자연 살해(NK) 세포 매개 세포 사멸(도 26a-26c) 및 대식세포 세포 매개 세포 사멸(도 26d-26f) 결과를 제공한다. 대조군으로서 각 세포주에 대해 표적 세포 단독 매개 세포 사멸이 제공된다(도 26g-26i).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0100]

일부 측면에서, 동종이계 세포 요법과 같은 동종이계 이식에 반응하여 면역계 반응의 효과를 완화 및/또는 회피하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 세포 요법의 면역 거부 문제를 극복하기 위해, 임의의 이식가능한 세포 유형에 대한 생존가능한 공급원을 나타내는, 면역계를 회피하는 능력을 갖는 조작된 세포(여기서 조작된 면역-회피 세포 또는 조작된 저면역원성 세포로도 언급됨), 또는 이의 집단, 또는 이의 약제학적 조성물이 본원에 개시된다. 본원에 제공된 조작된 세포의 측면에서, 수용자 대상체의 면역계에 의한 세포 거부가 감소되고 조작된 세포는 대상체의 유전적 구성, 또는 하나 이상의 이전 동종이계 이식, 이전 자가조직 키메라 항원 수용체(CAR) T 거부, 및/또는 이식유전자가 발현되는 다른 자가조직 또는 동종이계 요법에 대한 대상체 내의 임의의 기존 반응과 관계 없이, 그들의 투여 후 숙주에서 정착하고(engraft) 기능할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 조작된 세포는 조작된 면역-회피 세포를 지칭한다. 본원에 기재된 조작된 세포는 섬 세포, 베타 섬

세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 혈장 세포 또는 혈소판)를 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 세포로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 1차 세포는 조작된 세포(예를 들어, 생검과 같이 살아있는 조직으로부터 직접 취한 세포)이다.

[0101] 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 세포는 비변경 또는 비변형된 야생형 세포에 비해 하나 이상의 표적의 감소되거나 증가된 발현을 갖도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 비변경 또는 비변형된 야생형 세포에 비해 하나 이상의 표적의 구성적으로 감소되거나 증가된 발현을 갖도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 비변경 또는 비변형된 야생형 세포에 비해 하나 이상의 표적의 조절가능한 감소되거나 증가된 발현을 갖도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 동일한 세포 유형의 야생형 세포 또는 대조군 세포에 비해 CD47의 증가된 발현을 포함한다. 세포의 맥락에서 "야생형" 또는 "wt" 또는 "대조군"이란 자연에서 발견되는 임의의 세포를 의미한다. 야생형 또는 대조군 세포의 예는 자연에서 발견되는 1차 채장 섬 세포와 같은 1차 세포를 포함한다. 그러나, 예로서, 본원에 사용된 바와 같은 조작된 세포의 맥락에서, "야생형" 또는 "대조군"은 또한 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현을 초래하는 핵산 변화를 함유할 수 있는 조작된 세포를 의미할 수 있지만, CD47 단백질의 과발현을 초래하는 유전자 편집 절차를 거치지 않았다. 일부 구현예에서, 야생형 세포 또는 대조군 세포는 출발 물질이다. 일부 구현예에서, 1차 세포주 출발 물질은 본원에서 고려된 바와 같은 야생형 또는 대조군 세포로 간주되는 출발 물질이다. 일부 구현예에서, 출발 물질은 조작된 세포를 생성하기 위해 하나 이상의 유전자의 변형된 발현을 갖도록 달리 변형되거나 조작된다. 일부 구현예에서, 야생형 세포 또는 대조군 세포는 공여자로부터의 세포 형태의 출발 물질이다. 특정 구현예에서, 야생형 세포 또는 대조군 세포는 살아있는 대상체 또는 사망한 대상체로부터의 장기 또는 세포 기증에 의해 획득되는 세포, 예를 들어 사체 채장 세포 또는 신장 세포일 수 있는 출발 물질이다.

[0102] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 기술은 섬 세포에 적용된다.

[0103] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 기술은 1차 채장 섬으로부터 단리되었는지, 1차 채장 섬 내의 1차 채장 베타 섬 세포로부터 유래되었는지, 또는 1차 채장 섬의 구성요소인지 관계없이, 1차 채장 베타 섬 세포에 적용된다. 예를 들어, 1차 채장 베타 섬 세포는 단일 베타 섬 세포, 베타 섬 세포 집단, 또는 1차 채장 섬의 구성요소(예를 들어, 다른 세포 유형과 함께 1차 채장 섬 내에 존재하는 1차 채장 베타 섬 세포)로서 편집될 수 있다. 또 다른 예로서, 1차 채장 베타 섬 세포는 단일 베타 섬 세포, 베타 섬 세포 집단, 또는 1차 채장 섬의 구성요소(예를 들어, 다른 세포 유형과 함께 1차 채장 섬 내에 존재하는 1차 채장 베타 섬 세포)로서 환자에게 투여될 수 있다. 채장 베타 섬 세포가 다른 세포 유형과 함께 채장 섬 내에 존재하는 구현예에서, 다른 세포 유형은 또한 본원에 기재된 방법에 의해 편집될 수 있다.

[0104] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 기술은 또한 유전자 조작과 같은 조작 전 또는 후에 1차 섬으로부터 해리된 1차 채장 섬 세포에 적용된다. 이러한 해리된 섬 세포는 환자에게 투여하기 전에 클러스터링될 수 있고 클러스터는 베타 섬 세포를 포함하는 섬 세포, 뿐만 아니라 1차 섬으로부터의 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 세포 유형을 포함할 수 있다. 클러스터 내 섬 세포의 수는 약 50개, 약 100개, 약 250개, 약 500개, 약 750개, 약 1000개, 약 1250개, 약 1500개, 약 1750개, 약 2000개, 약 2250개, 약 2500개, 약 2750개, 약 3000개, 약 3500개, 약 4000개, 약 4500개, 또는 약 5000개 세포와 같이 달라질 수 있다. 환자에게 약 10개, 약 20개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 75개, 약 100개, 약 125개, 약 150개, 약 200개, 약 250개, 약 300개, 약 325개, 약 350개, 약 375개, 약 400개, 약 425개, 약 450개, 약 475개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 또는 약 1000개 클러스터가 투여될 수 있다.

[0105] 본원에 제공된 조작된 1차 세포는 하나 이상의 관용원성 인자(예를 들어, CD47)의 변경된 발현(예를 들어, 과발현 또는 증가된 발현), 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 변경된 발현(예를 들어, 감소된 또는 제거된 발현)을 초래하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에 존재하는 변형은 더 많은 관용원성 인자 중 하나의 변경된(예를 들어 증가된 또는 과발현된) 세포 표면 발현, 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 변경된(예를 들어 감소된 또는 제거된) 세포 표면 발현, 예컨대 세포 표면 상의 하나 이상의 관용원성 인자의 증가 또는 과발현 및 세포 표면 상의 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현, 일부 경우에 제거된 발현을 제공한다. 제공된 측면에서, 변경된 발현은 변형을 함유하지 않는 유사한 세포, 예컨대 동일한 세포 유형의 야생형 또는 비변형된 세포 또는 달리 동일하지만 하나 이상의 관용원성 인자 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 변경하기 위해 본원의 변형이 결여된 세포에 상대적이다. 발현을 변경하기 위해 세포에 변형을 도입하는 예시적인 방법이 본원에 기재되

어 있다. 예를 들면, 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드(즉 이식유전자)의 도입 또는 전달 또는 DNA-표적화 도메인 및 유전자를 표적화하는 전사 활성인자의 융합 단백질 전달의 도입에 의해서와 같이 유전자 또는 단백질의 발현을 과발현하거나 증가시키기 위한 임의의 다양한 방법이 사용될 수 있다. 또한 억제 핵산(예를 들어 RNAi)의 도입 또는 전달에 의해서와 같은 비유전자 편집 방법 또는 표적화된 뉴클레아제 시스템(예를 들어 CRISPR/Cas)의 도입 또는 전달을 수반하는 유전자 편집 방법을 포함하는 유전자 또는 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 임의의 다양한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 방법은 뉴클레아제-기반 유전자 편집 기술을 통해 이루어진다.

[0106] 일부 구현예에서, 희귀-절단 엔도뉴클레아제(예를 들어, CRISPR/Cas, TALEN, 징크 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 및 호밍(homing) 엔도뉴클레아제 시스템)를 활용하는 게놈 편집 기술은 인간 세포에서 (예를 들어, 중요한 면역 유전자의 게놈 DNA를 결실시킴으로써) 면역 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 게놈 편집 기술은 니카제 사용, 염기 편집, 프라임 편집, 및 유전자 기록(gene writing)을 포함한다. 특정 구현예에서, 게놈 편집 기술 또는 다른 유전자 조절 기술은 인간 세포, (예를 들어, CD47)에 관용-유도성(관용원성) 인자를 삽입하여, 수용자 대상체에 생착 시 면역 인식을 회피할 수 있는 조작된 세포를 생성하는 데 사용된다. 따라서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자에 영향을 미치는 하나 이상의 유전자 및 인자의 조절된 발현(예를 들어, 감소된 또는 제거된 발현), 및 CD47과 같은 관용원성 인자의 조절된 발현(예를 들어, 증가된 발현 또는 과발현)을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 수용자 대상체의 면역계를 회피한다.

[0107] 일부 측면에서, 본원에 제공된 조작된 세포는 선천성 면역 세포 거부 또는 적응성 면역 세포 거부(예를 들어, 저면역원성 세포)를 겪지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 세포는 NK 세포-매개 용해 및 대식세포 탐식(engulfment)에 민감하지 않다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 면역억제제가 거의 또는 전혀 필요하지 않은 수용자 대상체에 이식되는 보편적으로 호환가능한 세포 또는 조직(예를 들어, 보편적 공여자 세포 또는 조직)의 공급원으로서 유용하다. 이러한 저면역원성 세포는 이식 시 세포-특이적 특성 및 특징을 유지한다.

[0108] 본 개시내용은 적어도 부분적으로 조작된 세포 상의 하나 이상의 세포 표면 항원에 대한 기존 항체(및/ 또는 조작된 세포가 투여된 개체에서 조작된 세포의 순환 수명 동안 발생하는 항체)를 갖는 개체에게 투여하기에 유용한 세포의 조작에 관한 발명자의 발견 및 독특한 관점에 기반한다. 이러한 조작은 조작된 세포에 대해 개체에서 면역 반응을 촉발하는 것을 피하는 데 도움이 된다. 더욱이, 이러한 발견은 환자 및/또는 치료 선택과 같은 본원에 제공된 추가적인 개시내용을 뒷받침한다.

[0109] 본원에 제공된 조작된 세포는 관용원성 인자의 과발현을 추가로 활용하고 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자(MHC 클래스 I 분자), 또는 이의 구성요소, 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(MHC 클래스 II 분자)의 감소된 발현의 발현(예를 들어, 표면 발현)을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)한다. 일부 구현예에서, 희귀-절단 엔도뉴클레아제(예를 들어, CRISPR/Cas, TALEN, 징크 핑거 뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 및 호밍 엔도뉴클레아제 시스템)를 활용하는 게놈 편집 기술은 인간 세포에서 (예를 들어, 중요한 면역 유전자의 게놈 DNA를 결실시킴으로써) 면역 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 게놈 편집 기술 또는 다른 유전자 조절 기술은 인간 세포, (예를 들어, CD47)에 관용-유도성(관용원성) 인자를 삽입하여, 수용자 대상체에 생착 시 면역 인식을 회피할 수 있는 조작된 세포를 생성하는 데 사용된다. 따라서, 본원에 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자에 영향을 미치고, 수용자 대상체의 면역계를 회피하는 하나 이상의 유전자 및 인자의 조절된 발현을 나타낸다. 일부 경우에, 세포는 T 세포이고 세포는 또한 내인성 TCR을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)하도록 조작된다.

[0110] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 면역 인식을 회피할 수 있게 하는 특징을 나타낸다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 저면역원성이다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 조작된 세포는 선천성 면역 세포 거부를 겪지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 세포는 NK 세포-매개 용해 및 대식세포 탐식에 민감하지 않다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 면역억제제가 거의 또는 전혀 필요하지 않은 수용자 대상체에 이식되는 보편적으로 호환가능한 세포 또는 조직(예를 들어, 보편적 공여자 세포 또는 조직)의 공급원으로서 유용하다. 이러한 저면역원성 세포는 이식 시 세포-특이적 특성 및 특징을 유지한다.

[0111] 일부 측면에서 (i) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포가 본원에 제공되며, 여기서 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한

세포 유형의 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나는 CD47이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 b-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II의 발현을 감소시키는 변형은 CIITA의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 혈장 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다.

[0112] 일부 측면에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포를 생성하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 a. 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계; 및, b. 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나는 CD47이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 b-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 CIITA의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 및/또는 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 혈장 세포 또는 혈소판)으로부터 선택된다.

[0113] 일부 측면에서, 본원에 기재된 조작된 1차 세포와 같은 복수의 임의의 조작된 세포를 포함하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 집단이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 비변경 또는 비변형된 야생형 세포에 비해 B2M 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조작된 세포 집단의 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조작된 1차 세포 집단의 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단은 조작된 1차 섬 세포, 조작된 1차 베타 섬 세포, 조작된 1차 T 세포, 조작된 1차 갑상선 세포, 조작된 1차 피부 세포, 조작된 1차 내피 세포, 및 조작된 1차 망막 색소 상피 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 조작된 1차 세포 집단을 포함한다.

[0114] 또한 MHC-불일치 동종이계 수용자에서 면역 거부를 회피하는 조작된 세포(예를 들어, 조작된 1차 세포)를 투여하는 것을 포함하는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 하나로부터 생성된 조작된 세포는 MHC-불일치 동종이계 수용자에게 반복적으로 투여(예를 들어, 이식 또는 생착)될 때 면역 거부를 회피한다.

[0115] 일부 측면에서, 유효량의 본원에 기재된 조작된 1차 세포와 같은 임의의 조작된 세포 집단의 집단을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환, 병태, 또는 세포 결핍증의 치료를 필요로 하는 환자에서 질환, 병태, 또는 세포 결핍증을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 유효량의 본원에 기재된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포의 임의의 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환, 병태, 또는 세포 결핍증의 치료를 필요로 하는 환자에서 질환, 병태, 또는 세포 결핍증을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 유효량의 본원에 기재된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포의 임의의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환, 병태, 또는 세포 결핍증의 치료를 필요로 하는 환자에서 질환, 병태, 또는 세포 결핍증을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0116] 특정 구현예의 실시는 달리 구체적으로 반대로 나타내지 않는 한, 관련 기술 내에 있는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 유전학, 면역학, 및 세포 생물학의 통상적인 방법을 이용할 것이며, 그 중 많은 것이 예시의 목적을 위해 아래에 기재되어 있다. 이러한 기술은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들어, Sambrook, 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(3rd Edition, 2001); Sambrook, 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Edition, 1989); Maniatis 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(1982); Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons, 2008년 7월 업데이트); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II(IRL Press, Oxford, 1985); 및, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation(B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984);

Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning(1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); Annual Review of Immunology; 뿐만 아니라 Advances in Immunology와 같은 저널의 논문을 참조한다.

[0117] 본 출원에서 언급되는 특허 문서, 과학 기사 및 데이터베이스를 포함하는 모든 간행물은 각각의 개별 간행물이 개별적으로 참조로 포함되는 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허 출원, 공개 출원 및 다른 간행물에 제시된 정의와 반대되거나 달리 일치하지 않는 경우, 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.

[0118] 본원에 사용되는 섹션 제목은 구조적 목적만을 위한 것이며 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 당업자는 여러 구현예가 본 개시내용의 범위 및 취지 내에서 가능함을 인식할 것이다. 하기 설명은 개시내용을 예시하며, 물론, 어떤 식으로든 본원에 기재된 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0119] **I. 정의**

[0120] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 기술적 및 과학적 용어 또는 전문용어는 청구된 주제가 속하는 기술 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 통상적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에 정의되며, 본원에서 이러한 정의를 포함하는 것은 반드시 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0121] 양 또는 농도 등과 같은 측정가능한 값을 언급할 때 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 명시된 양의 20%, 10%, 5%, 1%, 0.5%, 또는 심지어 0.1%의 편차를 포함하는 것을 의미한다.

[0122] 첨부된 청구범위를 포함하여 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 달리 문맥상 명백하게 지시되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, "하나의" 또는 "하나"는 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다. 본원에 기재된 측면 및 변이는 이러한 측면 및 변이로 "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진" 구현예를 포함하는 것으로 이해된다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 연관된 나열된 항목 중 하나 이상의 임의의 및 모든 조합을 포함한다.

[0124] 본원에 사용된 바와 같이, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 관련하여 용어 "외인성"은 참조된 분자가 관심 세포 내로 도입됨을 의미하는 것으로 의도된다. 외인성 폴리뉴클레오티드와 같은 외인성 분자는 예를 들어, 염색체 내로의 통합에 의해 또는 플라스미드 또는 발현 벡터와 같은 비염색체 유전 물질로서와 같이 세포의 유전 물질에 외인성 암호화 핵산을 도입함으로써 도입될 수 있다. 따라서, 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용되는 용어는 발현가능한 형태의 암호화 핵산을 세포 내로 도입하는 것을 지칭한다. 일부 경우에, "외인성" 분자는 정상적으로 세포에 존재하지 않지만, 하나 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있는 분자, 작제물, 인자 등이다.

[0125] 용어 "내인성"은 천연 또는 비변형된 세포에 존재하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어 유전자)와 같은 참조 분자를 지칭한다. 예를 들면, 내인성 유전자의 발현과 관련하여 사용될 때 용어는 세포 내에 함유되고 외인성으로 도입되지 않은 내인성 핵산에 의해 암호화된 유전자의 발현을 지칭한다.

[0126] "유전자"는 유전자 산물을 암호화하는 DNA 영역, 뿐만 아니라 이러한 조절 서열이 코딩 및/또는 전사된 서열에 인접하든 아니든 유전자 산물의 생성을 조절하는 모든 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는 프로모터 서열, 종결자, 번역 조절 서열 예컨대 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위, 인핸서, 사일런서, 절연체, 경계 요소, 복제 기원, 매트릭스 부착 부위 및 유전자좌 제어 영역을 포함하나 반드시 이에 제한되지 않는다. 유전자의 서열은 전형적으로 세포 내 염색체 상의 고정된 염색체 위치 또는 유전자좌에 존재한다.

[0127] 용어 "유전자좌"는 특정 유전자 또는 유전자 마커가 위치하는 염색체 상의 고정된 위치를 지칭한다. "표적 유전자좌"에 대한 언급은 외인성 폴리뉴클레오티드의 유전자 편집 또는 통합과 같은 유전자 변형을 표적화하는 것이 바람직한 원하는 유전자의 특정 유전자좌를 지칭한다.

[0128] 유전자와 관련하여 용어 "발현" 또는 "유전자 발현"은 유전자에 함유된 정보를 유전자 산물로 전환하는 것을 지칭한다. 유전자 산물은 유전자의 직접적인 전사 산물(예를 들어, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA 또는 임의의 다른 유형의 RNA)일 수 있거나 mRNA의 번역에 의해 생성된 단백질일 수 있다. 유전자

산물은 또한 캡핑(capping), 폴리아데닐화, 메틸화, 및 편집과 같은 과정에 의해 변형된 RNA, 및 예를 들어, 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스토일화, 및 글리코실화에 의해 변형된 단백질을 포함한다. 따라서, 발현 또는 유전자 발현에 대한 언급은 단백질(또는 폴리펩티드) 발현 또는 mRNA와 같은 유전자의 전사가 가능한 산물의 발현을 포함한다. 단백질 발현은 단백질의 세포내 발현 또는 표면 발현을 포함할 수 있다. 전형적으로, mRNA 또는 단백질과 같은 유전자 산물의 발현은 세포에서 검출가능한 수준이다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같이, "검출가능한" 발현 수준은 당업자에게 알려진 표준 기술에 의해 검출가능한 수준을 의미하며, 예를 들어, 차등 디스플레이, RT(역전사효소)-결합 중합효소 연쇄 반응(PCR), 노던 블롯(Northern Blot), 및/또는 RNase 보호 분석 뿐만 아니라 유세포 분석법, ELISA, 또는 웨스턴 블롯(western blot)과 같은 단백질 검출을 위한 면역친화성 기반 방법을 포함한다. 발현 수준 정도는 표준 특성화 기술을 통해 시각화되거나 측정되기에 충분할 정도로만 클 필요가 있다.

[0130] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "증가된 발현", "향상된 발현" 또는 "과발현"은 특정 유전자 발현을 조절하기 위한 변형을 함유하지 않는 원래 또는 공급원 세포에서의 발현에 추가되는 임의의 형태의 발현, 예를 들면 야생형 발현 수준(이는 발현이 없거나 측정불가능한 발현일 수도 있음)을 의미한다. 본원에서 "증가된 발현," "향상된 발현" 또는 "과발현"에 대한 언급은 변형을 도입하기 위한 조작 전에 비변형된 세포 또는 야생형 세포와 같은 원래 공급원 세포와 같은 변형을 함유하지 않는 세포에서의 수준에 비해 유전자 발현의 증가 및/또는, 폴리펩티드를 언급하는 한, 증가된 폴리펩티드 수준 및/또는 증가된 폴리펩티드 활성을 의미하는 것으로 간주된다. 발현, 폴리펩티드 수준 또는 폴리펩티드 활성에서의 증가는 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 100% 또는 심지어 그 이상일 수 있다. 일부 경우에, 발현, 폴리펩티드 수준 또는 폴리펩티드 활성에서의 증가는 적어도 2-배, 5-배, 10-배, 20-배, 30-배, 40-배, 50-배, 60-배, 70-배, 80-배, 90-배, 100-배, 200-배 또는 그 이상일 수 있다.

[0131] 용어 "저면역원성"은 세포가 이식된 대상체에 의해 면역 거부 경향이 적은 세포를 지칭한다. 예를 들어, 동일한 세포 유형이지만 비변경 또는 비변형된 야생형 세포와 같은 변형을 함유하지 않는 유사한 세포에 비해, 이러한 저면역원성 세포는 세포가 이식된 대상체에 의해 면역 거부 경향이 약 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 또는 그 이상 적을 수 있다. 전형적으로, 저면역원성 세포는 대상체와 동종이계이고 저면역원성 세포는 MHC-불일치 동종이계 수용자에서 면역 거부를 회피한다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 T 세포-매개 적응성 면역 거부 및/또는 선천성 면역 세포 거부로부터 보호된다.

[0132] 세포의 저면역원성은 적응성 및 선천성 면역 반응을 도출하는 세포의 능력과 같은 세포의 면역원성을 평가함으로써 결정될 수 있다. 이러한 면역 반응은 당업자에 의해 인식된 검정을 사용하여 측정될 수 있다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "관용원성 인자"는 투여, 이식, 또는 생착 시 숙주 또는 수용자 대상체의 면역계에 의해 인식될 세포의 능력을 조절하거나 영향을 미치는 면역억제 인자 또는 면역 조절 인자를 포함한다. 전형적으로 관용원성 인자는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에 대한 면역학적 관용을 유도하여, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포가 수용자의 숙주 면역계에 의해 표적화, 예컨대 거부되지 않도록 하는 인자이다. 따라서, 관용원성 인자는 저면역 인자일 수 있다. 관용원성 인자의 예는 면역 세포 억제 수용체(예를 들어 CD47), 면역 세포 억제 수용체에 결합하는 단백질, 체크포인트 억제제 및 선천성 또는 적응성 면역 인식을 감소시키는 다른 분자를 포함한다

[0134] 용어 "감소시키다," "감소된," "감소," 및 "감소시키다"는 모두 일반적으로 통계적으로 유의한 양만큼 감소를 의미하기 위해 본원에서 사용된다. 그러나, 의심의 여지를 피하기 위해, "감소시키다," "감소된" "감소," "감소시키다"는 참조 수준과 비교하여 적어도 10% 감소, 예를 들어 참조 수준과 비교하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 최대 감소를 의미하고 100% 감소(즉 참조 샘플과 비교하여 수준 없음), 또는 10-100% 사이의 임의의 감소를 포함한다.

[0135] 용어 "증가된," "증가시키다" 또는 "향상시키다" 또는 "활성화시키다"는 모두 일반적으로 통계적으로 유의한 양만큼 증가를 의미하기 위해 본원에서 사용되며; 의심의 여지를 피하기 위해, 용어 "증가된," "증가시키다" 또는 "향상시키다" 또는 "활성화시키다"는 참조 수준과 비교하여 적어도 10% 증가, 예를 들어 참조 수준과 비교하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 최대 증가를 의미하고 100% 증가 또는 10-100% 사이의 임의의 증가, 또는 참조 수준과 비교하여 적어도 약 2-배, 또는 적어도 약 3-배, 또는 적어도 약 4-배, 또는 적어도 약 5-배 또는 적어도 약 10-배 증가, 또는 2-배 내지 10-배 사이 또는 그 이상의 임의의 증

가를 포함한다.

- [0136] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변형"은 세포에서 유전자 발현에 영향을 미치는 세포에서의 임의의 변화 또는 변경을 지칭한다. 일부 구현예에서, 변형은 유전자 편집, 돌연변이생성 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자의 유전자 조작에 의해서와 같이 세포에서 단백질 산물을 암호화하는 유전자 또는 이의 조절 요소를 직접적으로 변화시키는 유전자 변형이다.
- [0137] 본원에 사용된 바와 같이, "indel"은 게놈에서 뉴클레오티드 염기의 삽입, 결실, 또는 이의 조합을 초래하는 돌연변이를 지칭한다. 따라서, indel은 전형적으로 서열로부터 뉴클레오티드를 삽입하거나 결실시킨다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 게놈 서열의 코딩 영역에서의 indel은 indel 길이가 3의 배수가 아닌 한 프레임시프트 돌연변이를 초래할 것이다. 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템은 표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 임의의 길이의 indel을 유도하는 데 사용될 수 있다.
- [0138] 일부 구현예에서, 변경은 점 돌연변이이다. 본원에 사용된 바와 같이, "점 돌연변이"는 뉴클레오티드 중 하나를 대체하는 치환을 지칭한다. 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템은 표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 임의의 길이의 indel 또는 점 돌연변이를 유도하는 데 사용될 수 있다.
- [0139] 본원에 사용된 바와 같이, "녹아웃(knock out)"은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 기능을 방해하는 방식으로 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부를 결실시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 녹아웃은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 기능적 도메인(예를 들어, DNA 결합 도메인)의 표적 폴리뉴클레오티드 서열에서 indel을 유도하여 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 당업자는 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 본원에 기재된 세부사항에 기반하여 표적 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부를 녹아웃시키는 방법을 용이하게 이해할 것이다.
- [0140] 일부 구현예에서, 변경은 표적 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부의 녹아웃을 초래한다. 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 일부를 녹아웃시키는 것은 다양한 적용에 유용할 수 있다. 예를 들어, 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 녹아웃시키는 것은 연구 목적을 위해 시험관 내에서 수행될 수 있다. 생체 외 목적을 위해, 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 녹아웃시키는 것은 (예를 들어, 생체 외에서 세포 내 돌연변이체 대립유전자를 녹아웃시키고 녹아웃된 돌연변이체 대립유전자를 포함하는 세포를 대상체에 도입함으로써) 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 발현과 연관된 장애를 치료하거나 예방하는 데 유용할 수 있다.
- [0141] 본원에서 "녹인(knock in)"이란 숙주 세포에 유전자 기능을 첨가하는 과정을 의미한다. 이것은 녹인된 유전자 산물, 예를 들어, RNA 또는 암호화된 단백질 수준 증가를 유발한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이것은 숙주 세포에 유전자의 하나 이상의 추가 카피를 첨가하거나 단백질의 발현을 증가시키는 내인성 유전자의 조절 구성요소를 변경하는 것을 포함하는 여러 방식으로 달성될 수 있다. 이것은 프로모터를 변형시키거나, 상이한 프로모터를 첨가하거나, 인핸서를 첨가하거나, 다른 유전자 발현 서열을 변형시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0142] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변경 또는 변형은 표적 또는 선택된 폴리뉴클레오티드 서열의 감소된 발현을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변경 또는 변형은 표적 또는 선택된 폴리펩티드 서열의 감소된 발현을 초래한다.
- [0143] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변경 또는 변형은 표적 또는 선택된 폴리뉴클레오티드 서열의 증가된 발현을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변경 또는 변형은 표적 또는 선택된 폴리펩티드 서열의 증가된 발현을 초래한다.
- [0144] 유전자 발현의 "조절"은 유전자 발현 수준의 변화를 지칭한다. 발현의 조절은 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 조절은 또한 완전할 수 있으며, 즉, 여기서 유전자 발현이 완전히 불활성화되거나 야생형 수준 이상으로 활성화되거나; 부분적일 수 있으며, 즉 유전자 발현이 부분적으로 감소되거나, 야생형 수준의 일부 분율로 부분적으로 활성화된다.
- [0145] 용어 "작동적으로 연결된" 또는 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 구성요소(예컨대 서열 요소)의 병치와 관련하여 상호교환가능하게 사용되며, 여기서 구성요소는 두 구성요소가 정상적으로 기능하고 구성요소 중 적어도 하나가 다른 구성요소 중 적어도 하나에 영향력을 가하는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 허용하도록 배열된다. 예시로서, 프로모터와 같은 전사 조절 서열은 전사 조절 서열이 하나 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하여 코딩 서열의 전사 수준을 제어하는 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 전사 조절 서열은 일반적으로 코딩 서열과 시스(cis)로 작동적으로 연결되지만, 이에 직접 인접할 필요는 없다. 예를 들어,

인헨서는 인접하지 않더라도 코딩 서열에 작동적으로 연결된 전사 조절 서열이다.

[0146] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 아미노산 잔기 (즉 아미노산 잔기의 중합체)를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용될 수 있으며, 최소 길이에 제한되지 않는다. 이러한 중합체는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기, 또는 이의 조합을 함유할 수 있고, 아미노산 잔기의 펩티드, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 이량체, 삼량체, 및 다량체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 단백질 또는 폴리펩티드는 변형된 아미노산(예를 들어, 인산화, 당화, 글리코실화 등) 및 아미노산 유사체를 갖는 것들을 포함하고 포함한다. 전장 폴리펩티드 또는 단백질, 및 이의 단편은 이 정의에 포함된다. 용어는 또한 이의 변형된 종, 예를 들어, 하나 이상의 잔기의 번역후 변형, 예를 들어, 메틸화, 인산화, 글리코실화, 시알릴화, 또는 아세틸화를 포함한다.

[0147] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 청구된 주제의 다양한 측면은 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 설명은 단지 편의성 및 간결성을 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성없는 제한으로 해석되어서는 안 됨이 이해되어야 한다. 따라서, 범위의 설명은 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위 범위 뿐만 아니라 해당 범위 내의 개별 수치 값을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들면, 값의 범위가 제공되는 경우, 각 중간 값은 문맥상 달리 명백하게 나타내지 않는 한 해당 범위의 상한과 하한 및 임의의 다른 언급된 범위 또는 해당 언급된 범위의 중간 값 사이에 하한 단위의 10분의 1까지 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 제한에 따라 본 개시내용 내에 포함됨이 이해되어야 한다. 언급된 범위가 제한 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 제한 중 어느 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위가 또한 본 개시내용에 포함된다. 일부 구현예에서, 2개의 반대 및 제한 없는 (open ended) 범위가 특징에 대해 제공되며, 이러한 설명에서 2개 범위의 조합이 본원에 제공되는 것으로 구상된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 특징은 약 10 단위보다 더 큰 것으로 설명되고, (또 다른 문장에서와 같이) 특징은 약 20 단위보다 적은 것으로 설명되므로, 약 10 단위 내지 약 20 단위의 범위가 본원에 기재된다.

[0148] 본원에 사용된 바와 같이, 상호교환가능하게 사용되는 용어인 "대상체" 또는 "개체"는 포유동물이다. 일부 구현예에서, "포유동물"은 인간, 비인간 영장류, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 게르빌루스쥐, 마우스, 흰족제비, 래트, 고양이, 원숭이 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체 또는 개체는 인간이다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환, 장애 또는 병태가 있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 환자이다.

[0149] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는" 및 "치료"는 유효량의 본원에 기재된 세포를 대상체에게 투여하여 대상체가 질환의 적어도 하나의 증상의 감소 또는 질환의 개선, 예를 들어, 유익하거나 원하는 임상 결과를 갖도록 하는 것을 포함한다. 이 기술의 목적을 위해, 유익하거나 원하는 임상 결과는 하나 이상의 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 검출가능하든 검출가능하지 않든 관해(부분적이든 전체적이든)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 치료하는 것은 치료를 받지 않은 경우 예상된 생존과 비교하여 생존을 연장하는 것을 지칭할 수 있다. 따라서, 당업자는 치료가 질환 상태를 개선할 수 있지만, 질환에 대한 완전한 치유가 될 수 없다는 것을 알고 있다. 일부 구현예에서, 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상은 질환의 치료 시 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 완화된다.

[0150] 이 기술의 목적을 위해, 질환 치료의 유익하거나 원하는 임상 결과는 하나 이상의 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 안정화된(즉, 악화되지 않은) 질환 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 검출가능하든 검출가능하지 않든 관해(부분적이든 전체적이든)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0151] "벡터" 또는 "작제물"은 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 작제물," "발현 벡터," 및 "유전자 전달 벡터"는 관심 유전자의 발현을 지시할 수 있고 유전자 서열을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 핵산 작제물을 의미한다. 따라서, 용어는 클로닝, 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 통합 벡터를 포함한다. 벡터 또는 작제물을 세포 내로 도입하는 방법은 당업자에게 알려져 있고 지질 매개 전달(즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함하는 리포솜), 전기천공법, 직접 주사, 세포 융합, 입자 충격, 칼슘 포스페이트 공침전, DEAE-텍스트란 매개 전달 및 바이러스 벡터 매개 전달을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0152] **II. 조작된 세포 및 세포를 조작하는 방법**

[0153] 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 것과 같이 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포가 본원에 제공된다.

[0154] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 제공된 조작된 세포는 또한 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 조절(예를 들어, 증가)하기 위한 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현 조절(예를 들어, 증가된 발현), 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현 조절(예를 들어, 감소된 또는 제거된 발현)은 변형(들)을 포함하지 않는 세포에서 상기 분자(들)의 발현 양에 상대적이다. 일부 구현예에서, 발현 조절은 야생형 세포에서 상기 분자(들)의 발현 양에 상대적이다. 일부 구현예에서, 비변형 또는 야생형 세포는 제공된 조작된 1차 세포와 동일한 세포 유형의 세포이다. 일부 구현예에서, 비변형된 세포 또는 야생형 세포는 관용원성 인자, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 발현한다. 일부 구현예에서, 비변형된 세포 또는 야생형 세포는 하나 이상의 관용원성 인자, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 발현하지 않는다. 비변형된 세포 또는 야생형 세포를 발현하지 않는 일부 구현예에서 관용원성 인자는 조작된 1차 세포를 생성하는 데 사용되며, 제공된 조작된 1차 세포는 하나 이상의 관용원성 인자를 과발현하거나 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 0%로부터 증가시키는 변형을 포함한다. 조작 이전의 세포가 검출가능한 양의 관용원성 인자를 발현하지 않는 경우, 관용원성 인자의 임의의 검출가능한 양의 발현을 초래하는 변형은 변형을 함유하지 않는 유사한 세포와 비교하여 발현의 증가인 것으로 이해된다.

[0155] 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현 조절(예를 들어, 증가된 발현), 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현 조절(예를 들어, 감소된 또는 제거된 발현)은 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에서 상기 분자(들)의 발현 양에 상대적이다. 하나 이상의 관용원성 인자를 발현하지 않는 동일한 세포 유형의 세포가 조작된 1차 세포를 생성하는 데 사용되는 일부 구현예에서, 제공된 조작된 1차 세포는 하나 이상의 관용유발(tolergenic) 인자를 과발현하거나 하나 이상의 톨제닉(tolgenic) 인자의 발현을 0%로부터 증가시키는 변형을 포함한다/ 조작 이전의 세포가 관용원성 인자의 검출가능한 양을 발현하지 않는 경우, 관용원성 인자의 발현의 임의의 검출가능한 양을 초래하는 변형은 변형을 함유하지 않는 유사한 세포와 비교하여 발현의 증가인 것으로 이해된다.

[0156] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 DUX4, B2M-HLA-E, CD35, CD52, CD16, CD52, CD47, CD46, CD55, CD59, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, SERPINB9, CD35, IL-39, CD16 Fc 수용체, IL15-RF, 및 H2-M3(이의 임의의 조합 포함) 중 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200, 및 Mfge8(이의 임의의 조합 포함) 중 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형은 CD47의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형은 PD-L1의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형은 HLA-E의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형은 HLA-G의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형은 CCL21, PD-L1, FasL, Serpinb9, H2-M3(HLA-G), CD47, CD200, 및 Mfge8의 증가된 발현이거나 이를 포함한다.

[0157] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 게놈 변형과 같은 하나 이상의 변형 및 CD47의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 다시 말해서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 외인성 CD47 단백질을 포함하고 하나 이상의 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소된 또는 침묵된 표면 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 게놈 변형 및 CD47의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 경우에, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 외인성 CD47 핵산 및 단백질을 포함하고 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소된 또는 침묵된 표면 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 게놈 변형, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 게놈 변형, 및 CD47의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 외인성 CD47 단백질을 포함하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소된 또는 침묵된 표면 발현을 나타내고 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 또는 결여된 표면 발현을 나타낸다. 많은 구현예에서, 세포는 B2M^{indel/indel}, CIITA^{indel/indel}, CD47^{tg} 세포이다.

[0158] 일부 구현예에서, 기재된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 집단은 수용자 대상체에게 투여 시 감소된 수준의 면역 활성화를 도출하거나 면역 활성화를 도출하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상체에서 감

소된 수준의 전신 TH1 활성화를 도출하거나 전신 TH1 활성화를 도출하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상체에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 감소된 수준의 면역 활성화를 도출하거나 PBMC의 면역 활성화를 도출하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상체에게 투여 시 세포에 대한 감소된 수준의 공여자 특이적 IgG 항체를 도출하거나 공여자 특이적 IgG 항체를 도출하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상체에서 세포에 대한 감소된 수준의 IgM 및 IgG 항체 생성을 도출하거나 IgM 및 IgG 항체 생성을 도출하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상체에게 투여 시 세포의 감소된 수준의 세포독성 T 세포 사멸을 도출한다.

[0159] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 "자살 유전자" 또는 "자살 스위치"를 포함한다. 자살 유전자 또는 자살 스위치는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포가 대상체에게 투여된 후 그리고 이들 세포가 바람직하지 않은 방식으로 성장하고 분열해야 하는 경우와 같이, 조작된 세포(예를 들어 1차 조작된 세포)의 사망을 유발할 수 있는 "안전 스위치"로서 기능하도록 통합될 수 있다. "자살 유전자" 절제 접근법은 특이적 화합물에 의해서 활성화될 때만 세포 사멸을 초래하는 단백질을 암호화하는 유전자 전달 벡터 내 자살 유전자를 포함한다. 자살 유전자는 무독성 화합물을 매우 독성인 대사물로 선택적으로 전환하는 효소를 암호화할 수 있다. 결과는 효소를 발현하는 세포를 구체적으로 제거한다. 일부 구현예에서, 자살 유전자는 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-tk) 유전자이고 촉발인자는 간시클로비르(ganciclovir)이다. 다른 구현예에서, 자살 유전자는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 사이토신 데아미나제(EC-CD) 유전자이고 촉발인자는 5-플루오로사이토신(5-FU)이다(Barese 등, *Mol. Therap.* 20(10): 1932-1943(2012), Xu 등, *Cell Res.* 8:73-8(1998), 둘 다 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0160] 다른 구현예에서, 자살 유전자는 유도성 카스파제 단백질이다. 유도성 카스파제 단백질은 세포사멸사를 유도할 수 있는 카스파제 단백질의 적어도 일부를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 유도성 카스파제 단백질은 iCasp9이다. 이는 일련의 아미노산을 통해 인간 카스파제 9를 암호화하는 유전자에 연결된 F36V 돌연변이가 있는 인간 FK506-결합 단백질인 FKBP12의 서열을 포함한다. FKBP12-F36V는 소분자 이량체화제인 API 903에 높은 친화도로 결합한다. 따라서, 본 발명에서 iCasp9의 자살 기능은 화학적 이량체화 유도제(CID)의 투여에 의해 촉발된다. 일부 구현예에서, CID는 소분자 약물 API 903이다. 이량체화는 세포사멸사의 신속한 유도를 유발한다. (W02011146862; Stasi 등, *N. Engl. J. Med* 365; 18(2011); Tey 등, *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13:913-924(2007)를 참조하며, 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨.)

[0161] 안전 스위치 또는 자살 유전자를 포함하는 것은 수용자에 대한 세포독성 또는 다른 부정적인 결과가 생길 경우 세포의 제어된 사멸을 허용하여, 관용원성 인자를 사용하는 것들을 포함하는 세포 기반 요법의 안전성을 증가시킨다.

[0162] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 예를 들어 세포가 바람직하지 않은 방식으로 성장 및 분열하거나 숙주에 과도한 독성을 유발하는 경우 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 내로 도입되는 것과 같이 혼입되어 안전 스위치를 함유하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포의 사망 또는 세포사멸사를 유도하는 능력을 제공할 수 있다. 따라서, 안전 스위치의 사용은 생체 내에서 비정상적인 세포를 조건부로 제거하는 것을 가능하게 하고 임상에서 세포 요법의 적용에 중요한 단계일 수 있다. 안전 스위치 및 그의 용도는 예를 들어, Duzgune §, *Origins of Suicide Gene Therapy*(2019); Duzgune §(eds), *Suicide Gene Therapy. Methods in Molecular Biology*, vol. 1895(Humana Press, 뉴욕주 뉴욕 소재)(HSV-tk, 사이토신 데아미나제, 니트로리덕타제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제, 및 서양고추냉이 퍼옥시다제의 경우); Zhou and Brenner, *Exp Hematol* 44(11):1013-1019(2016)(iCaspase9의 경우); Wang 등, *Blood* 18(5):1255-1263(2001)(huEGFR의 경우); 미국 특허 출원 공개 번호 20180002397(HER1의 경우); 및 Philip 등, *Blood*124(8):1277-1287(2014)(RQR8의 경우)를 참조한다.

[0163] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 제어된 방식으로, 예를 들어, 약물 또는 전구약물의 존재 하에 또는 활성화 시 선택적 외인성 화합물에 의해 세포 사망을 유발할 수 있다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제(HSV-tk), 사이토신 데아미나제(CyD), 니트로리덕타제(NTR), 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제(PNP), 서양고추냉이 퍼옥시다제, 유도성 카스파제 9(iCasp9), 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9), CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, 및 RQR8로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0164] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 약물 또는 전구약물에 의해 활성화되는 경우, 예를 들어, 무독성 전구약물을 세포 내부의 독성 대사물로 조율함으로써 세포 사멸 능력을 갖는 생성물을 암호화하는 이식유전자일 수 있다. 이들 구현예에서, 세포 사멸은 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포를 약물 또는 전구약물과 접촉시킴으로써 활성화된다. 일부 경우에, 안전 스위치는 간시클로비르(GCV)를 GCV-트리포스페이트로 전환시켜 DNA 합성을 방해하

고 분열 세포를 사멸시키는 HSV-tk이다. 일부 경우에, 안전 스위치는 사이토신의 가수분해 탈아미노화를 우라실로 촉매함으로써 항진균 약물 5-플루오로사이토신(5-FC)을 세포독성 5-플루오로우라실(5-FU)로 전환시키는 CyD 또는 이의 변이체이다. 5-FU는 세포 효소에 의해 강력한 항-대사물(5-FdUMP, 5-FdUTP, 5-FUTP)로 추가로 전환된다. 이들 화합물은 티미딜레이트 합성효소 및 RNA 및 DNA의 생성을 억제하여, 세포 사멸을 초래한다. 일부 경우에, 안전 스위치는 전구약물 CB 1954 상에서 니트로 기의 환원을 통해 증식성 및 비증식성 세포에서 독성인 반응성 N-하이드록실아민 중간체로 작용할 수 있는 NTR 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에, 안전 스위치는 전구약물 6-메틸퓨린 데옥시리보시드 또는 플루다라빈을 증식성 및 비증식성 세포 둘 다에 대한 독성 대사물로 전환시킬 수 있는 PNP 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에, 안전 스위치는 인돌-3-아세트산(IAA)을 강력한 세포독소로 촉매하여 세포 사멸을 달성할 수 있는 서양고추냉이 피옥시다제 또는 이의 변이체이다.

[0165] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 iCasp9일 수 있다. 카스파제 9는 생리학적인 조건 하에 손상된 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C를 방출하여 활성화되는 고유한 미토콘드리아 세포자멸사 경로의 구성요소이다. 그런 다음 활성화된 카스파제 9는 카스파제 3을 활성화시키며, 이는 말단 효과기 분자를 촉발하여 세포자멸사로 이어진다. iCasp9는 켈티드 링커를 통해 절두된 카스파제 9(생리학적인 이량체화 도메인 또는 카스파제 활성화 도메인 없음)를 FK506 결합 단백질(FKBP)인 FKBP12-F36V에 융합시킴으로써 생성될 수 있다. iCasp9는 낮은 이량체 독립적인 기본 활성을 가지며 표현형, 기능, 또는 항원 특이성을 손상시키지 않고 숙주 세포(예를 들어, 인간 T 세포)에서 안정하게 발현될 수 있다. 그러나, 리미두시드(AP1903), AP20187, 및 라파마이신과 같은 화학적 이량체화 유도제(CID)의 존재 하에, iCasp9는 유도성 이량체화를 겪고 하류 카스파제 분자를 활성화시켜, iCasp9를 발현하는 세포의 세포자멸사를 초래할 수 있다. 예를 들어, PCT 출원 공개 번호 W02011/146862; Stasi 등, *N. Engl. J. Med.* 365:18(2011); Tey 등, *Biol. Blood Marrow Transplant* 13:913-924(2007)를 참조한다. 특히, 라파마이신유도성 카스파제 9 변이체는 rapaCasp9라고 불린다. Stavrou 등, *Mal. Ther.* 26(5):1266-1276(2018)을 참조한다. 따라서, iCasp9는 숙주 세포의 제어된 사멸을 달성하기 위한 안전 스위치로서 사용될 수 있다.

[0166] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 해당 단백질에 대한 특이적 항체의 투여 후 세포 고갈을 허용하는 막 발현된 단백질일 수 있다. 이 범주의 안전 스위치는 예를 들어, 이의 표면 발현을 위해 CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, 또는 RQR8을 암호화하는 하나 이상의 이식 유전자를 포함할 수 있다. 이들 단백질은 특이적 항체에 의해 표적화될 수 있는 표면 에피토프를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CCR4 항체에 의해 인식될 수 있는 CCR4를 포함한다. 적합한 항-CCR4 항체의 비제한적인 예는 모가물리주맙 및 이의 바이오시밀러를 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CD16 또는 항-CD30 항체에 의해 인식될 수 있는 CD16 또는 CD30을 포함한다. 이러한 항CD16 또는 항-CD30 항체의 비제한적인 예는 AFM13 및 이의 바이오시밀러를 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CD19 항체에 의해 인식될 수 있는 CD19를 포함한다. 이러한 항-CD19 항체의 비제한적인 예는 MOR208 및 이의 바이오시밀러를 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CD20 항체에 의해 인식될 수 있는 CD20을 포함한다. 이러한 항-CD20 항체의 비제한적인 예는 오비누투주맙, 유블리톡시맙, 오카라투주맙, 리톡시맙, 리톡시맙-R11b, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다. 따라서 안전 스위치를 발현하는 세포는 CD20-양성이고 기재된 바와 같은 항-CD20 항체의 투여를 통해 사멸에 대해 표적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-EGFR 항체에 의해 인식될 수 있는 EGFR을 포함한다. 이러한 항-EGFR 항체의 비제한적인 예는 토무조톡시맙, R05083945(GA201), 세톡시맙, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-GD2 항체에 의해 인식될 수 있는 GD2를 포함한다. 이러한 항-GD2 항체의 비제한적인 예는 Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 디니톡시맙, c.60C3-R11c, 및 이의 바이오시밀러를 포함한다.

[0167] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포의 표면 상에서 하나 이상의 관용원성 인자를 인식하는 외인성으로 투여되는 제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성으로 투여되는 제제는 관용원성 제제에 대해 지시되거나 특이적인 항체, 예를 들어 항-CD47 항체이다. 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 상의 관용원성 인자를 인식하거나 차단함으로써, 외인성으로 투여되는 항체는 관용원성 인자의 면역 억제 기능을 차단하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에 대한 면역계를 재감작화할 수 있다. 예를 들면, CD47을 과발현하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포의 경우 외인성으로 투여되는 항-CD47 항체는 대상체에게 투여되어, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 상에서 CD47의 차폐를 초래하고, 조작된 1차 세포에 대한 면역 반응을 촉발할 수 있다.

[0168] 일부 구현예에서, 방법은 유도성 자살 스위치를 포함하는 발현 벡터를 세포 내로 도입하는 것을 추가로 포함한다.

[0169] 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47이고 세포는 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함

한다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현한다.

[0170] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법은 CD47-SIRP α 차단제를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 이전에 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 세포 집단을 투여받았다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 CD47-결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-결합 도메인은 신호 조절 단백질 알파(SIRP α) 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 면역글로불린 G(IgG) Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG1 Fc 도메인은 인간 항체의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 TTI-621, TTI-622, 및 ALX148로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 TTI-621, TTI-622, 및 ALX148이다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 TTI-622이다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 ALX148이다. 일부 구현예에서, IgG Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-SIRP α 차단제는 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 MIAP410, B6H12, 및 마그롤리맵(Magrolimab)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 항체는 MIAP410이다. 일부 구현예에서, 항체는 B6H12이다. 일부 구현예에서, 항체는 마그롤리맵이다. 일부 구현예에서, 항체는 A0-176, IBI188(레타플리맵(letaplimab)), STI-6643, 및 ZL-1201로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 항체는 A0-176(Arch)이다. 일부 구현예에서, 항체는 IBI188(레타플리맵)(Innovent)이다. 일부 구현예에서, 항체는 STI-6643(Sorrento)이다. 일부 구현예에서, 항체는 ZL-1201(Zai)이다.

[0171] 일부 구현예에서, CD47에 결합하는 유용한 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맵((Hu5F9-G4))(Forty Seven, Inc.; Gilead Sciences, Inc.), 우라브렐리맵(urabrelimab), CC-90002(Celgene; Bristol-Myers Squibb), IBI-188(Innovent Biologics), IBI-322(Innovent Biologics), TG-1801(TG Therapeutics; NI-1701로도 알려짐, Novimmune SA), ALX148(ALX Oncology), TJ011133(TJC4로도 알려짐, I-Mab Biopharma), FA3M3, ZL-1201(Zai Lab Co., Ltd), AK117(Akesbio Australia Pty, Ltd.), A0-176(Arch Oncology), SRF231(Surface Oncology), GenSci-059(GeneScience), C47B157(Janssen Research and Development), C47B161(Janssen Research and Development), C47B167(Janssen Research and Development), C47B222(Janssen Research and Development), C47B227(Janssen Research and Development), Vx-1004(Corvus Pharmaceuticals), HMBD004(Hummingbird Bioscience Pte Ltd), SHR-1603(Hengrui), AMMS4-G4(Beijing Institute of Biotechnology), RTX-CD47(University of Groningen), 및 IMC-002.(Samsung Biologics; ImmuneOncia Therapeutics)를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맵, 우라브렐리맵, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, A0-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, 및 IMC-002를 포함하는 군으로부터 선택된 항체와 CD47 결합에 대해 경쟁하지 않는다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맵, 우라브렐리맵, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, A0-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, 및 IMC-002로부터 선택된 항체와 CD47 결합에 대해 경쟁한다. 일부 구현예에서, CD47에 결합하는 항체 또는 이의 단편은 CD47에 대한 단일 쇠 Fv 단편(scFv), CD47에 대한 Fab, CD47에 대한 VHH 나노바디(nanobody), CD47에 대한 DARPIn, 및 이의 변이체를 포함하는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CD47에 대한 scFv, CD47에 대한 Fab, 및 이의 변이체는 마그롤리맵, 우라브렐리맵, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, A0-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, 및 IMC-002를 포함하는 군으로부터 선택된 임의의 항체의 항원 결합 도메인에 기반한다.

[0172] 일부 구현예에서, CD47 길항제는 CD47 차단을 제공한다. CD47 차단을 위한 방법 및 체제는 PCT/US2021/054326에 기재되어 있으며, 그 전문이 참조로 포함된다.

[0173] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 원하는 변형 중 하나 이상을 이미 포함하는 공급원 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 교시를 고려하여 당업자는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포의 원하는 최종 형태에 도달하기 위해 어떤 변형이 필요한지 평가하는 방법 및 활성 조작을 통해 표적 구성 요소의 수준이 감소되거나 증가되는 것이 모두 달성되는 것은 아님을 용이하게 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포의 변형은 임의의 순서일 수 있고, 반드시 본원에 제공된 설명 언어에 나열된 순서일 필요는 없다.

[0174] 일단 변경되면, 본원에 기재된 임의의 분자에 대한 발현의 존재는 웨스턴 블롯, ELISA 검정, FACS 검정, 유세포

분석법 등과 같은 알려진 기술을 사용하여 검정될 수 있다.

[0175] A. 감소된 발현 유전자를 갖는 표적

[0176] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, MIC-A, MIC-B, TXIP, CTLA-4 및/또는 PD-1 중 하나 이상의 발현을 조절(예를 들어 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 서열(또는 표적 유전자와 상호교환가능하게 언급됨)의 변형(예를 들어 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 조절(예를 들어 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 유전자의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및/또는 HLA-DR 중 임의의 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 표적 유전자에 대한 변형은 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 또는 NFY-C 중 임의의 하나 이상을 감소시키거나 제거하는 변형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, MIC-A, MIC-B, TXIP, CTLA-4 및/또는 PD-1 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거하는 변형을 갖는다. 임의의 다양한 알려진 유전자 편집 기술을 포함하는 당업자에게 알려진 임의의 다양한 방법은 임의의 이러한 표적 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하는 데 사용될 수 있다.

[0177] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 중 어느 하나의 발현을 조절(예를 들어 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 서열(또한 표적 유전자와 상호교환가능하게 언급됨)의 변형(예를 들어 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형되거나 조작될 1차 세포는 하나 이상의 변형이 이전에 도입되지 않은 비변형된 세포 또는 비조작된 세포, 예컨대 비조작된 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 중 어느 하나의 발현을 조절(예를 들어 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변형시키는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 세포의 계통은 세포의 표면 상에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현과 같은 HLA 발현을 용이하게 하는 데 필요하거나 수반되는 구성요소를 감소시키거나 삭제하도록 변경되었다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 구성요소인 베타-2-미크로글로불린(B2M)의 발현은 세포에서 감소되거나 제거되어, 조작된 세포에 의해 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 단백질 발현(예를 들어 세포 표면 발현)이 감소되거나 제거된다. 따라서, 일부 구현예에서, 발현은 유전자, 및/또는 이의 기능, RNA 발현 및 기능, 단백질 발현 및 기능, 국소화(예컨대 세포 표면 발현), 및 수명을 통해 감소될 수 있다.

[0178] 일부 구현예에서, 인간에서 MHC는 인간 백혈구 항원(HLA)으로도 불린다. 예를 들면, 인간 MHC 클래스 I은 HLA 클래스 I로도 알려져 있고 인간 MHC 클래스 II는 HLA 클래스 II로도 알려져 있다. 따라서, MHC에 대한 언급은 달리 언급되지 않는 한 상응하는 인간 HLA 분자를 포함하도록 의도된다.

[0179] 일부 구현예에서, 표적의 감소된 발현은 조작된 세포에서의 발현이 표적의 발현을 감소시키도록 조작되기 전에 공급원 세포에서 표적의 상응하는 발현 수준(예를 들어, 단백질 발현과 비교한 단백질 발현)보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 표적의 감소된 발현은 조작된 세포에서의 발현이 참조 세포 또는 참조 세포 집단(예컨대 세포 또는 동일한 세포 유형의 집단 또는 감소되거나 제거된 면역원성 반응을 갖는 세포)에서 표적의 상응하는 발현 수준(예를 들어, 단백질 발현과 비교한 단백질 발현)보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 표적의 감소된 발현은 조작된 세포에서의 발현이 측정된 발현 수준(예컨대 표적의 존재로 인해 감소되거나 제거된 면역원성 반응을 나타내는 것으로 알려진 수준)이거나 그보다 적은 수준으로 감소되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 표적의 수준은 자극 또는 비자극된 상태에서의 조작된 세포, 참조 세포, 또는 참조 세포 집단에서 평가된다. 일부 구현예에서, 표적의 수준은 표적이 발현되도록 하는(또는 자극에 반응하는 세포의 능력이 있는 경우에 해당될) 자극된 조건에서의 조작된 세포, 참조 세포, 또는 참조 세포 집단에서 평가된다. 일부 구현예에서, 자극은 생체 내 자극을 나타낸다.

- [0180] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 중 어느 하나의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열(상호교환가능하게 표적 유전자로도 언급됨)의 변형, 예컨대 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간에서 MHC는 인간 백혈구 항원으로 불린다. 예를 들면, 인간 MHC 클래스 I 분자는 HLA 클래스 I 분자로도 알려져 있고 인간 MHC 클래스 II 분자는 HLA 클래스 II 분자로도 알려져 있다. 일부 구현예에서, 변형되거나 조작된 세포는 이전에 하나 이상의 변형으로 도입되지 않은 비변형된 세포 또는 비조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 중 어느 하나의 발현을 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변형시키는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 세포의 계놈은 세포 표면 상의 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현과 같은 HLA 발현을 필요로 하거나 용이하게 하는 데 수반되는 구성요소를 감소시키거나 결실시키도록 변경되었다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 구성요소인 베타-2-마이크로글로부린(microglobulin)(B2M)의 발현은 세포에서 감소되거나 제거되어, 조작된 세포에 의해 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 단백질 발현(예를 들어 세포 표면 발현)을 감소시키거나 제거한다.
- [0181] 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 발현을 조절(예를 들어 감소 또는 제거)하는 조작된 세포에서의 임의의 기재된 변형은 섹션 I.B에 기재된 폴리뉴클레오티드(예를 들어 관용원성 인자, 예컨대 CD47)를 과발현하도록 하나 이상의 변형과 함께 조합될 수 있다.
- [0182] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현의 감소는 예를 들어, 다음 중 하나 이상에 의해 달성될 수 있다: (1) 다형성 HLA 대립유전자(HLA-A, HLA-B, HLA-C) 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 유전자를 직접적으로 표적화; (2) 모든 MHC 클래스 I 분자의 표면 교환(trafficking)을 감소시키는 B2M의 제거; 및/또는 (3) LRC5, RFX-5, RFXANK, RFXAP, IRF1, NF-Y(NFY-A, NFY-B, NFY-C 포함), 및 HLA 발현에 중요한 CIITA와 같은 MHC 인핸세오솜(enhanceosomes)의 하나 이상의 구성요소의 결실.
- [0183] 특정 구현예에서, HLA 발현은 방해된다. 일부 구현예에서, HLA 발현은 개별 HLA의 표적화(예를 들어, HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C의 발현을 녹아웃), HLA 발현의 전사 조절제 표적화(예를 들어, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C 및/또는 IRF-1의 발현 녹아웃), 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 표면 교환 차단(예를 들어, B2M 및/또는 TAP1의 발현 녹아웃), 및/또는 HLA-Razor를 사용한 표적화(예를 들어, WO2016183041 참조)에 의해 방해된다.
- [0184] 인간 백혈구 항원(HLA) 복합체는 인간 MHC와 동의어이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 세포는 인간 세포이다. 특정 측면에서, 본원에 개시된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자에 상응하는 하나 이상의 인간 백혈구 항원(예를 들어, HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C)을 발현하지 않으므로 저면역원성인 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 특정 측면에서, 본원에 개시된 조작된 세포는 세포가 다음 MHC 클래스 I 분자: HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 중 하나 이상을 발현하지 않거나 감소된 발현을 나타내도록 변형되었다. 일부 구현예에서, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 중 하나 이상은 "녹아웃된" 세포일 수 있다. 녹아웃 HLA-A 유전자, HLA-B 유전자, 및/또는 HLA-C 유전자를 갖는 세포는 각각의 녹아웃된 유전자의 감소된 또는 제거된 발현을 나타낼 수 있다.
- [0185] 특정 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현은 계놈 DNA의 연속 스트레치를 표적화하고 결실시켜, B2M, CIITA, 및 NLRC5로 이루어진 군으로부터 선택된 표적 유전자의 발현을 감소시키거나 제거함으로써 조절된다.
- [0186] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I을 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 예컨대 유전자 변형을 포함한다. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키기 위한 예시적인 방법은 아래 섹션에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 표적화된 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M 및 NLRC5 중 하나 또는 둘 다이다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M 및 CIITA 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다.
- [0187] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 예컨대 유전자 변형을 포함한다. 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 예시적인 방법은 아래 섹션에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 세포는 CIITA 유전자에 대한 유전자 편집

집 변형을 포함한다.

- [0188] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 예컨대 유전자 변형을 포함한다. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 예시적인 방법은 아래 섹션에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M 및 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 CIITA 및 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 B2M, CIITA 및 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다.
- [0189] 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 mRNA 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 mRNA 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 mRNA 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자 활성을 제거한다.
- [0190] 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 단백질 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 단백질 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 단백질의 0% 발현). 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 단백질 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자 활성을 제거한다.
- [0191] 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자의 하나의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 발현을 감소시키는 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0192] 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 하나 이상의 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자에 indel을 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자의 게놈 DNA의 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자의 게놈 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, B2M, CIITA 및/또는 NLRC5 유전자는 녹아웃된다.
- [0193] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I, 또는 이의 구성요소의 감소된 발현을 포함하며, 여기서 감소는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 이의 구성요소의 발현을 감소시키기 위한 조작 전에 비해, 참조 세포 또는 참조 세포 집단(예컨대 원하는 면역원선 반응이 결여된 세포), 또는 측정된 값을 감소시키는 것과 같이 본원에 기재된 바와 같다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 발현을 감소시키도록 조작된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 상의 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 제시를 감소시키도록 조작되기 전의 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 발현 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이

하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 상의 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 발현은 참조 세포 또는 참조 세포 집단에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 발현 수준(예컨대 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 발현의 평균 양)보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포(알려진 기술, 예를 들어, 유세포 분석법을 사용하여 측정된 것을 포함하는 검출가능한 세포 표면 발현 포함하지 않음) 상에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 세포 표면 제시는 없다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 감소된 단백질 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의, 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 단백질 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 단백질 발현을 감소시키도록 조작되기 전에 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M), 단백질 발현 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 단백질 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 단백질 발현을 감소시키도록 조작되기 전에 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M) 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 단백질 발현을 나타내지 않는다, (알려진 기술, 예를 들어, 웨스턴 블롯 또는 질량 분광법을 사용하여 측정된 것을 포함하여 검출가능한 단백질 발현 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)를 포함하지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 웨스턴 블롯 또는 질량 분광법을 사용하여 측정된 것을 포함하여 검출가능한 단백질을 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)를 암호화하는 감소된 mRNA 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)를 암호화하는 mRNA 발현은 하나 이상의 MHC 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)의 mRNA 발현을 감소시키도록 조작되기 전에, 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)를 암호화하는 mRNA 발현 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소(예컨대 B2M)를 암호화하는 mRNA 발현은 참조 세포 또는 참조 세포 집단의 mRNA 발현 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소를 암호화하는 mRNA를 발현하지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 서열분석 기술 또는 PCR을 사용하여 측정된 것을 포함하여 검출가능한 mRNA 발현 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 폴리펩티드, 또는 이의 구성요소를 암호화하는 mRNA를 포함하지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 서열분석 기술 또는 PCR을 사용하여 측정된 것을 포함하여 검출가능한 mRNA 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 유전자의 유전자 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 두 대립유전자에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 유전자의 유전자 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 모든 대립유전자에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 유전자의 유전자 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 녹아웃 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 구성요소(예컨대 B2M) 녹아웃이다.

[0194] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현을 포함하며, 여기서 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현을 감소시키기 위한 조작 전에 비해, 참조 세포 또는 참조 세포 집단(예컨대 원하는 면역원성 반응이 결여된 세포), 또는 측정된 값과 같이 본원에 기재된 바와 같이 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 세포 표면 발현이 감소되도록 조작된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 상의 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 세포 표면 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 II

폴리펩티드의 세포 표면 제시를 감소시키도록 조작되기 전에 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드 세포 표면 발현의 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 상의 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 세포 표면 발현은 참조 세포 또는 참조 세포 집단에서 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드 세포 표면 발현의 수준(예컨대 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드 세포 표면 발현의 평균 양)보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 상에 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 세포 표면 제시는 없다(알려진 기술, 예를 들어, 유세포 분석법을 사용하여 측정된 것을 포함하여, 검출가능한 세포 표면 발현을 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 감소된 단백질 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 단백질 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 단백질 발현을 감소시키도록 조작되기 전에 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드 단백질 발현의 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 단백질 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 단백질 발현을 감소시키도록 조작되기 전에 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 수준보다 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 단백질 발현을 나타내지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 웨스턴 블롯 또는 질량 분광법을 사용하여 측정된 것을 포함하여, 검출가능한 단백질 발현을 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 포함하지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 웨스턴 블롯 또는 질량 분광법을 사용하여 측정된 것을 포함하여, 검출가능한 단백질을 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 암호화하는 감소된 mRNA 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA 발현은 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드의 mRNA 발현을 감소시키도록 조작되기 전에 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA 발현 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA 발현은 참조 세포 또는 참조 세포 집단의 mRNA 발현 수준보다 약 60% 이하(예컨대 약 55% 이하, 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하 중 임의의 것)인 수준으로 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 발현하지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 서열분석 기술 또는 PCR을 사용하여 측정된 것을 포함하여, 검출가능한 mRNA 발현을 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA를 포함하지 않는다(알려진 기술, 예를 들어, 서열분석 기술 또는 PCR을 사용하여 측정된 것을 포함하여, 검출가능한 mRNA를 포함하지 않음). 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 유전자의 유전자 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 두 대립유전자에서 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 유전자의 유전자 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 모든 대립유전자에서 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 유전자 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 녹아웃이다.

[0195] 1. 발현을 감소시키는 방법

[0196] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 기재된 바와 같은 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키도록 변형되며, 예컨대 유전자 변형된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 발현을 감소(예를 들어 제거)하기 위한 하나 이상의 변형으로 조작된 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 공급원 세포이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 본원에 기재된 임의의 세포이다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 세포(예를 들어, 1차 세포)는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형, 예컨대 유전자 변형을 포함한다. 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예는 위에 기재된 것과 같은 임의의 것, 예컨대 MHC 클래스 I 분자, 또는 이의 구성요소, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, CIITA, B2M, NLRC5, HLA-A, HLA-B, HLA-C, LRC5, RFX-ANK, RFX5, RFX-AP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF1, 및 TAP1 중 하나 이

상을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형, 예컨대 유전자 변형은 본원에 기재된 임의의 것과 같은 원하는 이식유전자의 발현을 증가시키기 위한 하나 이상의 변형과 조합된다. 일부 구현예에서, 유전자 변형과 같은 하나 이상의 변형은 면역-특권 또는 저면역 원성 세포인 조작된 세포를 생성한다. 하나 또는 복수의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 결실)함으로써, 이러한 세포는 수용자 대상체에 생착될 때 감소된 면역 활성화를 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 투여 시 예를 들어, 수용자 대상체 또는 환자에서 저면역원성인 것으로 간주된다.

[0197] 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키기 위한 임의의 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 표적 폴리뉴클레오티드의 발현에서 영구적인 제거 또는 감소를 초래한다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 유전자는 표적 폴리뉴클레오티드에 DNA 파손을 도입함으로써, 예컨대 표적화 엔도뉴클레아제를 사용함으로써 파괴된다. 다른 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 표적 폴리뉴클레오티드의 발현에서 일시적인 감소를 초래한다. 예를 들면, 일부 구현예에서 유전자 억제체는 유전자의 발현을 선택적으로 억제하거나 억제하기 위해 표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 억제 핵산을 사용하여, 예를 들면 RNA 간섭(RNAi), 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀(shRNA), 및/또는 리보자임에 의해서와 같이 안티센스 기술을 사용하여 달성된다.

[0198] 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 게놈 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 인간 게놈 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 포유류 게놈 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 척추동물 게놈 서열이다.

[0199] 일부 구현예에서, 임의의 유전자 편집 기술은 기재된 바와 같은 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 뉴클레아제, 인테그라제, 트랜스포사제, 재조합효소를 수반하는 시스템을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 유전자의 녹아웃 또는 녹다운(knock-down)에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자-편집 기술은 DNA를 게놈 영역 내로 녹인하거나 통합하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 단일 가닥 파손(SSB)을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 비상동 말단 연결(NHEJ) 또는 상동성 지시 복구(HDR)와 관련된 것을 포함하여, 이중 가닥 파손(DSB)을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 DNA-기반 편집 또는 프라임 편집을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램화가능 추가(PASTE)를 포함할 수 있다.

[0200] 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 전형적으로 표적화된 방식으로 유전자에서 하나 이상의 이중 가닥 파손 및/또는 하나 이상의 단일 가닥 파손을 유도함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손은 뉴클레아제, 예를 들어, 엔도뉴클레아제, 예컨대 유전자-표적화 뉴클레아제에 의해 만들어진다. 일부 구현예에서, 표적화 뉴클레아제는 유전자 또는 이의 일부의 서열을 표적화하도록 특이적으로 설계된 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 RNA-가이드 뉴클레아제 예컨대 CRISPR-연관 뉴클레아제(Cas)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 표적화 뉴클레아제는 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 생성한 다음 오류가 발생하기 쉬운 비상동 말단 연결(NHEJ)을 통해 복구를 거치거나, 일부 경우에, 주형이 사용되는 정확한 상동성 지시 복구(HDR)를 거친다. 일부 구현예에서, 표적화 뉴클레아제는 DNA 이중 가닥 파손(DSB)을 생성한다. 일부 구현예에서, 파손을 생성하고 복구하는 과정은 전형적으로 오류가 발생하기 쉬우며 NHEJ 복구로부터 DNA 염기의 삽입 및 결실(indel)을 초래한다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 유도할 수 있다. 일부 경우에, 유전자 변형은 프레임시프트 돌연변이를 초래할 수 있으며, 이는 조기 정지 코돈을 초래할 수 있다. 뉴클레아제-매개 유전자 편집의 예에서 표적화 편집은 유전자의 두 대립유전자에서 발생하여 유전자의 이중 대립유전자 파괴 또는 편집을 초래한다. 일부 구현예에서, 유전자의 모든 대립유전자는 유전자 편집에 의해 표적화된다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템을 사용하는 것과 같은 표적화 뉴클레아제를 사용한 유전자 변형은 유전자의 완전한 녹아웃으로 이어진다.

[0201] 일부 구현예에서, 핵산-절단 엔도뉴클레아제와 같은 뉴클레아제는 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 세포 내로 도입된다. 뉴클레아제는 뉴클레아제를 암호화하는 핵산의 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 핵산을 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질 매개 형질감염, 전기천공, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내로 도입되는 핵산은 DNA이다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제는 단백질 형태로 세포 내로 도입된다. 예를 들면, CRISPR/Cas 시스템의 경우 리보핵단백질(RNP)이 세포 내로 도입될 수 있다.

[0202] 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 발생한다. 표적 세포에서 폴

리뉴클레오티드 서열을 변경할 수 있는 임의의 CRISPR/Cas 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 CRISPR-Cas 시스템은 다양한 Cas 단백질을 이용할 수 있다(Haft 등 PLoS Comput Biol. 2005; 1(6)e60). CRISPR/Cas 시스템이 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경하도록 하는 이러한 Cas 단백질의 분자 기구는 RNA 결합 단백질, 엔도- 및 엑소-뉴클레아제, 헬리카제, 및 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 CRISPR 유형 I 시스템이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 CRISPR 유형 II 시스템이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 CRISPR 유형 V 시스템이다.

[0203] CRISPR/Cas 시스템은 세포에서 임의의 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경시키는 데 사용될 수 있는 표적화 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CRISPR/Cas 시스템은 Cas 단백질 및 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 지시하고 이에 혼성화할 수 있는 하나 이상, 예컨대 적어도 1 내지 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA(gRNA))을 포함한다.

[0204] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 일부 경우에, 치환 및/또는 변형은 단백질 가수분해를 방지하거나 감소시키고/시킴거나 세포에서 폴리펩티드의 반감기를 연장할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 펩티드 결합 대체(예를 들어, 우레아, 티오우레아, 카르바메이트, 술폰일 우레아 등)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 대체 아미노산(예를 들어, D-아미노산, 베타-아미노산, 호모시스테인, 포스포세린 등)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 모이어티를 포함하는 변형(예를 들어, PEG화, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 말단-캡핑 등)을 포함할 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 코어 Cas 단백질을 포함한다. 예시적인 Cas 코어 단백질은 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9, Cas12a, 및 Cas13을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 이. 콜라이(E. coli) 하위유형의 Cas 단백질(CASS2로도 알려짐)을 포함한다. 이. 콜라이 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, 및 Cas5e를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Ypest 하위유형의 Cas 단백질(CASS3으로도 알려짐)을 포함한다. Ypest 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csy1, Csy2, Csy3, 및 Csy4를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Nmeni 하위유형의 Cas 단백질(CASS4로도 알려짐)을 포함한다. Nmeni 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csn1 및 Csn2를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Dvulg 하위유형의 Cas 단백질(CASS1로도 알려짐)을 포함한다. Dvulg 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csd1, Csd2, 및 Cas5d를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Tneap 하위유형의 Cas 단백질(CASS7로도 알려짐)을 포함한다. Tneap 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Cst1, Cst2, Cas5t를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Hmari 하위유형의 Cas 단백질을 포함한다. Hmari 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csh1, Csh2, 및 Cas5h를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Apern 하위유형의 Cas 단백질(CASS5로도 알려짐)을 포함한다. Apern 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, 및 Cas5a를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Mtube 하위유형의 Cas 단백질(CASS6으로도 알려짐)을 포함한다. Mtube 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, 및 Csm5를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 RAMP 모듈 Cas 단백질을 포함한다. 예시적인 RAMP 모듈 Cas 단백질은 Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, 및 Cmr6를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, Klompe 등, Nature 571, 219-225(2019); Strecker 등, Science 365, 48-53(2019) 참조.

[0206] 일부 구현예에서, 하나 이상의 유전자를 녹아웃, 녹다운, 또는 달리 변형시키기 위해 세포를 유전적으로 변형시키는 방법은 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 트랜스포사제, 및 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR)/Cas 시스템을 포함하여 부위 지정 뉴클레아제를 사용하는 것을 포함한다

[0207] ZFN은 박테리아 FokI 제한 효소의 엔도뉴클레아제 도메인에 부착된 징크 핑거 함유 전사 인자로부터 조정된 부위 특이적 DNA 결합 도메인의 배열을 포함하는 융합 단백질이다. ZFN은 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 이상)의 DNA 결합 도메인 또는 징크 핑거 도메인을 가질 수 있다. 예를 들어, Carroll 등, Genetics Society of America(2011) 188:773-782; Kim 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996) 93:1156-1160을 참조한다. 각 징크 핑거 도메인은 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조적 모티프이며 일반적으로 3- 내지 4-bp DNA 서열을 인식한다. 따라서 탠덤 도메인은 세포의 게놈 내에서 고유한 연장된 뉴클레오티드 서열에 잠재적으로 결합할 수 있다.

- [0208] 알려진 특이성을 갖는 다양한 징크 핑거는 조합되어 약 6, 9, 12, 15, 또는 18-bp 서열을 인식하는 다중 핑거 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-하이브리드 시스템, 박테리아 1-하이브리드 및 2-하이브리드 시스템, 및 포유류 세포를 포함한 다양한 선택 및 모듈식 조립 기술이 특이적 서열을 인식하는 징크 핑거(및 이의 조합)를 생성하는 데 이용가능하다. 징크 핑거는 미리 결정된 핵산 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 미리 결정된 핵산 서열에 결합하도록 징크 핑거를 조작하는 기준은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Sera 등, *Biochemistry*(2002) 41:7074-7081; Liu 등, *Bioinformatics*(2008) 24:1850-1857을 참조한다.
- [0209] FokI 뉴클레아제 도메인 또는 다른 이량체성 뉴클레아제 도메인을 함유하는 ZFN은 이량체로서 기능한다. 따라서, 한 쌍의 ZFN이 비회귀성 DNA 부위를 표적하는 데 요구된다. 2개의 개별 ZFN은 뉴클레아제가 적절하게 간격을 두고 DNA의 반대 가닥에 결합해야 한다. Bitinaite 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1998) 95:10570-10575를 참조한다. 계놈에서 특이적 부위를 절단하기 위해, 한 쌍의 ZFN은 부위 측면에 있는 2개의 서열을 인식하도록 설계되며, 하나는 정방향 가닥에 있고 다른 하나는 역방향 가닥에 있다. 부위의 양쪽에 ZFN이 결합하면, 뉴클레아제 도메인은 부위에서 DNA를 이량체화하고 절단하여, 5' 돌출부(overhang)를 갖는 DSB를 생성한다. 그런 다음 HDR를 활용하여 상동성 아암(arm) 측면에 있는 원하는 돌연변이를 함유하는 복구 주형의 도움으로 특이적 돌연변이를 도입할 수 있다. 복구 주형은 일반적으로 세포 내로 도입된 외인성 이중 가닥 DNA 벡터이다. Miller 등, *Nat. Biotechnol.*(2011) 29:143-148; Hockemeyer 등, *Nat. Biotechnol.*(2011) 29:731-734를 참조한다.
- [0210] TALEN은 표적 유전자를 편집하는 데 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제의 또 다른 예이다. TALEN은 TALE 반복부라고 불리는 DNA 결합 도메인으로부터 유래되며, 이는 일반적으로 연장된 DNA 서열에 결합하고 인식하는 10 내지 30개 반복부가 있는 탠덤 배열을 포함한다. 각 반복부는 33 내지 35개 아미노산 길이며, 2개의 인접한 아미노산(반복 변수 이중 잔기, 또는 RVD로 불림)이 4개의 DNA 염기쌍 중 하나에 특이성을 부여한다. 따라서, 표적 DNA 서열에서 반복과 염기쌍 사이에 일대일 대응이 있다.
- [0211] TALEN은 하나 이상의 TALE DNA 결합 도메인(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상)을 뉴클레아제 도메인, 예를 들어, FokI 엔도뉴클레아제 도메인에 융합시킴으로서 인공적으로 생성된다. Zhang, *Nature Biotech.*(2011) 29:149-153을 참조한다. FokI에 대한 여러 돌연변이가 TALEN에 사용하기 위해 만들어졌으며; 예를 들어, 이들은 절단 특이성 또는 활성을 개선한다. Cermak 등, *Nucl. Acids Res.*(2011) 39:e82; Miller 등, *Nature Biotech.*(2011) 29:143-148; Hockemeyer 등, *Nature Biotech.*(2011) 29:731-734; Wood 등, *Science*(2011) 333:307; Doyon 등, *Nature Methods*(2010) 8:74-79; Szczepek 등, *Nature Biotech*(2007) 25:786-793; Guo 등, *J. Mol. Biol.*(2010) 200:96을 참조한다. FokI 도메인은 이량체로서 기능하며, 적절한 배향 및 간격을 갖는 표적 계놈에서 부위에 대한 고유한 DNA 결합 도메인이 있는 2개의 작체물이 필요하다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 뉴클레아제 도메인 사이의 아미노산 잔기 수 및 2개의 개별 TALEN 결합 부위 사이의 염기 수는 둘 다 높은 수준의 활성을 달성하기 위한 중요한 매개변수인 것으로 보인다. Miller 등, *Nature Biotech.*(2011) 29:143-148.
- [0212] 조작된 TALE 반복부를 뉴클레아제 도메인과 조합함으로써, 부위 특이적 뉴클레아제는 임의의 원하는 DNA 서열에 특이적으로 생성될 수 있다. ZFN과 유사하게, TALEN은 세포 내로 도입되어 계놈 내 원하는 표적 부위에서 DSB를 생성할 수 있으므로, 유사한 HDR-매개 경로에서 유전자를 녹아웃시키거나 돌연변이를 녹인하는 데 사용될 수 있다. Boch, *Nature Biotech.*(2011) 29:135-136; Boch 등, *Science*(2009) 326:1509-1512; Moscou 등, *Science*(2009) 326:3501을 참조한다.
- [0213] 메가뉴클레아제는 큰 DNA 서열(14 내지 40개 염기쌍)을 인식하고 절단하는 능력을 특징으로 하는 엔도뉴클레아제 계열의 효소이다. 메가뉴클레아제는 뉴클레아제 활성 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 구조적 모티프에 기반하여 계열로 그룹화된다. 가장 널리 퍼져 있고 가장 알려진 메가뉴클레아제는 LAGLIDADG 계열의 단백질이며, 보존된 아미노산 서열에 따라 이름이 붙여졌다. Chevalier 등, *Nucleic Acids Res.*(2001) 29(18): 3757-3774를 참조한다. 반면에, GIY-YIG 계열 구성원은 GIY-YIG 모듈을 가지며, 이는 70-100개 잔기 길이이고 4개의 불변 잔기와 함께 4 또는 5개의 보존된 서열 모티프를 포함하며, 그 중 2개는 활성에 필요하다. Van Roey 등, *Nature Struct. Biol.*(2002) 9:806-811을 참조한다. His-Cys 계열 메가뉴클레아제는 수백 개의 아미노산 잔기를 포괄하는 영역에 걸쳐 고도로 보존된 일련의 히스티딘 및 시스테인을 특징으로 한다. Chevalier 등, *Nucleic Acids Res.*(2001) 29(18):3757-3774를 참조한다. NHN 계열의 구성원은 아스파라긴 잔기로 둘러싸인 두 쌍의 보존된 히스티딘을 함유하는 모티프로 정의된다. Chevalier 등, *Nucleic Acids Res.*(2001) 29(18):3757-3774를 참조한다.

- [0214] 특정 표적 DNA 서열에 대한 천연 메가뉴클레아제를 인식할 가능성이 높은 특이성 요건으로 인해 낮기 때문에, 돌연변이생성 및 고처리량 스크리닝 방법을 포함한 다양한 방법이 고유한 서열을 인식하는 메가뉴클레아제 변이체를 생성하는 데 사용되었다. 예를 들어, 미리 결정된 핵산 서열에 결합하기 위해 변경된 DNA-결합 특이성을 갖는 메가뉴클레아제를 조작하기 위한 전략은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Chevalier 등, *Mol. Cell.* (2002) 10:895-905; Epinat 등, *Nucleic Acids Res*(2003) 31:2952-2962; Silva 등, *J Mol. Biol.*(2006) 361:744-754; Seligman 등, *Nucleic Acids Res*(2002) 30:3870-3879; Sussman 등, *J Mol Biol*(2004) 342:31-41; Doyon 등, *J Am Chem Soc*(2006) 128:2477-2484; Chen 등, *Protein Eng Des Sel*(2009) 22:249-256; Arnould 등, *J Mol Biol.*(2006) 355:443-458; Smith 등, *Nucleic Acids Res.*(2006) 363(2):283-294를 참조한다.
- [0215] ZFN 및 TALEN과 마찬가지로, 메가뉴클레아제는 게놈 DNA에 DSB를 생성할 수 있으며, 이는 예를 들어, NHEJ를 통해 부적절하게 복구되는 경우 프레임 시프트 돌연변이를 생성하여, 세포에서 표적 유전자의 발현 감소로 이어질 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 메가뉴클레아제와 함께 세포 내로 도입될 수 있다. 외래 DNA의 서열 및 염색체 서열에 따라, 이 과정을 사용하여 표적 유전자를 변형시킬 수 있다. Silva 등, *Current Gene Therapy*(2011) 11:11-27을 참조한다.
- [0216] 트랜스포사제는 트랜스포존의 말단에 결합하고 잘라내기 및 붙여넣기 메커니즘 또는 복제 전위 메커니즘에 의해 게놈의 또 다른 부분으로의 이동을 촉매하는 효소이다. 트랜스포사제를 CRISPER/Cas 시스템과 같은 다른 시스템에 연결함으로써, 게놈 DNA의 부위 특이적 삽입 또는 조작을 가능하게 하는 새로운 유전자 편집 도구가 개발될 수 있다. 촉매적 불활성 Cas 효과기 단백질을 사용하는 트랜스포존 및 Tn7-유사 트랜스포존을 사용하는 2가지 알려진 DNA 통합 방법이 있다. 트랜스포사제-의존적 DNA 통합은 게놈에서 DSB를 유발하지 않으며, 이는 더 안전하고 보다 특이적인 DNA 통합을 보장할 수 있다.
- [0217] CRISPR 시스템은 원래 획득 면역 형태를 제공하는 침입하는 과자 및 플라스미드에 대한 방어에 연관된 시스템으로서 원핵 생물(예를 들어, 박테리아 및 고세균)에서 개발되었다. 이제 연구 및 임상 적용에서 대중적인 유전자 편집 도구로서 조정되고 사용되었다.
- [0218] CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 적어도 2개의 구성요소: 하나 이상의 가이드 RNA(gRNA) 및 Cas 단백질을 포함한다. Cas 단백질은 DSB를 표적 부위 내로 도입하는 뉴클레아제이다. CRISPR-Cas 시스템은 2가지 주요 클래스로 나뉜다: 클래스 1 시스템은 다중 Cas 단백질의 복합체를 사용하여 핵산을 분해하고; 클래스 2 시스템은 동일한 목적을 위해 단일 큰 Cas 단백질을 사용한다. 클래스 1은 유형 I, III, 및 IV로 분류되고; 클래스 2는 유형 II, V, 및 VI로 분류된다. 유전자 편집 적용에 조정된 상이한 Cas 단백질은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, 및 Mad7을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 가장 널리 사용되는 Cas9는 유형 II Cas 단백질이고 예시로서 본원에 기재되어 있다. 이들 Cas 단백질은 상이한 공급원 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas9는 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) 또는 에스. 아우레우스(*S. aureus*)로부터 유래될 수 있다.
- [0219] 원래 미생물 게놈에서, 유형 II CRISPR 시스템은 숙주 게놈 내에 배열로서 암호화된 CRISPR 반복 서열 사이에 침입 DNA로부터의 서열을 혼입한다. CRISPR 반복 배열로부터의 전사체는 "프로토스페이스어(protospacer)" 서열로 알려진 침입 DNA로부터 전사된 가변 서열을 각각 보유하는 CRISPR RNA(crRNA), 뿐만 아니라 CRISPR 반복부의 일부로 처리된다. 각 crRNA는 제2 전사촉진 CRISPR RNA(tracrRNA)와 혼성화하고, 이들 2개의 RNA는 Cas9 뉴클레아제와 복합체를 형성한다. crRNA의 프로토스페이스어 암호화된 부분은 이들이 "프로토스페이스어 인접 모티프"(PAM)로 알려진 짧은 서열에 인접하면 Cas9 복합체가 상보성 표적 DNA 서열을 절단하도록 지시한다.
- [0220] 발견 이후, CRISPR 시스템은 박테리아에서 인간 세포를 포함한 진핵 세포까지 이르는 광범위한 세포 및 유기체에서 서열 특이적 DSB 및 표적화 게놈 편집을 유도하기 위해 조정되었다. 유전자 편집 적용에서 사용하는 데 있어서, 인공적으로 설계된 합성 gRNA는 원래 crRNA:tracrRNA 복합체를 대체하였다. 예를 들어, gRNA는 crRNA, 테트라루프, 및 tracrRNA로 구성된 단일 가이드 RNA(sgRNA)일 수 있다. crRNA는 일반적으로 관심 표적 DNA를 인식하도록 사용자가 설계한 상보성 영역(스페이스어도 불리며, 일반적으로 약 20개 뉴클레오티드 길이)을 포함한다. tracrRNA 서열은 Cas 뉴클레아제 결합을 위한 스캐폴드 영역을 포함한다. crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 테트라루프에 의해 연결되며 각각이 서로 혼성화를 위한 짧은 반복 서열을 가지므로, 키메라 sgRNA를 생성한다. gRNA에 존재하는 스페이스어 또는 상보성 영역 서열을 간단히 바꿈으로써 Cas 뉴클레아제의 게놈 표적을 바

꿀 수 있다. 상보성 영역은 표준 RNA-DNA 상보성 염기쌍 규칙을 통해 Cas 뉴클레아제를 표적 DNA 부위로 지시할 것이다.

[0221] Cas 뉴클레아제가 기능하기 위해서, 게놈 DNA에서 표적 서열의 바로 하류에 PAM이 있어야 한다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 게놈 서열을 불안정하게 하여, gRNA에 의한 서열의 조사를 허용하고 일치 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 쌍을 초래하는 것으로 여겨졌다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 달라진다. 예를 들어, 에스. 피오게네스로부터 유래된 가장 흔히 사용되는 Cas9 뉴클레아제는 5'-NGG-3'의 PAM 서열을 인식하거나, 덜 효율적인 속도로, 5'-NAG-3'을 인식하며, 여기서 "N"은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대체 PAM을 갖는 다른 Cas 뉴클레아제 변이체가 또한 특성화되어 게놈 편집에 성공적으로 사용되었으며, 이는 아래 표 1a에 요약되어 있다.

[0222] 표 1a. 예시적인 Cas 뉴클레아제 변이체 및 그들의 PAM 서열

CRISPR 뉴클레아제	근원 유기체	PAM 서열(5'→3')
SpCas9	스트렙토코쿠스 피오게네스 (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	NGG 또는 NAG
SaCas9	스타필로코쿠스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	NGRRT 또는 NGRRN
NmeCas9	나이세리아 메닝기티디스 (<i>Neisseria meningitidis</i>)	NNNGATT
CjCas9	캠필로박터 제주니 (<i>Campylobacter jejuni</i>)	NNNRYAC
StCas9	스트렙토코쿠스 썬모필루스 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	NNAGAAW
TdCas9	트레포네마 덴티콜라 (<i>Treponema denticola</i>)	NAAAAC
LbCas12a(Cpf1)	라크노스피라세아에 박테리움 (<i>Lachnospiraceae bacterium</i>)	TTTV
AsCas12a(Cpf1)	아시다미노코쿠스 종 (<i>Acidaminococcus sp.</i>)	TTTV
AacCas12b	알리사이클로바실루스 아시디필루스 (<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>)	TTN
BhCas12b v4	바실루스 히사시이 (<i>Bacillus hisashii</i>)	ATTN, TTTN, 또는 GTTN

R=A 또는 G; Y=C 또는 T; W=A 또는 T; V=A 또는 C 또는 G; N= 임의의 염기

[0223] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 활성, 특이성, 인식, 및/또는 다른 특징을 변경하기 위해 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, Cas 뉴클레아제는 표적외(off-target) 효과를 완화하기 위해 충실도를 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다(예를 들어, SpCas9의 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9, 및 evoSpCas9 고충실도 변이체). 또 다른 예를 들어 Cas 뉴클레아제는 PAM 특이성을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0225] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 Cas 단백질 중 임의의 하나 또는 이의 기능적 부분을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "기능적 부분"은 적어도 하나의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA(gRNA))과 복합체를 이루고 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 절단하는 능력을 유지하는 펩티드의 일부를 지칭한다. 일부 구현예에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 헬리카제 도메인, 및 엔도뉴클레아제 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 작동가능하게 연결된 Cas9 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 헬리카제 도메인, 및 엔도뉴클레아제 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 작동가능하게 연결된 Cas12a(Cpf1로도 알려짐) 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 도메인은 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질의

기능적 부분은 RuvC-유사 도메인의 기능적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질의 기능적 부분은 HNH 뉴클레아제 도메인의 기능적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질의 기능적 부분은 RuvC-유사 도메인의 기능적 부분을 포함한다.

- [0226] 일부 구현예에서, 적합한 Cas 단백질은 Cas0, Cas12a(즉 Cpf1), Cas12b, Cas12i, CasX, 및 Mad7을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0227] 일부 구현예에서, 외인성 Cas 단백질은 폴리펩티드 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 세포-투과 폴리펩티드 또는 세포-투과 펩티드에 접합되거나 융합될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "세포-투과 폴리펩티드" 및 "세포-투과 펩티드"는 분자의 세포로의 흡수를 용이하게 하는 각각 폴리펩티드 또는 펩티드를 지칭한다. 세포-투과 폴리펩티드는 검출가능한 표지를 함유할 수 있다.
- [0228] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 (예를 들어, 양성, 음성 또는 전반적으로 중성 전하를 보유하는) 하전된 단백질에 접합되거나 융합될 수 있다. 이러한 연결은 공유적일 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합되어 Cas 단백질이 세포에 침투하는 능력을 상당히 증가시킬 수 있다(Cronican 등 ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52). 특정 구현예에서, Cas 단백질은 단백질 전달 도메인(PTD)에 융합되어 세포 내로의 진입을 용이하게 할 수 있다. 예시적인 PTD는 Tat, 올리고아르기닌, 및 페네트라틴을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 세포-투과 펩티드에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 PTD에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 tat 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 세포-투과 펩티드에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 PTD에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 tat 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다.
- [0229] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질을 암호화하는 핵산의 형태로 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 세포 내로 도입될 수 있다. 핵산을 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질 매개 형질감염, 전기천공법, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 mRNA(예를 들어, 합성 변형된 mRNA)를 포함한다.
- [0230] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 1 내지 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA(gRNA))과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 2개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 1개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 핵산(예를 들어, 합성 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.
- [0231] 제공된 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 2개의 구성요소: 하나 이상의 가이드 RNA(gRNA) 및 Cas 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 하나 이상, 예컨대 1 내지 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA(gRNA))과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 2개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 1개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 핵산(예를 들어, 합성 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.
- [0232] 일부 구현예에서, gRNA는 Cas 결합을 위한 스캐폴드 서열 및 crRNA로 지정된 사용자가 설계한 스페이서 또는 상보성 부분으로 구성된 짧은 합성 RNA이다. crRNA는 변형될 게놈 표적을 정의하는 crRNA 표적화 서열 서열(본원에서 이후에 gRNA 표적화 서열로도 불리며; 일반적으로 약 20개 뉴클레오티드 길이) 및 crRNA 반복 영역(예를 들어 GUUUUAGAGCUA; 서열번호: 23)으로 구성된다. gRNA에 존재하는 상보성 부분 서열(예를 들어 gRNA 표적화 서열)을 간단히 바꿈으로써 Cas 단백질의 게놈 표적을 바꿀 수 있다. 일부 구현예에서 Cas 결합을 위한 스캐폴드 서열은 항-반복 서열을 통해 crRNA에 혼성화하는 tracrRNA 서열(예를 들어 UAGCAAGUAAAAUAGGCUAGCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU; 서열번호: 24)로 구성된다. crRNA:tracrRNA 사이의 복합체는 Cas 뉴클레아제(예를 들어 Cas9)를 모집하고 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)의 상류를 절단한다. Cas 단백질이 기능하기 위해서, 게놈 DNA에서 표적 서열의 바로 하류에 PAM이 있어야 한

다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 게놈 서열을 불안정하게 하여, gRNA에 의한 서열 조사를 허용하고 일치 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 쌍을 초래하는 것으로 여겨진다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 달라진다. 예를 들어, 에스. 피오게네스로부터 유래된 가장 흔히 사용되는 Cas9 뉴클레아제는 NGG의 PAM 서열을 인식한다. 다른 Cas9 변이체 및 대체 PAM을 갖는 다른 뉴클레아제가 또한 특성화되었고 게놈 편집에 성공적으로 사용되었다. 따라서, CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 표적 유전자좌에 대해 설계된 gRNA에 상보적인 명시된 게놈 유전자좌에서 표적화된 DSB를 생성할 수 있다. crRNA 및 tracrRNA는 키메라 단일 가이드 RNA인 gRNA(sgRNA; Hsu 등 2013)의 생성을 위해 루프 서열(예를 들어 테트라루프; GAAA, 서열번호: 25)과 함께 연결될 수 있다. sgRNA는 DNA-기반 발현 또는 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다.

[0233] 일부 구현예에서, gRNA의 상보적 부분 서열(예를 들어 gRNA 표적화 서열)은 관심 표적 부위에 따라 달라질 것이다. 일부 구현예에서, gRNA는 표 1b에 제시된 유전자의 서열에 특이적인 상보적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 게놈 유전자좌는 기재된 바와 같은 임의의 유전자좌의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내에 위치한다.

[0234] 본원에 개시된 방법은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프에 지시하고 혼성화할 수 있는 임의의 리보핵산의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 tracrRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 CRISPR RNA(crRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 리보핵산은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프에 지시하고 혼성화하는 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프에 지시하고 혼성화하는 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 1 내지 2개의 리보핵산은 모두 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프에 지시하고 혼성화하는 가이드 RNA를 포함한다. 본원에 제공된 리보핵산은 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 이용되는 특정 CRISPR/Cas 시스템, 및 표적 폴리뉴클레오티드의 서열에 따라 다양한 상이한 표적 모티프에 혼성화하도록 선택될 수 있다. 1 내지 2개의 리보핵산은 또한 표적 폴리뉴클레오티드 서열 이외의 핵산 서열과의 혼성화를 최소화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 1 내지 2개의 리보핵산은 세포 내 모든 다른 게놈 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 2개의 불일치를 함유하는 표적 모티프에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 1 내지 2개의 리보핵산은 세포 내 모든 다른 게놈 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 하나의 불일치를 함유하는 표적 모티프에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 1 내지 2개의 리보핵산은 Cas 단백질에 의해 인식된 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화하도록 설계된다. 일부 구현예에서, 1 내지 2개의 리보핵산은 각각 표적 모티프 사이에 위치한 돌연변이체 대립유전자 측면에 있는 Cas 단백질에 의해 인식된 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화하도록 설계된다. 일부 구현예에서, 1 내지 2개의 리보핵산은 각각 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프에 지시하고 혼성화하는 가이드 RNA를 포함한다.

[0235] 일부 구현예에서, 1 또는 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA)은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 동일한 가닥 상의 서열에 상보적이고/이거나 혼성화한다. 일부 구현예에서, 1 또는 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA)은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 다른 가닥 상의 서열에 상보적이고/이거나 혼성화한다. 일부 구현예에서, 1 또는 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA)은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 반대 가닥 상의 서열에 상보적이지 않고/않거나 혼성화하지 않는다. 일부 구현예에서, 1 또는 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA)은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 돌출 표적 모티프에 상보적이고/이거나 혼성화한다. 일부 구현예에서, 1 또는 2개의 리보핵산(예를 들어, 가이드 RNA)은 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 상쇄 표적 모티프에 상보적이고/이거나 혼성화한다.

[0236] 일부 구현예에서, Cas 단백질을 암호화하는 핵산 및 적어도 1 내지 2개의 리보핵산을 암호화하는 핵산은 바이러스 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스 형질도입)을 통해 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 1-2개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 2개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 1개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 핵산(예를 들어, 합성 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.

[0237] 본원에 기재된 유전자의 CRISPR/Cas-기반 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 표적화 서열은 표 1b에 제공되어 있다. 서열은 2016년 5월 9일 출원된 W02016183041에서 찾을 수 있으며, 표, 부록, 및 서열 목록을 포함하는 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0238] 표 1b. 유전자 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 표적화 서열

유전자명	서열번호:	WO2016183041
HLA-A	서열번호: 2-1418	표 8, 부록 1
HLA-B	서열번호: 1419-3277	표 9, 부록 2
HLA-C	서열번호:3278-5183	표 10, 부록 3
RFX-ANK	서열번호: 95636-102318	표 11, 부록 4
NFY-A	서열번호: 102319-121796	표 13, 부록 6
RFX5	서열번호: 85645-90115	표 16, 부록 9
RFX-AP	서열번호: 90116-95635	표 17, 부록 10
NFY-B	서열번호: 121797-135112	표 20, 부록 13
NFY-C	서열번호: 135113-176601	표 22, 부록 15
IRF1	서열번호: 176602-182813	표 23, 부록 16
TAP1	서열번호: 182814-188371	표 24, 부록 17
CIITA	서열번호:5184-36352	표 12, 부록 5
B2M	서열번호:81240-85644	표 15, 부록 8
NLRC5	서열번호:36353-81239	표 14, 부록 7
CD47	서열번호:200784-231885	표 29, 부록 22
HLA-E	서열번호:189859-193183	표 19, 부록 12
HLA-F	서열번호:688808-699754	표 45, 부록 38
HLA-G	서열번호:188372-189858	표 18, 부록 11
PD-L1	서열번호:193184-200783	표 21, 부록 14

[0239]

[0240]

일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 유전적 파괴 방법에 사용하기 위한 새로운 유전자좌 및/또는 gRNA 표적화 서열을 식별하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우, 특정 유전자좌(예를 들어 표 1b에 제시된 예를 들어, 표적 유전자 내)에 대한 기존 gRNA 표적화 서열이 알려져 있는 경우, "인치 워밍(inch worming)" 접근법을 사용하여 일반적으로 게놈에 걸쳐 약 100개 염기쌍(bp)마다 발생하는 PAM 서열에 대한 유전자좌의 양쪽 상의 영역 측면을 스캐닝함으로써 이 식유전자의 표적화 삽입을 위한 추가적인 유전자좌를 식별할 수 있다. PAM 서열은 상이한 뉴클레아제가 일반적으로 상이한 상응하는 PAM 서열을 갖기 때문에 사용되는 특정 Cas 뉴클레아제에 따라 달라질 것이다. 유전자좌의 양쪽 상의 측면 영역은 약 500 내지 4000 bp 길이, 예를 들어, 약 500 bp, 약 1000 bp, 약 1500 bp, 약 2000 bp, 약 2500 bp, 약 3000 bp, 약 3500 bp, 또는 약 4000 bp 길이일 수 있다. PAM 서열이 검색 범위 내에서 식별되는 경우, 새로운 가이드는 유전적 파괴 방법에서 사용하기 위한 해당 유전자좌의 서열에 따라 설계될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템이 예시적으로 기재되어 있지만, 기재된 바와 같은 임의의 유전자-편집 접근법은 ZFN, TALENS, 메가뉴클레아제 및 트랜스포사제를 사용하는 것을 포함하여 새로운 유전자좌를 식별하는 이 방법에 사용될 수 있다.

[0241]

본원에 기재된 유전자의 CRISPR/Cas-기반 표적화에 유용한 추가의 예시적인 Cas9 가이드 RNA 서열은 표 2에 제공되어 있다.

[0242]

표 2. 표적화 유전자에 유용한 추가의 예시적인 Cas9 가이드 RNA 서열

유전자	가이드 서열	PAM	표적 부위	gRNA 절단 부위	서열번호
ABO	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	AGG	엑손 7	chr9:133,257,541	29
FUT1	CUGGAUGUCGGAGGAGUACG	CGG	엑손 4	chr19:48,750,822	30
RHD	GUCUCCGAAACUCGAGGUG	AGG	엑손 2	chr1:25,284,622	31
F3(CD142)	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	GGG	엑손 2	chr1:94,540,281	32
B2M	CGUGAGUAAACCUGAAUCUU	TGG	엑손 2	chr15:44,715,434	33
CIITA	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	TGG	엑손 3	chr16:10,895,747	34
TRAC	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	CGG	엑손 1	chr14:22,5547,533	35

[0243]

[0244]

일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 전사 활성화제-유사 효과가 뉴클레아제(TALEN) 방법론을 사용하여 만들어진다. "TALE-뉴클레아제"(TALEN)란 전형적으로 전사 활성화인자 유사 효과기(TALE)로부터 유래된 핵산-결합 도메인 및 핵산 표적 서열을 절단하기 위한 하나의 뉴클레아제 촉매 도메인으로 이루어진 융합 단백질로 의도된다. 촉매 도메인은 바람직하게는 뉴클레아제 도메인이고 보다 바람직하게는 예를 들면 I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-I와 같은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 도메인이다. 특정 구현예에서, TALE 도메인은 예를 들면 I-CreI 및 I-OnuI와 같은 메가뉴클레아제 또는 이의 기능적 변이체에 융합될 수 있다. 보다 바람직한 구현예에서,

상기 뉴클레아제는 단량체성 TALE-뉴클레아제이다. 단량체성 TALE-뉴클레아제는 WO2012138927에 기재된 I-TevI의 촉매 도메인과 조작된 TAL 반복의 융합과 같은 특이적 인식 및 절단을 위한 이량체화를 필요로 하지 않는 TALE-뉴클레아제이다. 전사 활성인자 유사 효과기(TALE)는 박테리아 중 크산토모나스(Xanthomonas)로부터의 단백질이며 복수의 반복 서열을 포함하고, 각각의 반복부는 핵산 표적화된 서열의 각 뉴클레오티드 염기에 특이적인 위치 12 및 13의 이중 잔기(RVD)를 포함한다. 유사한 모듈식 염기별 핵산 결합 특성(MBBBD)을 갖는 결합 도메인은 또한 상이한 박테리아 중에서 출원인에 의해 최근에 발견된 새로운 모듈식 단백질로부터 유래될 수 있다. 새로운 모듈식 단백질은 TAL 반복부보다 더 많은 서열 가변성을 나타내는 장점을 갖는다. 바람직하게는, 상이한 뉴클레오티드 인식과 연관된 RVD는 C를 인식하는 HD, T를 인식하는 NG, A를 인식하는 NI, G 또는 A를 인식하는 NN, A, C, G 또는 T를 인식하는 NS, T를 인식하는 HG, T를 인식하는 IG, G를 인식하는 NK, C를 인식하는 HA, C를 인식하는 ND, C를 인식하는 HI, G를 인식하는 HN, G를 인식하는 NA, G 또는 A를 인식하는 SN 및 T를 인식하는 YG, A를 인식하는 TL, A 또는 G를 인식하는 VT 및 A를 인식하는 SW이다. 또 다른 구현예에서, 중요한 아미노산 12 및 13은 뉴클레오티드 A, T, C 및 G에 대한 특이성을 조절하고 특히 이 특이성을 향상시키기 위해 다른 아미노산 잔기에 대해 돌연변이될 수 있다. TALEN 키트는 상업적으로 판매된다.

[0245] 일부 구현예에서, 세포는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)를 사용하여 조작된다. "징크 핑거 결합 단백질"은 아연 이온의 배위를 통한 단백질 구조의 안정화 결과로서 바람직하게는 서열-특이적 방식으로 DNA, RNA 및/또는 단백질에 결합하는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 용어 징크 핑거 결합 단백질은 종종 징크 핑거 단백질 또는 ZFP로서 축약된다. 개별 DNA 결합 도메인은 전형적으로 "핑거"로 언급된다. ZFP는 적어도 하나의 핑거, 전형적으로 2개의 핑거, 3개의 핑거, 또는 6개의 핑거를 갖는다. 각 핑거는 DNA의 2 내지 4개의 염기쌍, 전형적으로 DNA의 3 또는 4개의 염기쌍에 결합한다. ZFP는 표적 부위 또는 표적 서그먼트라고 불리는 핵산 서열에 결합한다. 각 핑거는 전형적으로 대략 30개 아미노산, 아연-킬레이트화, DNA-결합 하위도메인을 포함한다. 연구는 이 부류의 단일 징크 핑거가 단일 베타 회전 2개 시스테인 잔기와 함께 아연과 배위되는 2개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하는 알파 나선으로 이루어짐을 입증하였다(예를 들어, Berg & Shi, Science 271:1081-1085(1996) 참조).

[0246] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 호밍 엔도뉴클레아제를 사용하여 만들어진다. 이러한 호밍 엔도뉴클레아제는 당업계에 잘 알려져 있다(Stoddard 2005). 호밍 엔도뉴클레아제는 DNA 표적 서열을 인식하고 단일- 또는 이중-가닥 파손을 생성한다. 호밍 엔도뉴클레아제는 매우 특이적이며, 12 내지 45개 염기쌍(bp) 길이 범위, 일반적으로 14 내지 40 bp 길이 범위의 DNA 표적 부위를 인식한다. 호밍 엔도뉴클레아제는 예를 들어 LAGLIDADG 엔도뉴클레아제, HNH 엔도뉴클레아제, 또는 GIY-YIG 엔도뉴클레아제에 상응할 수 있다. 일부 구현예에서, 호밍 엔도뉴클레아제는 I-CreI 변이체일 수 있다.

[0247] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 메가뉴클레아제를 사용하여 만들어진다. 메가뉴클레아제는 정의에 의해서 큰 서열을 인식하는 서열-특이적 엔도뉴클레아제이다(Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774). 이들은 살아있는 세포에서 고유한 부위를 절단하여, 절단 부위 부근에서 유전자 표적화를 1000-배 이상 향상시킬 수 있다(Puchta 등, Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040; Rouet 등, Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106; Choulika 등, Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968-1973; Puchta 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-5060; Sargent 등, Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 267-77; Donoho 등, Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 4070-4078; Elliott 등, Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 93-101; Cohen-Tannoudji 등, Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444-1448).

[0248] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 염기 편집과 연관된다. 염기 편집기(BE)는 전형적으로 Cas("CRISPR-연관") 도메인 및 핵염기 변형 도메인(예를 들어, 천연 또는 진화된 데아미나제, 예컨대 APOBEC1("아포지단백질 B mRNA 암호화 효소, 촉매 폴리펩티드 1"), CDA("사이티딘 데아미나제"), 및 AID("활성화-유도 사이티딘 데아미나제")를 포함하는 사이티딘 데아미나제) 도메인의 융합이다. 일부 경우에, 염기 편집기는 또한 생성된 단일-뉴클레오티드 변화의 효율성 및/또는 안정성을 증가시키는 세포 DNA 복구 과정을 변경하는 단백질 또는 도메인을 포함할 수 있다.

[0249] 일부 측면에서, 현재 이용가능한 염기 편집기는 표적 C·G를 T·A로 전환하는 사이티딘 염기 편집기(예를 들어, BE4) 및 표적 A·T를 G·C로 전환하는 아데닌 염기 편집기(예를 들어, ABE7.10)를 포함한다. 일부 측면에서, Cas9-표적화 탈아미노화는 이중 가닥 DNA 파손을 도입하지 않고 염기 변화를 유도하도록 설계된 염기 편집기(BE) 시스템과 관련하여 처음으로 입증되었다. 탈활성화된 Cas9(dCas9)에 융합된 추가의 래트 데아미나제 APOBEC1(rAPOBEC1)을 사용하여 sgRNA의 PAM 상류에서 사이티딘을 티미딘으로 성공적으로 전환하였다. 일부 측면에서, 이 첫번째 BE 시스템은 dCas9를 탈아미노화 사이티딘 반대 가닥에 닉을 형성하는 "닉카제" Cas9 D10A로 바꿈으로써 최적화되었다. 이론에 얽매이지 않고, 이는 긴-패치 염기 절제 복구(BER)를 개시할 것으로

예상되며, 여기서 탈아미노화 가닥은 복구를 주형화하여 U:A 염기쌍을 생성한 다음, DNA 복제 동안 T:A로 전환되는 것에 우선적으로 사용된다.

[0250] 일부 구현예에서, 염기 편집기는 촉매적으로 불활성인 제1 DNA 결합 단백질 도메인, 염기 편집 활성을 갖는 도메인, 및 니카제 활성을 갖는 제2 DNA 결합 단백질을 함유하는 핵염기 편집기이며, 여기서 DNA 결합 단백질 도메인은 단일 융합 단백질 상에서 발현되거나 별도로(예를 들어, 별도의 발현 벡터 상에서) 발현된다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 염기 편집 활성을 갖는 도메인(예를 들어, 사이티딘 데아미나제 또는 아데노신 데아미나제), 및 첫번째는 니카제 활성을 갖고 두번째는 촉매적으로 불활성인 napDNAbp인 2개의 핵산 프로그램 가능한 DNA 결합 단백질 도메인(napDNAbp)을 포함하는 융합 단백질이며, 여기서 적어도 2개의 napDNAbp는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 니카제 활성을 갖는 CRISPR-Cas(예를 들어, Cas9)의 DNA 도메인(nCas; nCas9), 핵산 프로그램 가능한 DNA 결합 활성을 갖는 CRISPR-Cas 단백질(예를 들어, Cas9)의 촉매적으로 불활성인 도메인(dCas; 예를 들어, dCas9), 및 데아미나제 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 여기서 dCas는 링커에 의해 nCas에 연결되고, dCas는 데아미나제 도메인에 바로 인접하다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 아데닌에서 티민으로 또는 "ATBE"(또는 티민에서 아데닌으로 또는 "TABE") 염기전환(transversion) 염기 편집기이다. 예시적인 염기 편집기 및 염기 편집기 시스템은 특허 공개 번호 US20220127622, US20210079366, US20200248169, US20210093667, US20210071163, W02020181202, W02021158921, W02019126709, W02020181178, W02020181195, W02020214842, W02020181193에 기재된 것 중 임의의 것을 포함하며, 이는 그 전문이 본원에 포함된다.

[0251] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 표적-프라임 역전사(TPRT) 또는 "프라임 편집"이다. 일부 구현예에서, 프라임 편집은 DSB 또는 공여자 DNA 주형을 필요로 하지 않고 인간 세포에서 표적화 삽입, 결실, 모든 12개의 가능한 염기쌍 전환, 및 이의 조합을 매개한다.

[0252] 프라임 편집은 중합효소와 회합하여 작동하는 핵산 프로그램 가능한 DNA 결합 단백질("napDNAbp")(즉, 융합 단백질 형태 또는 달리 napDNAbp와 트랜스로 제공됨)을 사용하여 명시된 DNA 부위에 새로운 유전적 정보를 직접 기록하는 게놈 편집 방법이며, 여기서 프라임 편집 시스템은 표적 부위를 명시하고 원하는 편집의 합성을 가이드 RNA로 조작된(예를 들어, 5' 또는 3' 단부에서, 또는 가이드 RNA의 내부 부분에서) 연장에 의해 대체 DNA 형태(DNA 또는 RNA)로 주형화하는 프라임 편집(PE) 가이드 RNA("PEgRNA")로 프로그램화된다. 원하는 편집(예를 들어, 단일 핵염기 치환)을 함유하는 대체 가닥은 (원하는 편집을 포함한다는 점은 제외하고) 편집될 표적 부위의 내인성 가닥과 동일한 서열을 공유한다. DNA 복구 및/또는 복제 기계를 통해, 표적 부위의 내인성 가닥은 원하는 편집을 함유하는 새로 합성된 대체 가닥에 의해 대체된다. 일부 경우에, 프라임 편집은 프라임 편집기가 편집될 원하는 표적 부위를 검색하여 찾아내고 동시에 상응하는 표적 부위 내인성 DNA가닥 대신에 설치된 원하는 편집을 함유하는 대체 가닥을 암호화하므로 "검색 및 대체" 게놈 편집 기술로서 여겨질 수 있다. 예를 들어, 프라임 편집은 이중 가닥 파손을 우회하기 위해 정밀한 CRISPR/Cas-기반 게놈 편집을 수행하도록 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상동 단백질은 Cas 단백질-역전사효소 융합 또는 관련 시스템이거나 이를 암호화하여 특이적 DNA 서열을 가이드 RNA로 표적하고, 표적 부위에서 단일 가닥 틈을 생성하고, 틈 DNA를 가이드 RNA와 통합된 조작된 역전사효소 주형의 역전사를 위한 프라이머로서 사용한다. 일부 구현예에서, 프라임 편집기 단백질은 게놈 DNA의 반대 가닥에 있는 상보적 DNA 플랩의 합성을 주형으로 하는 2개의 프라임 편집 가이드 RNA(pegRNA)와 쌍을 이루어 PE-유도 틈 부위 사이에 내인성 DNA 서열을 pegRNA-암호화 서열로 대체한다.

[0253] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 역전사효소, 또는 당업계에 알려진 임의의 DNA 중합효소인 프라임 편집기와 연관된다. 따라서, 하나의 측면에서, 프라임 편집기는 표적 DNA에서 상보적 프로토스페이서에 어닐링하는 스페이서 서열을 함유하는 전문화 가이드 RNA(즉, PEgRNA)와 회합함으로써 DNA 서열을 표적하도록 프로그램화된 Cas9(또는 동등한 napDNAbp)를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 Anzalone 등, (doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4), 또는 PCT 공개 번호 W02020191248, W02021226558, 또는 W02022067130에 개시된 임의의 것을 포함하며, 이는 그 전문이 본원에 포함된다.

[0254] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램화가능 추가(PASTE)이다. 일부 측면에서, PASTE는 역전사효소 및 세린 인테그라제 둘 다에 융합된 CRISPR-Cas9 니카제를 통해 지시되는 플랫폼이다. Ioannidi 등(doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)에 기재된 바와 같이, PASTE는 이중 가닥 파손을 생성하지 않지만, ~36 kb 큰 서열의 통합을 허용한다. 일부 구현예에서, 세린 인테그라제는 당업계에 알려진 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 세린 인테그라제는 PASTE가 다중화된 유전자 통합에 사용될 수 있도록 충분한 직교성을 가지며, 동시에 적어도 2개의 게놈 유전자좌에서 적어도 2개의 상이한 유전자를 통합한다. 일부 구현예에서, PASTE는 비분할 세포에서의 활성 및 더 적은 검출가능한 표적의 사건과 함께, 상동성 지시 복구 또는

비상동 말단 연결 기반 통합의 것과 필적할만하거나 더 나은 편집 효율성을 갖는다.

[0255] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 폴리펩티드의 발현을 녹다운(예를 들어, 감소, 제거, 또는 억제)하기 위해 RNA 침묵 또는 RNA 간섭(RNAi)을 사용하여 만들어진다. 유용한 RNAi 방법은 합성 RNAi 분자, 짧은 간섭 RNA(siRNA), PIWI-상호작용 NRA(piRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), microRNA(miRNA), 및 당업자에 의해 인식되는 다른 일시적 녹다운 방법을 활용하는 것들을 포함한다. 서열 특이적 shRNA, siRNA, miRNA 등을 포함하는 RNAi에 대한 시약은 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, 위에 기재된 임의의 것과 같은 표적 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 CIITA, B2M, 또는 NLRC5는 siRNA와 같은 표적 폴리뉴클레오티드의 표적 모티프에 상보적인 억제 핵산을 세포 내로 도입함으로써 RNA 간섭에 의해 세포에서 녹다운될 수 있다. 일부 구현예에서, 위에 기재된 임의의 것과 같은 표적 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 CIITA, B2M, 또는 NLRC5는 shRNA-발현 바이러스를 세포에 형질도입함으로써 세포에서 녹다운될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 간섭을 이용하여 CIITA, B2M, 및 NLRC5로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 발현을 감소시키거나 억제한다.

[0256] 일부 구현예에서, 유전자 변형과 같은 변형은 보조 쇠(accessory chain) B2M, B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 및/또는 NFY-C 및 이의 임의의 조합을 표적함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 유전자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 유전자의 발현을 녹아웃시키는 것과 같이 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소되거나 제거된 발현은 다음 중 하나 이상을 녹아웃시키는 것과 같이 발현을 감소시키는 변형이다: B2M, B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B 및/또는 NFY-C.

[0257] **2. 예시적인 표적 폴리뉴클레오티드 및 발현을 감소시키는 방법**

[0258] *a. MHC 클래스 I 분자*

[0259] 특정 구현예에서, 유전자 변형과 같은 변형은 보조 쇠 B2M를 표적함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 유전자의 발현을 녹아웃시키는 것과 같이 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 발생한다. B2M의 발현을 녹아웃과 같이 감소시키거나 제거함으로써, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 표면 교환이 차단되고 이러한 세포는 수용자 대상체에 생착될 때 면역 관용을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 투여 시 수용자 대상체 또는 환자에서 저면역원성인 것으로 간주된다.

[0260] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 변이체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 상동체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 오솔로그(ortholog)이다.

[0261] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소되거나 제거된 발현은 다음 MHC 클래스 I 분자 - HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C 중 하나 이상의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, B2M의 감소되거나 제거된 발현은 다음 MHC 클래스 I 분자 - HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-A 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-B 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-C 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소되거나 제거된 발현은 상기 분자를 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써, 다음 MHC 클래스 I 분자 - HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, HLA-A 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-A 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-B 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-B 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-C 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다.

[0262] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 B2M 유전자를 표적화하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 표적화하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 B2M 유전자를 특이적으로 표적하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템을 사용함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 특이적으로 표적하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열(예를 들어 gRNA 표적화 서열)은 WO2016/183041의 부록 2 또는 표 15의 서열번호:81240-85644로 이루어진 군으로부터 선택되며, 개시내용은 그의 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 gRNA 표적화 서열은

CGUGAGUAAACCCUGAAUCUU(서열번호: 33)이다.

- [0263] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 또 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산 또는 이식유전자는 B2M 유전자에 삽입된다. B2M 유전자 좌에서 표적화 삽입을 위한 예시적인 이식유전자는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다.
- [0264] B2M 유전자가 불활성화되었는지 여부를 테스트하는 검정은 알려져 있고 본원에 기재되어 있다. 하나의 구현예에서, B2M 유전자의 생성된 유전자 변형은 PCR에 의해 평가된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I, 예컨대 HLA-I 발현의 감소는 유세포 분석법, 예컨대 FACS 분석에 의해 검정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, B2M 단백질 발현은 B2M 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 유전자 변형과 같은 불활성화 변형의 존재를 확인하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 발현의 감소는 면역조직화학 또는 면역세포화학과 같은 면역진화성 기술을 사용하여 평가된다.
- [0265] 일부 구현예에서, 조작된 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 발현 또는 기능(세포가 인간 세포로부터 유래된 경우 HLA I)의 감소는 당업계에 알려진 기술; 예를 들어, HLA 복합체에 결합하는 표지된 항체를 사용한 FACS 기술을 사용하여; 예를 들어, 인간 주요 조직적합성 HLA 클래스 I 항원의 알파쇄에 결합하는 상업적으로 입수 가능한 HLA-A, B, C 항체를 사용하여 측정될 수 있다. 게다가, 세포는 HLA I 복합체가 세포 표면 상에서 발현되지 않는다는 점을 확인하기 위해 테스트될 수 있다. 이는 상기 논의된 바와 같은 하나 이상의 HLA 세포 표면 구성요소에 대한 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 검정될 수 있다. HLA I(또는 MHC 클래스 I)의 감쇠 외에도, 본원에 제공된 조작된 세포는 대식세포 식세포작용 및 NK 세포 사멸에 대한 감소된 감수성을 갖는다. 조작된 세포에 대한 저면역원성 표현형을 검정하는 방법은 아래에 추가로 기재되어 있다.
- [0266] 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 B2M mRNA 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, B2M mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, B2M mRNA 발현을 감소시키는 변형은 B2M 유전자 활성을 제거한다.
- [0267] 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 B2M 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, B2M 단백질의 0% 발현). 일부 구현예에서, B2M 단백질 발현을 감소시키는 변형은 B2M 유전자 활성을 제거한다.
- [0268] 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 B2M 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 B2M 유전자의 하나의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0269] 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 세포 내 하나 이상의 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M 유전자에 indel을 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M 유전자의 게놈 DNA의 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M 유전자의 게놈 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변형은 B2M 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, B2M 유전자는 녹아웃된다.
- [0270] b. MHC 클래스 II 분자

- [0271] 특정 측면에서, 유전자 변형과 같은 변형은 클래스 II 분자 트랜스활성인자(CIITA) 발현을 표적화함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 유전자의 발현을 녹아웃시키는 것과 같이 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 수행된다. CIITA는 단백질의 LR 또는 뉴클레오티드 결합 도메인 (NBD) 류신 풍부 반복부(LRR) 계열의 구성원이며 MHC 인헨세오솜과 회합함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 전사를 조절한다. CIITA의 발현을 녹아웃시키는 것과 같이 감소시키거나 제거함으로써, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현이 감소되어 표면 발현을 또한 감소시킨다. 일부 경우에, 이러한 세포는 수용자 대상체에 생착될 때 면역 관용을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 투여 시 수용자 대상체 또는 환자에서 저면역원성인 것으로 간주된다.
- [0272] 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 변이체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 상동체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 오솔로그이다.
- [0273] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소되거나 제거된 변형은 다음 MHC 클래스 II 분자 - HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, 및 HLA-DR 중 하나 이상의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 또는 제거된 발현은 다음 MHC 클래스 II 분자 - HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, 및 HLA-DR 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-DP 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-DM 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-DOA 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-DOB 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 HLA-DR 단백질의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소되거나 제거된 발현은 상기 분자를 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써, 다음 MHC 클래스 II 분자 - HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, 및 HLA-DR 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, HLA-DP 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-DP 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-DM 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-DM 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-DOA 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-DOA 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-DOB 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-DOB 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다. 일부 구현예에서, HLA-DR 단백질을 암호화하는 유전자는 상기 HLA-DR 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하도록 녹아웃된다.
- [0274] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 CIITA 유전자를 표적화하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 표적화하는 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열(예를 들어 gRNA 표적화 서열)은 WO2016183041의 부록 1 또는 표 12의 서열번호:5184-36352로 이루어진 군으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 gRNA 표적화 서열은 GAUUAUGGCAUAAGCCUCCC(서열번호: 34)이다.
- [0275] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 또 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산 또는 이식유전자는 CIITA 유전자에 삽입된다. B2M 유전자좌에서 표적화 삽입을 위한 예시적인 이식유전자는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다.
- [0276] CIITA 유전자가 불활성화되었는지 여부를 테스트하는 검정은 알려져 있고 본원에 기재되어 있다. 하나의 구현예에서, CIITA 유전자의 생성된 유전자 변형은 PCR에 의해 평가된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 예컨대 HLA-II 발현의 감소는 유세포 분석법, 예컨대 FACS 분석에 의해 검정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, CIITA 단백질 발현은 CIITA 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 유전자 변형과 같은 불활성화 변형의 존재를 확인하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현의 감소는 면역조직화학 또는 면역세포화학과 같은 면역친화성 기술을 사용하여 평가된다.
- [0277] 일부 구현예에서, 조작된 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현 또는 기능(세포가 인간 세포로부터 유

래된 경우 HLA II)의 감소는 단백질에 대한 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅, FACS 기술, RT-PCR 기술 등과 같은 당업계에 알려진 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 HLA II 복합체가 세포 표면 상에서 발현되지 않는다는 점을 확인하기 위해 테스트될 수 있다. 표면 발현을 평가하는 방법은 당업계에 알려진 방법을 포함하고(예를 들어 WO2018132783의 도 21 참조) 일반적으로 인간 HLA 클래스 II HLA-DR, DP 및 대부분의 DQ 항원에 결합하는 상업용 항체에 기반한 웨스턴 블롯 또는 FACS 분석을 사용하여 수행된다. 하나 이상의 HLA 클래스 II 분자(또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자)의 감소 외에도, 본원에 제공된 조작된 세포는 대식세포 식세포작용 및 NK 세포 사멸에 대한 감소된 감수성을 갖는다. 조작된 세포의 저면역원성 표현형을 검증하는 방법은 아래에 추가로 기재되어 있다.

[0278] 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 CIITA mRNA 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, CIITA mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, CIITA mRNA 발현을 감소시키는 변형은 CIITA 유전자 활성을 제거한다.

[0279] 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 CIITA 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, CIITA 단백질이 0% 발현). 일부 구현예에서, CIITA 단백질 발현을 감소시키는 변형은 CIITA 유전자 활성을 제거한다.

[0280] 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 CIITA 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형은 CIITA 유전자의 하나의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형은 CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0281] 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 세포 내 하나 이상의 CIITA 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 CIITA 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 CIITA 유전자에 indel을 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 CIITA 유전자의 게놈 DNA의 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 CIITA 유전자의 게놈 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변형은 CIITA 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자는 녹아웃는다.

[0282] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 T 세포 수용체 알파 불변(TRAC) 유전자를 표적화하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 표적화하는 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TRAC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열은 US20160348073의 서열번호:532-609 및 9102-9797로 이루어진 균으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 gRNA 표적화 서열은 AGAGUCUCUCAGCUGGUACA(서열번호: 35)이다.

[0283] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 또 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산 또는 이식유전자는 TRAC 유전자에 삽입된다. TRAC 유전자좌에서 표적화 삽입을 위한 예시적인 이식유전자는 섹션 II.B에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다.

[0284] TRAC 유전자가 불활성화되었는지 여부를 테스트하는 검정은 알려져 있고 본원에 기재되어 있다. 하나의 구현예에서, PCR에 의한 TRAC 유전자의 생성된 변형 및 HLA-II 발현의 감소는 유세포 분석법, 예컨대 FACS 분석에 의

해 검정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, TRAC 단백질 발현은 TRAC 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 불활성화 변형의 존재를 확인하는 데 사용된다.

[0285] 일부 구현예에서, TRAC 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 TRAC mRNA 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, TRAC의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, TRAC의 mRNA 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRAC의 mRNA 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRAC의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRAC의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, TRAC mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, TRAC mRNA 발현을 감소시키는 변형은 *TRAC* 유전자 활성을 제거한다.

[0286] 일부 구현예에서, TRAC 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 TRAC 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, TRAC의 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, TRAC의 단백질 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRAC의 단백질 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRAC의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRAC의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, TRAC 단백질의 0% 발현). 일부 구현예에서, TRAC 단백질 발현을 감소시키는 변형은 *TRAC* 유전자 활성을 제거한다.

[0287] 일부 구현예에서, TRAC 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 *TRAC* 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 발현을 감소시키는 변형은 *TRAC* 유전자의 하나의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 발현을 감소시키는 변형은 *TRAC* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 세포 내 하나 이상의 TRAC 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 TRAC 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *TRAC* 유전자에 indel을 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *TRAC* 유전자의 게놈 DNA의 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 *TRAC* 유전자의 게놈 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변형은 *TRAC* 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, *TRAC* 유전자는 녹아웃된다.

[0289] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 T 세포 수용체 베타 불변(TRBC) 유전자를 표적화하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자를 표적화하는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TRBC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템에 의해 이루어진다.

[0290] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 또 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산 또는 이식유전자는 TRBC 유전자에 삽입된다. TRBC 유전자좌에서 표적화 삽입을 위한 예시적인 이식유전자는 섹션 II.B에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열은 US20160348073의 서열번호:610-765 및 9798-10532로 이루어진 균으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0291] TRBC 유전자가 불활성화되었는지 여부를 테스트하는 검정은 알려져 있고 본원에 기재되어 있다. 하나의 구현예에서, PCR에 의한 TRBC 유전자의 생성된 변형 및 HLA-II 발현의 감소는 유세포 분석법, 예컨대 FACS 분석에 의해 검정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, TRBC 단백질 발현은 TRBC 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 불활성화 변형의 존재를 확인하는 데 사용된다.

[0292] 일부 구현예에서, TRBC 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 TRBC mRNA 발현을 감소시킨다. 일부

구현예에서, TRAC의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, TRBC의 mRNA 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRBC의 mRNA 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRBC의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRBC의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, TRBC mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, TRBC mRNA 발현을 감소시키는 변형은 TRBC 유전자 활성을 제거한다.

[0293] 일부 구현예에서, TRBC 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 TRBC 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, TRAC의 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 야생형 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, TRBC의 단백질 발현은 약 5% 초과만큼 감소되며, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRBC의 단백질 발현은 최대 약 100%만큼 감소되며, 예컨대 최대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRBC의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 임의의 것만큼 감소된다. 일부 구현예에서, TRBC의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, TRBC 단백질의 0% 발현). 일부 구현예에서, TRBC 단백질 발현을 감소시키는 변형은 TRBC 유전자 활성을 제거한다.

[0294] 일부 구현예에서, TRBC 발현을 감소시키는 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 TRBC 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, TRBC 발현을 감소시키는 변형은 TRBC 유전자의 하나의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, TRBC 발현을 감소시키는 변형은 TRBC 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0295] 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 세포 내 하나 이상의 TRBC 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 모든 TRBC 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 TRBC 유전자에 indel을 포함하는 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 TRBC 유전자의 게놈 DNA의 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 TRBC 유전자의 게놈 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변형은 TRBC 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실이다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자는 녹아out된다.

[0296] **B. 폴리뉴클레오티드의 과발현**

[0297] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 예컨대 하나 이상의 변형을 1차 세포와 같은 세포 내로 도입하여 세포에서 원하는 폴리뉴클레오티드를 과발현함으로써 유전자 변형되거나 조작된다. 일부 구현예에서, 변형되거나 조작될 1차 세포와 같은 세포는 폴리뉴클레오티드 비변형된 세포 또는 비조작된 세포(예를 들어 비변형된 1차 세포 또는 비조작된 1차 세포)이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 외인성 단백질(또한 용어 "이식유전자"와 상호교환가능하게 사용됨)을 암호화하는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 유전자 변형된다. 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 세포는 수용자에서 면역 인식 및 관용에 영향을 미치는 관용원성(예를 들어, 면역) 인자인 특정 유전자의 발현을 증가시키도록 변형된다. 일부 구현예에서, T 세포 또는 NK 세포와 같은 제공된 조작된 1차 세포는 또한 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 외인성 폴리뉴클레오티드는 상기 섹션 I.A에 기재된 표적 폴리뉴클레오티드, 예컨대 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 유전자 변형과 함께 조작된 세포에서 발현(예를 들어 과발현)될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 제공된 조작된 세포는 수용자 대상체에게 투여 시 면역 반응을 촉발하거나 활성화하지 않는다.

[0298] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 과발현된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 과발현된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 과발현된 폴리뉴클레오티드는 외인성 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 과발현된 폴리뉴클레오티드는 1차 세포에서 에피솜으로 발현되는 외인성 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에

서, 과발현된 폴리뉴클레오티드는 조작된 1차 세포의 하나 이상의 게놈 유전자좌로 삽입되거나 통합되는 외인성 폴리뉴클레오티드이다.

[0299] 일부 구현예에서, DNA-표적화 도메인 및 전사 활성인자를 함유하는 융합 단백질을 사용하여 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가되며, 즉 폴리뉴클레오티드는 과발현된다. 트랜스활성인자 도메인을 사용하여 발현을 증가시키는 표적화된 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0300] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드가 비표적화 삽입 방법, 예컨대 렌티바이러스 벡터를 사용한 형질도입에 의해 세포의 게놈 유전자좌로 삽입되거나 통합되는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 piggyBac 트랜스포존(transposon)을 포함한다. 전위 동안, piggyback 트랜스포존은 렌티바이러스 벡터에서 트랜스포존-특이적 도립된 말단 반복부(ITR)를 인식하여 벡터 내용물의 TTAA 염색체 부위로의 효율적인 이동 및 통합을 허용한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 표적화 삽입 방법, 예컨대 상동성 지시 복구(HDR)를 사용함으로써 1차 세포와 같은 세포의 게놈에 삽입되거나 통합된다. 임의의 적합한 방법이 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하여 HDR에 의해 1차 세포와 같은 조작된 세포의 게놈 유전자좌에 외인성 폴리뉴클레오티드를 삽입하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 게놈 유전자좌, 예컨대 본원에 기재된 임의의 게놈 유전자좌(예를 들어 표 4)에 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 동일한 게놈 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 상이한 게놈 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 중 2개 이상은 동일한 게놈 유전자좌, 예컨대 본원에 기재된 임의의 게놈 유전자좌(예를 들어 표 4)에 삽입된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 상이한 게놈 유전자좌, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 2개 이상의 게놈 유전자좌(예를 들어, 표 4)에 삽입된다.

[0301] 예시적인 폴리뉴클레오티드 또는 과발현, 및 이를 과발현하는 방법은 다음 하위섹션에 기재되어 있다.

[0302] **1. 관용원성 인자**

[0303] 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현은 세포, 예를 들어 1차 세포에서 과발현되거나 증가된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현, 즉 과발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 면역계(예를 들어 선천성 또는 적응성 면역계)에 의해 조작된 세포에 대한 관용을 촉진하거나 유도하는 것을 촉진하거나 기여하는 임의의 인자이다.

[0304] 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1, 또는 Serpinb9로 이루어진 군으로부터 선택된 t이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 DUX4, B2M-HLA-E, CD35, CD52, CD16, CD52, CD47, CD46, CD55, CD59, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, SERPINB9, CD35, IL-39, CD16 Fc 수용체, IL15-RF, 및 H2-M3이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200 또는 Mfge8, 또는 이의 임의의 조합이다. 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 세포는 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 적어도 하나의 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나는 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다. 수용자 대상체에게 투여 시 면역 반응을 촉발하거나 활성화하지 않는 세포가 본원에 제공된다. 상기 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 세포는 수용자에서 면역 인식 및 관용에 영향을 미치는 유전자 및 관용원성(예를 들어, 면역) 인자의 발현을 증가시키도록 변형된다.

[0305] 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현(예를 들어, 표면 발현)은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 10% 또는 그 이상만큼 증가되며, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 99% 또는 그 이하만큼 증가되며, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 10% 내지 약 100%, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형과 비교하여 약 10% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 60%, 약 50% 내지 약 80%, 및 약 70% 내지 약 100%

중 임의의 것만큼 증가된다.

[0306] 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현(예를 들어, 표면 발현)은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 2-배 또는 그 이상, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 4-배 또는 그 이상, 6-배 또는 그 이상, 8-배 또는 그 이상, 10-배 또는 그 이상, 15-배 또는 그 이상, 20-배 또는 그 이상, 30-배 또는 그 이상, 40-배 또는 그 이상, 50-배 또는 그 이상, 60-배 또는 그 이상, 70-배 또는 그 이상, 80-배 또는 그 이상, 90-배 또는 그 이상, 100-배 또는 그 이상, 150-배 또는 그 이상, 및 200-배 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 200-배 또는 그 이하, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 150-배 또는 그 이하, 100-배 또는 그 이하, 90-배 또는 그 이하, 80-배 또는 그 이하, 70-배 또는 그 이하, 60-배 또는 그 이하, 50-배 또는 그 이하, 40-배 또는 그 이하, 30-배 또는 그 이하, 15-배 또는 그 이하, 10-배 또는 그 이하, 8-배 또는 그 이하, 6-배 또는 그 이하, 4-배 또는 그 이하, 및 2-배 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 2-배 내지 약 200-배, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 2-배 내지 약 20-배, 약 10-배 내지 약 50-배, 약 30-배 내지 약 70-배, 약 50-배 내지 약 100-배, 약 80-배 내지 약 150-배, 및 약 120-배 내지 약 200-배 중 임의의 것만큼 증가된다.

[0307] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 CD47과 같은 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절 폴리펩티드)를 발현하도록 변형된 1차 세포와 같은 세포, 또는 이의 집단을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 CD47과 같은 관용원성 인자(예를 들어 면역조절 폴리펩티드)를 발현하도록 세포 계능을 변경하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 외인성 CD47과 같은 외인성 관용원성 인자(예를 들어 면역조절 폴리펩티드)를 발현한다. 일부 경우에, 외인성 폴리뉴클레오티드의 과발현 또는 발현 증가는 인간 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 1차 세포 내로 도입(예를 들어 세포를 형질도입)함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터일 수 있거나 비바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 세포는 외인성 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나가 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 조작된다. 일부 구현예에서, DUX4, B2M-HLA-E, CD35, CD52, CD16, CD52, CD47, CD46, CD55, CD59, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, SERPINB9, CD35, IL-39, CD16 Fc 수용체, IL15-RF, 및 H2-M3(이의 임의의 조합 포함). 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200, 및 Mfge8(이의 임의의 조합 포함) 중 하나 이상이다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나는 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0308] 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 세포는 인간 CD47과 같은 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CD47은 세포, 예를 들어 1차 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은 참조 또는 비변형된 세포와 같은 변형으로 조작되지 않은 동일한 세포 유형의 유사한 세포, 예를 들어 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드로 조작되지 않은 1차 세포와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 과발현되거나 증가된다. CD47은 백혈구 표면 항원이며 세포 부착 및 인테그린 조절에서 역할을 한다. 이는 세포 표면에서 정상적으로 발현되며 순환 대식세포에 세포를 먹지 말라는 신호를 보낸다. 인간 CD47에 대한 유용한 계능, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, NP_001768.1, NP_942088.1, NM_001777.3 및 NM_198793.2에 제공된다.

[0309] 일부 구현예에서, CD47의 발현(예를 들어, 표면 발현)은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 10%만큼 증가되며, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 99% 또는 그 이하만큼 증가되며, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 10% 내지 약 100%, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 10% 내지 약 40%, 약 20% 내지 약 60%, 약 50% 내지 약 80%, 및 약 70% 내지 약 100% 중 임의의 것만큼 증가된다.

[0310] 일부 구현예에서, CD47의 발현(예를 들어, 표면 발현)은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 2-배 또는 그 이상, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 4-배 또는

그 이상, 6-배 또는 그 이상, 8-배 또는 그 이상, 10-배 또는 그 이상, 15-배 또는 그 이상, 20-배 또는 그 이상, 30-배 또는 그 이상, 40-배 또는 그 이상, 50-배 또는 그 이상, 60-배 또는 그 이상, 70-배 또는 그 이상, 80-배 또는 그 이상, 90-배 또는 그 이상, 100-배 또는 그 이상, 150-배 또는 그 이상, 및 200-배 또는 그 이상 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 200-배 또는 그 이하, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 150-배 또는 그 이하, 100-배 또는 그 이하, 90-배 또는 그 이하, 80-배 또는 그 이하, 70-배 또는 그 이하, 60-배 또는 그 이하, 50-배 또는 그 이하, 40-배 또는 그 이하, 30-배 또는 그 이하, 15-배 또는 그 이하, 10-배 또는 그 이하, 8-배 또는 그 이하, 6-배 또는 그 이하, 4-배 또는 그 이하, 및 2-배 또는 그 이하 중 임의의 것만큼 증가된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 2-배 내지 약 200-배, 예컨대 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포와 비교하여 약 2-배 내지 약 20-배, 약 10-배 내지 약 50-배, 약 30-배 내지 약 70-배, 약 50-배 내지 약 100-배, 약 80-배 내지 약 150-배, 및 약 120-배 내지 약 200-배 중 임의의 것만큼 증가된다.

[0311] 일부 구현예에서, 본원에 요약된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상)을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 요약된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 번호 NM_001777.3 및 NM_198793.2에 제시된 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성(예를 들어, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상)을 갖는 CD47에 대한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NM_001777.3 및 NM_198793.2에 제시된 바와 같은 CD47에 대한 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0312] 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상)을 갖는 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 요약된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 포함한다.

[0313] 일부 구현예에서, 세포는 서열번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상)을 갖는 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열번호: 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상)을 갖는 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열번호: 2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 포함한다.

[0314] 특정 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0315] 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 아래에 추가로 기재된 바와 같은 표적화 또는 비표적화 삽입 방법에 의해 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 표적화 삽입은 게놈(유전자) 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입에 의해서와 같은 표적 유전자좌로의 상동성 의존적 삽입에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 게놈 유전자좌 각각은 *MICA* 유전자 유전자좌, *MICB* 유전자 유전자좌, *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌, *CD142* 유전자 유전자좌, *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C*(AAVS1로도 알려짐) 유전자 유전자좌, 알부민 유전자 유전자좌, *SHS231* 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, *ROSA26* 유전자 유전자좌, *LRP1* 유전자 유전자좌, *HMGB1* 유전자 유전자좌, *ABO* 유전자 유전자좌, *RHD* 유전자 유전자좌, *FUT1* 유전자 유전자좌, 및 *KDM5D* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 게놈 유전자좌 각각은 *B2M* 유전자좌, *TAP1* 유전자좌, *CIITA* 유전자좌, *TRAC* 유전자좌, *TRBC* 유전자좌, *MIC-A* 유전자좌, *MIC-B* 유전자좌, 및 안전한 항구 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 안전한 항구 유전자좌는 *AAVS1*, *ABO*, *CCR5*, *CLYBL*, *CXCR4*, *F3*, *FUT1*, *HMGB1*, *KDM5D*, *LRP1*, *MICA*, *MICB*, *RHD*, *ROSA26*, 및 *SHS231* 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0316] 일부 구현예에서, 표적화 삽입은 표 1b, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌, 예를 들어 B2M 유전자, CIITA 유전자, TRAC 유전자, TRBC 유전자 중 임의의 하나에 삽입에 의해서와 같이 표적 유전자좌로의 상동성 의존적 삽입에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 표적화 삽입은 안전한 항구 유전자좌로의 삽입에 의해서와 같은 상동

성 의존적 삽입에 의해 이루어진다. 일부 경우에, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다.

[0317] 특정 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌 또는 CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 T 세포이고 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이고 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.

[0318] 일부 구현예에서, CD47 단백질 발현은 CD47 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 CD47 mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.

[0319] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 CD200과 같은 CD200을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CD200은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CD200의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 CD200을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고, 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 CD200에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC03P112332, HGNC 번호 7203, NCBI 유전자 ID 4345, Uniprot 번호 P41217, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_001004196.2, NM_001004196.3, NP_001305757.1, NM_001318828.1, NP_005935.4, NM_005944.6, XP_005247539.1, 및 XM_005247482.2에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0320] 일부 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 B2M 유전자 유전자좌 또는 CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.

[0321] 일부 구현예에서, CD200 단백질 발현은 CD200 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 CD200 mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.

[0322] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 HLA-E와 같은 HLA-E를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, HLA-E는 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, HLA-E의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 HLA-E를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 HLA-E에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC06P047281, HGNC 번호 4962, NCBI 유전자 ID 3133, Uniprot 번호 P13747, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_005507.3 및 NM_005516.5에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로

모터에 작동가능하게 연결된다.

- [0323] 일부 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌, CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.
- [0324] 일부 구현예에서, HLA-E 단백질 발현은 HLA-E 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 HLA-E mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.
- [0325] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 HLA-G와 같은 HLA-G를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, HLA-G는 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, HLA-G의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 HLA-G를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 HLA-G에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC06P047256, HGNC 번호 4964, NCBI 유전자 ID 3135, Uniprot 번호 P17693, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_002118.1 및 NM_002127.5에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0326] 일부 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1b, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌 또는; CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.
- [0327] 일부 구현예에서, HLA-G 단백질 발현은 HLA-G 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 HLA-G mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.
- [0328] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 PD-L1과 같은 PD-L1을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, PD-L1은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, PD-L1의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 PD-L1을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 PD-L1 또는 CD274에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC09P005450, HGNC 번호 17635, NCBI 유전자 ID 29126, Uniprot 번호 Q9NZQ7, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_001254635.1, NM_001267706.1, NP_054862.1, 및 NM_014143.3에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0329] 일부 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는

B2M 유전자 유전자좌, CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.

[0330] 일부 구현예에서, PD-L1 단백질 발현은 PD-L1 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 PD-L1 mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.

[0331] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 FasL과 같은 FasL을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, FasL은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, FasL의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 FasL을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포에서 증가된다. 인간 Fas 리간드(FasL, FASLG, CD178, TNFSF6 등으로 알려진 것)에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC01P172628, HGNC 번호 11936, NCBI 유전자 ID 356, Uniprot 번호 P48023, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_000630.1, NM_000639.2, NP_001289675.1, 및 NM_001302746.1에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0332] 일부 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌 또는 CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.

[0333] 일부 구현예에서, Fas-L 단백질 발현은 Fas-L 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 Fas-L mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.

[0334] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 CCL21과 같은 CCL21을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CCL21은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CCL21의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 CCL21을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 CCL21에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC09M034709, HGNC 번호 10620, NCBI 유전자 ID 6366, Uniprot 번호 000585, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_002980.1 및 NM_002989.3에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0335] 일부 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌, CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.

[0336] 일부 구현예에서, CCL21 단백질 발현은 CCL21 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 CCL21 mRNA의 존재를 확

인하는 데 사용된다.

- [0337] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 CCL22와 같은 CCL22를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CCL22는 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CCL22의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 CCL22를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 CCL22에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC16P057359, HGNC 번호 10621, NCBI 유전자 ID 6367, Uniprot 번호 O00626, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_002981.2, NM_002990.4, XP_016879020.1, 및 XM_017023531.1에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0338] 일부 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌, CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.
- [0339] 일부 구현예에서, CCL22 단백질 발현은 CCL22 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 CCL22 mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.
- [0340] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 Mfge8과 같은 Mfge8을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, Mfge8은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, Mfge8의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 Mfge8을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 Mfge8에 대한 유용한 게놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC15M088898, HGNC 번호 7036, NCBI 유전자 ID 4240, Uniprot 번호 Q08431, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_001108086.1, NM_001114614.2, NP_001297248.1, NM_001310319.1, NP_001297249.1, NM_001310320.1, NP_001297250.1, NM_001310321.1, NP_005919.2, 및 NM_005928.3에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0341] 일부 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌, CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.
- [0342] 일부 구현예에서, Mfge8 단백질 발현은 Mfge8 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 Mfge8 mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.
- [0343] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 인간 SerpinB9와 같은 SerpinB9를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, SerpinB9는 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, SerpinB9의 발현은 참조 또는 비변형된 세포가 SerpinB9를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고 유사한 참조 또는 비변형된 세포(유전자 변형과 같은 임의의 다른 변형 포함)와 비교하여 조작된 1

차 세포와 같은 조작된 세포에서 증가된다. 인간 SerpinB9에 대한 유용한 계놈, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, 유전자카드 식별자 GC06M002887, HGNC 번호 8955, NCBI 유전자 ID 5272, Uniprot 번호 P50453, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_004146.1, NM_004155.5, XP_005249241.1, 및 XM_005249184.4에 제공되어 있다. 특정 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

- [0344] 일부 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 1B, 2 또는 4에 묘사된 유전자 유전자좌 중 임의의 하나에 삽입된다. 일부 경우에, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231로부터 선택된 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자 유전자좌, CIITA 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포이고 SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자 유전자좌, 또는 TRBC 유전자 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 임의의 유전자 편집 시스템)은 SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포의 계놈 유전자좌로의 삽입을 용이하게 하는 데 사용된다.
- [0345] 일부 구현예에서, SerpinB9 단백질 발현은 SerpinB9 단백질에 대한 항체로 탐색된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 외인성 SerpinB9 mRNA의 존재를 확인하는 데 사용된다.
- [0346] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 추가로 변형된다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 1차 T 세포와 같은 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포, 예컨대 1차 NK 세포이다.
- [0347] 일부 구현예에서, CAR은 제1 세대 CAR, 제2 세대 CAR, 제3 세대 CAR, 및 제4 세대 CAR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 하나의 신호전달 도메인(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 신호전달 도메인)을 포함하는 제1 세대 CAR이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 2개의 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 3개의 신호전달 도메인을 포함하는 제3 세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 3 또는 4개의 신호전달 도메인, 및 CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 포함하는 제4 세대 CAR. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 항체, 항체 단편, scFv 또는 Fab이거나 이를 포함한다.
- [0348] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제1 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다.
- [0349] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제2 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 2개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 사이토카인 생성, CAR T 세포 증식, 및/또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다.
- [0350] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제3 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 3개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 사이토카인 생성, CAR T 세포 증식, 및 또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 제3 세대 CAR은 적어도 2개의 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 공자극 도메인은 동일하지 않다.
- [0351] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제4 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제4 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 2개, 3개, 또는 4개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 사이토카인 생성, CAR T 세포 증식, 및 또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다.

[0352] 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 또는 제4 세대 CAR은 CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 유전자는 CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 포함하는 CAR을 포함하는 표적 세포에 내인성 또는 외인성이다. 일부 구현예에서, 사이토카인 유전자는 전염증성 사이토카인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 유전자는 IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, 또는 IFN-감마, 또는 이의 기능적 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인은 전사 인자 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인은 전사 인자 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 전사 인자 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편은 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT), NF-κB, 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편이거나 이를 포함한다. 예를 들어, Zhang, C. 등, Engineering CAR-T cells. Biomarker Research. 5:22(2017); WO 2016126608; Sha, H. 등 Chimeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports Jan 27, 2017, 37(1)을 참조한다.

[0353] 당업자는 CAR 및 상이한 구성요소 및 CAR의 배열에 친숙하다. 임의의 알려진 CAR은 제공된 구현예와 관련하여 이용될 수 있다. 본원에 기재된 CAR 외에도, 다양한 CAR 및 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 당업계에 알려져 있고 본원에 기재된 바와 같은 서열을 조작하는데 적합할 것이다. 예를 들어, WO2013040557; WO2012079000; WO2016030414; Smith T, 등, Nature Nanotechnology. 2017. DOI: 10.1038/NNANO.2017.57을 참조하며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. CAR의 예시적인 특징 및 구성요소는 다음 하위섹션에 기재되어 있다.

[0354] **2. 키메라 항원 수용체**

[0355] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포와 같은 제공된 조작된 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 추가로 변형된다. 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 제공된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 유전자 변형을 함유하고, 본원에 기재된 바와 같은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 1차 세포와 같은 세포는 B2M이 감소되거나 제거되고(예를 들어 녹아웃), CIITA가 감소되거나 제거되고(예를 들어 녹아웃), CD47이 과발현되고, CAR이 발현되는 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M^{-/-}, CIITA^{-/-}, CD47^{tg}, CAR⁺이다. 일부 구현예에서, 1차 세포(예를 들어 T 세포)는 추가적으로 TRAC가 감소되거나 제거되는(예를 들어 녹아웃) 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 B2^{-/-}, CIITA^{-/-}, CD47^{tg}, TRAC^{-/-} CAR⁺이다.

[0356] 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 1차 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 1차 T 세포와 같은 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포, 예컨대 1차 NK 세포이다.

[0357] 일부 구현예에서, CAR은 제1 세대 CAR, 제2 세대 CAR, 제3 세대 CAR, 및 제4 세대 CAR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 하나의 신호전달 도메인(예를 들어, 1, 2 또는 3개의 신호전달 도메인)을 포함하는 제1 세대 CAR이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 2개의 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 3개의 신호전달 도메인을 포함하는 제3 세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 3 또는 4개의 신호전달 도메인, 및 CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 포함하는 제4 세대 CAR. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 항체, 항체 단편, scFv 또는 Fab이거나 이를 포함한다.

[0358] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 1차 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제1 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다.

[0359] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 1차 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제2 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 2개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 사이토카인 생성, CAR T 세포 증식, 및/또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다.

[0360] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 1차 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제3 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함

한다. 일부 구현예에서, 제3 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 3개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 사이토카인 생성, CAR T 세포 증식, 및 또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 제3 세대 CAR은 적어도 2개의 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 공자극 도메인은 동일하지 않다.

[0361] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 1차 세포 중 임의의 하나는 CAR 또는 제4 세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제4 세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 2개, 3개, 또는 4개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 사이토카인 생성, CAR T 세포 증식, 및 또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다.

[0362] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포(예를 들어 1차 T 세포 또는 1차 NK 세포)는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오티드는 게놈 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3(CD142로도 알려짐), MICA, MICB, LRP1(CD91로도 알려짐), HMGB1, ABO, RHD, FUT1, 또는 KDM5D 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD1 또는 CTLA4 유전자에 삽입된다. 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 임의의 적합한 방법은 CAR을 저면역원성 세포의 게놈 유전자좌로 삽입하는 데 사용될 수 있다.

[0363] 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3, 또는 제4 세대 CAR은 CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 유전자는 CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 포함하는 CAR을 포함하는 표적 세포에 대해 내인성 또는 외인성이다. 일부 구현예에서, 사이토카인 유전자는 전염증성 사이토카인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 유전자는 IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, 또는 IFN-감마, 또는 이의 기능적 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인은 전사 인자 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR의 성공적인 신호전달 시 사이토카인 유전자의 발현을 유도하는 도메인은 전사 인자 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 전사 인자 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편은 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT), NF-kB, 또는 기능적 도메인 또는 이의 단편이거나 이를 포함한다. 예를 들어, Zhang, C. 등, Engineering CAR-T cells. Biomarker Research. 5:22(2017); WO 2016126608; Sha, H. 등 Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports Jan 27, 2017, 37(1)을 참조한다.

[0364] 당업자는 CAR 및 CAR의 상이한 구성요소 및 배열에 친숙하다. 임의의 알려진 CAR은 제공된 구현예와 관련하여 이용될 수 있다. 본원에 기재된 CAR 외에도, 다양한 CAR 및 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 당업계에 알려져 있고 본원에 기재된 바와 같은 세포를 조작하는 데 적합할 것이다. 예를 들어, WO2013040557; WO2012079000; WO2016030414; Smith T, 등, Nature Nanotechnology. 2017. DOI: 10.1038/NNANO.2017.57을 참조하며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. CAR의 예시적인 특징 및 구성요소는 아래 하위섹션에 기재되어 있다.

[0365] a. 항원 결합 도메인

[0366] 일부 구현예에서, CAR 항원 결합 도메인(ABD)은 항체 또는 이의 항원 결합 부분이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR 항원 결합 도메인은 scFv 또는 Fab이거나 이를 포함한다.

[0367] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 세포의 세포 표면 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 항원은 특정 또는 특이적 세포 유형을 특징으로 한다(예를 들어, 이에 의해 발현됨). 일부 구현예에서, 세포 표면 항원은 하나 초과 유형의 세포에 특징적이다.

[0368] 일부 구현예에서, 항원은 종양 세포에서 독점적으로 또는 우선적으로 발현되는 항원, 또는 자가면역 또는 염증성 질환에 특징적인 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인(ABD)은 신생물 세포에 특징적인 항원을 표적한다. 예를 들면, 항원 결합 도메인은 신생물 또는 암 세포에 의해 발현되는 항원을 표적한다. 일부 구현예에서, ABD는 종양 연관 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 신생물 세포의 특징적인 항원(예를 들어, 신생물 또는 암 세포와 연관된 항원) 또는 종양 연관 항원은 세포 표면 수용체, 이온 채널 연결 수용체, 효소 연결 수용체, G 단백질-결합 수용체, 수용체 티로신 키나제, 티로신 키나제 연관 수용체, 수용체-유사 티로신 포스파

타제, 수용체 세린/ 트레오닌 키나제, 수용체 구아닐릴 사이클라제, 히스티딘 키나제 연관 수용체로부터 선택된다.

[0369] 일부 구현예에서, 표적 항원은 표피 성장 인자 수용체(EGFR)(ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, 및 ErbB4/HER4 포함), 섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR)(FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF18, 및 FGF21 포함) 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)(VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, 및 PlGF 포함), RET 수용체 및 Eph 수용체 계열(EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA9, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, 및 EphB6 포함), CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CFTR, CIC-1, CIC-2, CIC-4, CIC-5, CIC-7, CIC-Ka, CIC-Kb, 베스트로핀(Bestrophin), TMEM16A, GABA 수용체, 글리신 수용체, ABC 수송체, NAV1.1, NAV1.2, NAV1.3, NAV1.4, NAV1.5, NAV1.6, NAV1.7, NAV1.8, NAV1.9, 스피고신-1-포스페이트 수용체(SIP1R), NMDA 채널, 막관통 단백질, 다중스팬 막관통 단백질, T-세포 수용체 모티프; T-세포 알파 쇄; T-세포 β 쇄; T-세포 γ 쇄; T-세포 δ 쇄, CCR7, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD11c, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD34, CD35, CD40, CD45RA, CD45RO, CD52, CD56, CD62L, CD68, CD80, CD95, CD117, CD127, CD133, CD137(4-1 BB), CD163, F4/80, IL-4Ra, Sca-1, CTLA-4, GITR, GARP, LAP, 그랜자임 B, LFA-1, 트랜스페린 수용체, Nkp46, 퍼포린, CD4+, Th1, Th2, Th17, Th40, Th22, Th9, Tfh, 정준 Treg, FoxP3+, Tr1, Th3, Treg17, T_HG, CDCP, NT5E, EpCAM, CEA, gpA33, 뮤신(Mucin), TAG-72, 탄산 탈수효소 IX, PSMA, 엽산 결합 단백질, 강글리오시드(예를 들어, CD2, CD3, GM2), Lewis- γ^2 , VEGF, VEGFR 1/2/3, α V β 3, α 5 β 1, ErbB1/EGFR, ErbB1/HER2, ErbB3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, 테나신(Tenascin), PDL-1, BAFF, HDAC, ABL, FLT3, KIT, MET, RET, IL-1 β , ALK, RANKL, mTOR, CTLA-4, IL-6, IL-6R, JAK3, BRAF, PTCH, 스무딩드(Smoothened), PlGF, ANPEP, TIMP1, PLAUR, PTPRJ, LTBR, 또는 ANTXR1, 엽산 수용체 알파(FRa), ERBB2(Her2/neu), EphA2, IL-13Ra2, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 메소텔린(Mesothelin), TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, MUC16(CA125), L1CAM, LeY, MSLN, IL13R α 1, L1-CAM, Tn Ag, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, 인터류킨-11 수용체 α (IL-11Ra), PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, 혈소판 유래 성장 인자 수용체-베타(PDGFR-beta), SSEA-4, CD20, MUC1, NCAM, 프로스타제(Prostate), PAP, ELF2M, 에프린(Ephrin) B2, IGF-1 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-ab1, 티로시나제, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 엽산 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGe-A1, 레구마인(legumain), HPV E6, E7, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, 주요 조직적합성 복합체 클래스 I-관련 유전자 단백질(MR1), 우로키나제-유형 플라스미노겐 활성화인자 수용체(uPAR), Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이체, 프로스테인(prostein), 서비빈(survivin), 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴(Galectin) 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 파손점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로젠(Androgen) 수용체, 사이클린(Cyclin) B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B I, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장내 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, 신생항원, CD133, CD15, CD184, CD24, CD56, CD26, CD29, CD44, HLA-A, HLA-B, HLA-C, (HLA-A,B,C), H2-M3, CD49f, CD151 CD340, CD200, tkrA, trkB, 또는 trkC, 또는 이의 항원성 단편 또는 항원성 부분을 포함하나 이에 제한되지 않는 항원이다.

[0370] 일부 구현예에서, 예시적인 표적 항원은 CDS, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD70, 카파(Kappa), 람다(Lambda), 및 B 세포 성숙화제(BCMA)(백혈병과 연관); CS1/SLAMF7, CD38, CD138, GPRC5D, TACI, 및 BCMA(글수종과 연관); GD2, HER2, EGFR, EGFRv111, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FRa, IL-13Ra, 메소텔린, MUC1, MUC16, 및 ROR1(고형 종양과 연관)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0371] 일부 구현예에서, CAR은 CD19 CAR이다. 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD19, 예를 들어, 인간 CD19에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커 펩티드에 의해 연결된 FMC63의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 FMC63 단클론 항체(FMC63)로부터 유래된 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 펩티드는 "위트로우(Whitlow)" 링커 펩티드이다. FMC63 및 유래된 scFv는 Nicholson 등, Mal. Immun. 34(16-17):1157-1165(1997) 및 PCT 출원 공개 번호 WO2018/213337 A1에 기재되었으며, 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0372] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 예를 들어, SJ25C1(Bejcek 등, Cancer Res. 55:2346-

2351(1995)), HD37(Pezutto 등, J. Immunol. 138(9):2793-2799(1987)), 4G7(Meeker 등, Hybridoma 3:305-320(1984)), B43(Bejcek(1995)), BLY3(Bejcek(1995)), B4(Freedman 등, 70:418-427(1987)), B4 HB12b(Kansas & Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102(1991); Yazawa 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183(2005); Herbst 등, J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222(2010)), BU12(Gallard 등, J. Immunology, 148(10): 2983-2987(1992)), 및 CLB-CD19(De Rie Cell. Immunol. 118:368-381(1989))를 포함하는 CD19-특이적 항체 중 하나로부터 유래되는 항체를 포함한다.

[0373] 일부 구현예에서, CAR은 CD22 CAR이다. 막관통 단백질인 CD22는 B 세포 수용체(BCR) 신호전달에 대한 억제 수용체로서 기능하는 성숙한 B 세포의 표면 상에서 주로 발견된다. CD22는 B 세포 림프종 및 백혈병(예를 들어, B-만성 림프구성 백혈병, 모발 세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 및 버킷(Burkitt's) 림프종)의 60-70%에서 발현되고 B 세포 발달의 초기 단계에서 세포 표면 또는 줄기 세포 상에 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, CD22 CAR은 CD22, 막관통 도메인, 세포내 신호전달 담 아인(dam ain), 및/또는 세포내 공자극 도메인에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포의 결합 도메인은 링커에 의해 연결된 m971의 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 m971 단클론 항체(m971)로부터 유래된 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포의 결합 도메인은 m971-L7로부터 유래된 scFv 항체 단편을 포함하며, m971의 친화도 성숙된 변이체는 모 항체 m971에 비해 상당히 개선된 CD22 결합 친화도(약 2 nM 내지 50 pM 미만으로 개선됨)를 갖는다. 일부 구현예에서, m971-L7로부터 유래된 scFv 항체 단편은 3xG4S 링커에 의해 연결된 m971-L7의 VH 및 VL을 포함한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포의 결합 도메인은 면역독소 HA22 또는 BL22를 포함한다. 면역독소 BL22 및 HA22는 박테리아 독소에 융합된 CD22에 특이적인 scFv를 포함하여, CD22를 발현하는 암 세포의 표면에 결합하고 암 세포를 사멸시킬 수 있는 치료제이다. BL22는 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소 A의 38-kDa 절두된 형태에 융합된 항-CD22 항체인 RFB4의 dsFv를 포함한다(Bang 등, Clin. Cancer Res., 11:1545-50(2005)). HA22(CAT8015, 목세투모맙 파수도톡스(moxetumomab pasudotox))는 BL22의 돌연변이된 더 높은 친화도 버전이다(Ho 등, J. Biol. Chem., 280(1): 607-17(2005)). CD22에 특이적인 HA22 및 BL22의 항원 결합 도메인의 적합한 서열은 예를 들어, 미국 특허 번호 7,541,034; 7,355,012; 및 7,982,011에 개시되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0374] 일부 구현예에서, CAR은 BCMA CAR이다. BCMA는 B 세포 계통의 세포 상에서 발현되는 종양 괴사 패밀리 수용체(TNFR) 구성원이며, 말단으로 분화된 B 세포 또는 성숙한 B 림프구에서 가장 높은 발현을 갖는다. BCMA는 장기 간 체액성 면역을 유지하기 위해 혈장 세포의 생존을 매개하는 데 수반된다. BCMA의 발현은 최근에 다발성 골수종, 호지킨(Hodgkin's) 및 비호지킨(non-Hodgkin's) 림프종, 다양한 백혈병, 및 교모세포종과 같은 다수의 암에 연결되었다. 일부 구현예에서, BCMA CAR은 BCMA, 막관통 도메인, 세포내 신호전달 도메인, 및/또는 세포내 공자극 도메인에 특이적으로 결합하는 세포의 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포의 결합 도메인은 BCMA, 예를 들어, 인간 BCMA에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. BCMA에 대해 지시된 CAR은 PCT 출원 공개 번호 WO2016/014789, WO2016/014565, WO2013/154760, 및 WO 2015/128653에 기재되었다. BCMA-결합 항체는 또한 PCT 출원 공개 번호 WO2015/166073 및 WO2014/068079에 개시되어 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포의 결합 도메인은 Carpenter 등, Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060(2013)에 기재된 바와 같은 무린 단클론 항체로부터 유래된 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, scFv 항체 단편은 무린 단클론 항체의 인간화 버전이다(Sommermeier 등, Leukemia 31:2191-2199(2017)). 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포의 결합 도메인은 Zhao 등, J. Hematol. Oncol. 11(1):141(2018)에 기재된 바와 같은 BCMA의 2개의 에피토프에 결합할 수 있는 2개의 중쇄(VHH)의 단일 가변 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포의 결합 도메인은 Lam 등, Nat. Commun. 11(1):283(2020)에 기재된 바와 같은 완전 인간 중쇄 가변 도메인(FHVV)을 포함한다.

[0375] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 자가면역 또는 염증성 장애의 특징적인 항원을 표적한다. 일부 구현예에서, ABD는 자가면역 또는 염증성 장애와 연관된 항원에 결합한다. 일부 경우에, 항원은 자가면역 또는 염증성 장애와 연관된 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 자가면역 또는 염증성 장애는 만성 이식편대숙주병(GVHD), 루푸스(lupus), 관절염(arthritis), 면역복합 사구체신염(immune complex glomerulonephritis), 굿파스처(goodpasture), 포도막염(uveitis), 간염(hepatitis), 전신 경화증(systemic sclerosis) 또는 경피증(scleroderma), 제I형 당뇨병, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 한랭응집병(cold agglutinin disease), 보통천포창(Pemphigus vulgaris), 그레이브스병(Grave's disease), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), A형 혈우병(Hemophilia A), 원발성 쇼그렌 증후군(Primary Sjogren's Syndrome), 혈전성 혈소판감소자반증(thrombotic thrombocytopenia purpura), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 에반스 증후군(Evan's syndrome), IgM 매개 신경병증, 시로글로불린혈증(cyroglobulinemia), 피부근염(dermatomyositis), 특발성 혈

소관감소증(idiopathic thrombocytopenia), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 수포성 유사천포창(bullous pemphigoid), 후천성 혈관부종(acquired angioedema), 만성 두드러기(chronic urticarial), 항인지질 탈수초성 다발신경병증(antiphospholipid demyelinating polyneuropathy), 및 자가면역 혈소관감소증(autoimmune thrombocytopenia) 또는 호중구감소증(neutropenia) 또는 순수 적혈구 무형성증(pure red cell aplasias)으로부터 선택되는 반면, 동종면역 질환의 예시적인 비제한적인 예는 동종감작화(예를 들어, Blazar 등, 2015, Am. J. Transplant, 15(4):931-41 참조) 또는 조혈 또는 고행 장기 이식으로부터의 이종감작화, 수혈, 태아 동종감작화를 동반한 임신, 신생아 동종면역 혈소관감소증, 신생아 용혈병, 효소 또는 단백질 대체 요법, 혈액 제품, 및 유전자 요법으로 치료되는 유전성 또는 후천성 결핍 장애의 대체로 발생할 수 있는 것과 같은 외래 항원에 대한 감작화를 포함한다. 일부 경우에, 동종감작화는 수용자 대상체 또는 임신한 대상체의 면역계가 비자기 항원인 것으로 간주되는 MHC 분자(예를 들어, 인간 백혈구 항원)에 대한 면역 반응(예컨대 순환 항체)의 발생을 지칭한다. 일부 구현예에서, 자가면역 또는 염증성 장애에 특징적인 항원은 세포 표면 수용체, 이온 채널 연결 수용체, 효소 연결 수용체, G 단백질 결합 수용체, 수용체 티로신 키나제, 티로신 키나제 연관 수용체, 수용체-유사 티로신 포스파타제, 수용체 세린/ 트레오닌 키나제, 수용체 구아닐릴 사이클라제, 또는 히스티딘 키나제 연관 수용체로부터 선택된다.

[0376] 일부 구현예에서, CAR의 항원 결합 도메인은 B 세포, 형질 세포, 또는 형질모세포 상에서 발현되는 리간드에 결합한다. 일부 구현예에서, CAR의 항원 결합 도메인은 CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD38, CD45R, CD138, CD319, BCMA, CD28, TNF, 인터페론 수용체, GM-CSF, ZAP-70, LFA-1, CD3 감마, CD5 또는 CD2에 결합한다. US 2003/0077249; WO 2017/058753; WO 2017/058850을 참조하며, 이들의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, CAR은 항-CD19 CAR이다. 일부 구현예에서, CAR은 항-BCMA CAR이다.

[0377] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 노화 세포, 예를 들어, 우로키나제-유형 플라즈미노겐 활성화인자 수용체(uPAR)의 특징적인 항원을 표적한다. 일부 구현예에서, ABD는 노화 세포와 연관된 항원에 결합한다. 일부 경우에, 항원은 노화 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, CAR은 노화 세포의 비정상적인 축적을 특징으로 하는 장애, 예를 들어, 간 및 폐 섬유증(fibrosis), 아테롬성동맥경화증(atherosclerosis), 당뇨병 및 골관절염(osteoarthritis)의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

[0378] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 감염성 질환의 특징적인 항원을 표적한다. 일부 구현예에서, ABD는 감염성 질환과 연관된 항원에 결합한다. 일부 경우에, 항원은 감염성 질환에 걸린 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 여기서 감염성 질환은 HIV, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 8(HHV-8, 카포시 육종 연관 헤르페스 바이러스(KSHV)), 인간 T-림프친화성 바이러스-1(HTLV-1), 메르켈 세포 폴리오마바이러스(MCV), 유인원 바이러스 40(SV40), 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스, CMV, 인간 유두종바이러스로터 선택된다. 일부 구현예에서, 감염성 질환에 특징적인 항원은 세포 표면 수용체, 이온 채널 연결 수용체, 효소 연결 수용체, G 단백질 결합 수용체, 수용체 티로신 키나제, 티로신 키나제 연관 수용체, 수용체-유사 티로신 포스파타제, 수용체 세린/ 트레오닌 키나제, 수용체 구아닐릴 사이클라제, 히스티딘 키나제 연관 수용체, HIV Env, gp120, 또는 HIV-1 Env 상의 CD4-유도성 에피토프로부터 선택된다.

[0379] 임의의 이들 구현예에서, CAR의 세포의 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화되거나 세포의 결합 도메인의 기능을 증가시키기 위한 변이체 서열을 가질 수 있다.

[0380] 일부 구현예에서, CAR은 2개의 표적 항원에 이중특이적이다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 상이한 표적 항원이다. 임의의 이러한 구현예 중 일부에서, 2개의 상이한 표적 항원은 상기 기재된 임의의 2개의 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 세포의 결합 도메인은 상이하고 (i) CD19 및 CD20, (ii) CD20 및 L1-CAM, (iii) L1-CAM 및 GD2, (iv) EGFR 및 L1-CAM, (v) CD19 및 CD22, (vi) EGFR 및 C-MET, (vii) EGFR 및 HER2, (viii) C-MET 및 HER2, 또는 (ix) EGFR 및 ROR1로부터의 2개의 상이한 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 2개의 상이한 항원 결합 도메인 각각은 scFv이다. 일부 구현예에서, 제1 scFv의 1개의 가변 도메인(VH 또는 VL)의 C-말단은 폴리펩티드 링커를 통해 제2 scFv의 N-말단(각각 VL 또는 VH)에 속박된다. 일부 구현예에서, 링커는 VH의 N-말단과 VL의 C-말단 또는 VH의 C-말단과 VL의 N-말단을 연결한다. 이들 scFv는 천연 항체의 중쇄 및 경쇄에 존재하는 불변 영역(Fc)이 없다. 적어도 2개의 상이한 항원에 특이적인 scFv는 일렬로 배열되어 막관통 도메인을 통해 공자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 연결되어 있다. 구현예에서, 세포의 스페이서 도메인은 항원-특이적 결합 영역과 막관통 도메인 사이에 연결될 수 있다.

[0381] 추가의 구현예에서, CAR의 각 항원 특이적 표적화 영역은 2가(또는 이가) 단일 체 가변 단편(디-scFv, 비-scFv)을 포함한다. 디-scFv를 포함하는 CAR에서, 각 항원에 특이적인 2개의 scFv는 2개의 VH 및 2개의 VL 영역

을 갖는 단일 펩티드를 생성함으로써 함께 연결되어, tandem scFv를 산출한다. (Xiong, Cheng-Yi; Natarajan, A; Shi, X B; Denardo, G L; Denardo, S J(2006). "Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding". Protein Engineering Design and Selection 19(8): 359-367; Kufer, Peter; **Lutterbüse** Ralf; Baeuerle, Patrick A.(2004). "A revival of bispecific antibodies". Trends in Biotechnology 22(5): 238-244). 적어도 2개의 항원-특이적 표적화 영역을 포함하는 CAR은 2개의 항원 각각에 특이적인 2개의 scFv를 발현할 것이다. 적어도 2개의 상이한 항원에 특이적인 생성된 항원-특이적 표적화 영역은 막관통 도메인을 통해 공자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 연결된다. 구현예에서, 세포의 스페이서 도메인은 항원-특이적 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에 연결될 수 있다.

[0382] 추가적인 구현예에서, CAR의 각 항원-특이적 표적화 영역은 디아바디(diabody)를 포함한다. 디아바디에서, scFv는 2개의 가변 영역이 함께 접히기에 너무 짧은 링커 펩티드로 생성되어 scFv를 이량체화하도록 구동된다. 여전히 더 짧은 링커(1 또는 2개의 아미노산)는 소위 트리아바디(triabody) 또는 트리바디(tribody)라고 불리는 삼량체를 형성한다. 테트라바디(Tetrabody)가 또한 사용될 수 있다.

[0383] 일부 구현예에서, 세포는 2개의 상이한 CAR과 같은 하나 초과와 CAR을 발현하도록 조작되며, 여기서 각 CAR은 상이한 표적 항원에 대한 항원-결합 도메인을 갖는다. 임의의 이러한 구현예 중 일부에서, 2개의 상이한 표적 항원은 상기 기재된 임의의 2개의 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 세포의 결합 도메인은 상이하며 (i) CD19 및 CD20, (ii) CD20 및 L1-CAM, (iii) L1-CAM 및 GD2, (iv) EGFR 및 L1-CAM, (v) CD19 및 CD22, (vi) EGFR 및 C-MET, (vii) EGFR 및 HER2, (viii) C-MET 및 HER2, 또는 (ix) EGFR 및 ROR1로부터의 2개의 상이한 항원에 결합한다.

[0384] 일부 구현예에서, 상이한 CAR로 각각 조작된 제공된 변형을 함유하는 2개의 상이한 조작된 세포가 제조된다. 일부 구현예에서, 2개의 상이한 CAR 각각은 상이한 표적 항원에 대한 항원-결합 도메인을 갖는다. 임의의 이러한 구현예 중 일부에서, 2개의 상이한 표적 항원은 상기 기재된 임의의 2개의 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 세포의 결합 도메인은 상이하며 (i) CD19 및 CD20, (ii) CD20 및 L1-CAM, (iii) L1-CAM 및 GD2, (iv) EGFR 및 L1-CAM, (v) CD19 및 CD22, (vi) EGFR 및 C-MET, (vii) EGFR 및 HER2, (viii) C-MET 및 HER2, 또는 (ix) EGFR 및 ROR1로부터의 2개의 상이한 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 제1 표적 항원에 대해 지시된 제1 CAR을 발현하는 조작된 세포 집단(예를 들어 저면역원성) 및 제2 표적 항원에 대해 지시된 제2 CAR을 발현하는 조작된 세포 집단(예를 들어 저면역원성)은 대상체에게 별도로 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 세포 집단은 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 예를 들면, 제2 CAR을 발현하는 세포 집단은 제1 CAR을 발현하는 세포 집단의 투여 후에 투여된다.

[0385] *b. 스페이서*

[0386] 일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의 스페이서를 추가로 포함하며, 예를 들어, 여기서 스페이서는 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이의 제1 스페이서이다. 일부 구현예에서, 제1 스페이서는 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부 또는 이의 변이체 또는 변형된 버전을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 막관통 도메인과 신호전달 도메인 사이의 제2 스페이서이다. 일부 구현예에서, 제2 스페이서는 올리고펩티드이며, 예를 들어, 여기서 올리고펩티드는 글리신-세린 이중항과 같으나 이에 제한되지 않는 글리신 및 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 2개 이상의 스페이서, 예를 들어, 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이의 스페이서 및 막관통 도메인과 신호전달 도메인 사이의 스페이서를 포함한다.

[0387] *c. 막관통 도메인*

[0388] 일부 구현예에서, CAR 막관통 도메인은 T 세포 수용체, CD28, CD3 엽실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 이의 기능적 변이체의 알파, 베타 또는 제타 쇄의 적어도 막관통 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD8 α, CD8 β, 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, Fc ε RI γ, CD16, OX40/CD134, CD3 ζ, CD3 ε, CD3 γ, CD3 δ, TCR α, TCR β, TCR ζ, CD32, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS, 및 FGFR2B, 또는 이의 기능적 변이체의 적어도 막관통 영역(들)을 포함한다.

[0389] *d. 신호전달 도메인(들)*

[0390] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CAR은 B7-1/CD80; B7-2/CD86; B7-H1/PD-L1; B7-H2; B7-H3; B7-H4; B7-H6; B7-H7; BTLA/CD272; CD28; CTLA-4; Gi24/VISTA/B7-H5; ICOS/CD278; PD-1; PD-L2/B7-DC; PDCD6); 4-

1BB/TNFSF9/CD137; 4-1BB 리간드/TNFSF9; BAFF/BLyS/TNFSF13B; BAFF R/TNFRSF13C; CD27/TNFRSF7; CD27 리간드/TNFSF7; CD30/TNFRSF8; CD30 리간드/TNFSF8; CD40/TNFRSF5; CD40/TNFSF5; CD40 리간드/TNFSF5; DR3/TNFRSF25; GITR/TNFRSF18; GITR 리간드/TNFSF18; HVEM/TNFRSF14; LIGHT/TNFSF14; 림프톡신-알파/TNF-베타; OX40/TNFRSF4; OX40 리간드/TNFSF4; RELT/TNFRSF19L; TACI/TNFRSF13B; TL1A/TNFSF15; TNF-알파; TNF RII/TNFRSF1B); 2B4/CD244/SLAMF4; BLAME/SLAMF8; CD2; CD2F-10/SLAMF9; CD48/SLAMF2; CD58/LFA-3; CD84/SLAMF5; CD229/SLAMF3; CRACC/SLAMF7; NTB-A/SLAMF6; SLAM/CD150); CD2; CD7; CD53; CD82/Kai-1; CD90/Thy1; CD96; CD160; CD200; CD300a/LMIR1; HLA 클래스 I; HLA-DR; 이카로스(Ikaros); 인테그린 알파 4/CD49d; 인테그린 알파 4 베타 1; 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1; LAG-3; TCL1A; TCL1B; CRTAM; DAP12; 덕틴(Dectin)-1/CLEC7A; DPPIV/CD26; EphB6; TIM-1/KIM-1/HAVCR; TIM-4; TSLP; TSLP R; 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1); NKG2C, CD3 제타 도메인, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이의 기능적 단편 중 하나 이상으로부터 선택된 하나 또는 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0391] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 CD3 제타 도메인 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

[0392] 일부 구현예에서, CAR은 공자극 도메인인 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 제2 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 적어도 2개의 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 적어도 3개의 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 중 하나 이상으로부터 선택된 공자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR이 2개 이상의 공자극 도메인을 포함하는 경우, 2개의 공자극 도메인은 상이하다. 일부 구현예에서, CAR이 2개 이상의 공자극 도메인을 포함하는 경우, 2개의 공자극 도메인은 동일하다.

[0393] 다른 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; 및 (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iv) 사이토카인 또는 공자극 리간드 이식유전자를 포함한다.

[0394] 일부 구현예에서, 적어도 2개의 신호전달 도메인은 CD3 제타 도메인 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 적어도 2개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; 및 (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iv) 사이토카인 또는 공자극 리간드 이식유전자를 포함한다.

[0395] 일부 구현예에서, 적어도 3개의 신호전달 도메인은 CD3 제타 도메인 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 적어도 3개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; 및 (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 최소 3개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 3개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iv) 사이토카인 또는 공자극 리간드 이식유전

자를 포함한다.

- [0396] 일부 구현예에서, CAR은 CD3 제타 도메인 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; 및 (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0397] 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0398] 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및/또는 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.
- [0399] 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM), 또는 이의 기능적 변이체; (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체; (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체; 및 (iv) 사이토카인 또는 공자극 리간드 이식유전자를 포함한다.
- [0400] *e. 예시적인 CAR*
- [0401] 일부 구현예에서, CAR은 항원(예를 들어 종양 항원), 스페이서(예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것과 같은 힌지 도메인 함유), 막관통 도메인(예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것), 및 세포내 신호전달 도메인(예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 1차 신호전달 도메인 또는 공자극 신호전달 도메인과 같은 임의의 세포내 신호전달 도메인)에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인(예를 들어, 항체 또는 항체 단편, 예컨대 scFv)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 세포질 신호전달 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 공자극 분자의 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, 공자극 도메인)을 추가적으로 포함한다. 임의의 이러한 구성요소는 상기 기재된 바와 같은 임의의 것일 수 있다.
- [0402] CAR의 예시적인 구성요소의 예는 표 3에 기재되어 있다. 제공된 측면에서, CAR의 각 구성요소의 서열은 표 3에 나열된 임의의 조합을 포함할 수 있다.

표 3: CAR 구성요소 및 예시적인 서열		
구성요소	서열	서열번호
세포의 결합 도메인		
항-CD19 scFv(FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY GVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSA LKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	3
항-CD19 scFv(FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKY LNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKS RLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCA KHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	4
스페이서(예를 들어 힌지)		
IgG4 힌지	ESKYGPPCPPCP	5
CD8 힌지	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	6
CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP	7
막관통		

[0403]

CD8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGT CGVLLLSLVITLYC	8
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	9
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	10
공자극 도메인		
CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY APPRDFAAYRS	11
4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCEL	12
1차 신호전달 도메인		
CD3제타	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPMEGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	13
CD3제타	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPMEGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG LYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	14

[0404]

[0405] 3. 폴리뉴클레오티드의 발현(예를 들어, 과발현)을 증가시키는 방법

- [0406] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 증가된 발현은 임의의 다양한 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 유전자 및 인자(단백질)의 발현을 조절하는 방법은 게놈 편집 기술, 및, RNA 또는 단백질 발현 기술 등을 포함한다. 이러한 기술 모두에 대해, 본원에 요약된 바와 같은 재조합 핵산을 생성하기 위해 잘 알려진 재조합 기술이 사용된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 과발현 또는 증가된 발현에 대한 하나 이상의 변형으로 조작된 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 공급원 세포이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 섹션 II.C에 기재된 임의의 세포이다.
- [0407] 일부 구현예에서, 유전자의 발현은 내인성 유전자 활성을 증가시킴으로써(예를 들어, 외인성 유전자의 전사를 증가시킴으로써) 증가된다. 일부 경우에, 내인성 유전자 활성은 내인성 유전자에 작동가능하게 연결된 프로모터 또는 인핸서의 활성을 증가시킴으로써 증가된다. 일부 구현예에서, 프로모터 또는 인핸서의 활성을 증가시키는 것은 내인성 프로모터 또는 인핸서의 활성을 증가시키는 내인성 프로모터 또는 인핸서에 하나 이상의 변형을 가하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 내인성 유전자의 유전자 활성을 증가시키는 것은 유전자의 내인성 프로모터를 변형시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서 내인성 유전자의 유전자 활성을 증가시키는 것은 이중 프로모터를 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중 프로모터는 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 및 UBC 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0408] a. DNA-결합 융합 단백질
- [0409] 일부 구현예에서, 표적 유전자(예를 들어, CD47, 또는 또 다른 관용원성 인자)의 발현은 (1) 내인성 CD47, 또는 다른 유전자에 특이적인 부위 특이적 결합 도메인 및 (2) 전사 활성인자를 함유하는 융합 단백질 또는 단백질 복합체의 발현에 의해 증가된다.
- [0410] 일부 구현예에서, 조절 인자는 부위 특이적 DNA-결합 핵산 분자, 예컨대 가이드 RNA(gRNA)로 구성된다. 일부 구현예에서, 방법은 부위 특이적 DNA-결합 표적화 단백질, 예컨대 징크 핑거 단백질(ZFP) 또는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로도 알려진 ZFP를 함유하는 융합 단백질에 의해 달성된다.
- [0411] 일부 구현예에서, 조절 인자는 표적화 영역에서 유전자에 특이적으로 결합하거나 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA-결합 핵산을 사용하는 것과 같은 부위 특이적 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 변형된 뉴클레아제와 같은 부위 특이적 뉴클레아제와 결합되거나 복합체화된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 투여는 변형된 뉴클레아제, 예컨대 메가뉴클레아제 또는 RNA-가이드 뉴클레아제 예컨대 클러스터링된 규칙적으로 산재된 짧은 회문형 핵산(CRISPR)-Cas 시스템, 예컨대 CRISPR-Cas9 시스템의 DNA-표적화 단백질을 포함하는 융합을 사용하여 시행된다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제는 뉴클레아제 활성이 결여되도록 변형된다. 일부 구현예에서, 변형된 뉴클레아제는 촉매적으로 죽은 dCas9이다.
- [0412] 일부 구현예에서, 부위 특이적 결합 도메인은 뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII과 같은 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 인식 서열. 또한 미국 특허 번호 5,420,032; 미국 특허 번호 6,833,252; Belfort 등, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon 등, (1989) Gene 82:115-118; Perler 등, (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin(1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble 등, (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast 등, (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 및 New England Biolabs 카탈로그를 참조한다. 게다가, 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성은 비천연 표적 부위에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, Chevalier 등, (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat 등, (2003) Nucleic Acids Res. 31 :2952-2962; Ashworth 등, (2006) Nature 441 :656-659; Paques 등, (2007) Current Gene Therapy 7:49-66; 미국 특허 공개 번호 2007/0117128을 참조한다.
- [0413] 징크 핑거, TALE, 및 CRISPR 시스템 결합 도메인은 미리 결정된 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 자연 발생 징크 핑거 또는 TALE 단백질의 인식 나선 영역의 조작(하나 이상의 아미노산 변경)을 통해 미리 결정된 뉴클레오티드 서열에 결합하도록 "조작될" 수 있다. 조작된 DNA 결합 단백질(징크 핑거 또는 TALE)은 자연 발생하지 않는 단백질이다. 설계를 위한 합리적인 기준은 기존 ZFP 및/또는 TALE 설계 및 결합 데이터의 데이터베이스 저장 정보에서 정보를 처리하기 위한 치환 규칙 및 컴퓨터화 알고리즘의 적용을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,140,081; 6,453,242; 및 6,534,261을 참조하고; 또한 WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO

02/016536 및 WO 03/016496 및 미국 공개 번호 20110301073을 참조한다.

- [0414] 일부 구현예에서, 부위 특이적 결합 도메인은 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 하나 이상의 징크 핑거 단백질(ZFP) 또는 이의 도메인을 포함한다. ZFP 또는 이의 도메인은 아연 이온의 배위를 통해 구조가 안정화된 결합 도메인 내의 아미노산 서열의 영역인 하나 이상의 징크 핑거를 통해 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 더 큰 단백질 내의 단백질 또는 도메인이다.
- [0415] ZFP 중에는 개별 핑거의 조립에 의해 생성된 전형적으로 9-18개 뉴클레오티드 길이인 특이적 DNA 서열을 표적화하는 인공 ZFP 도메인이 있다. ZFP는 단일 핑거 도메인이 대략 30개 아미노산 길이이고 아연을 통해 단일 베타 회전의 2개의 시스테인과 배열된 2개의 불변 히스티딘을 함유하고, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 핑거를 갖는 알파 나선을 함유하는 것들을 포함한다. 일반적으로, ZFP의 서열-특이성은 징크 핑거 인식 나선 상의 4개의 나선 위치(-1, 2, 3 및 6)에서 아미노산 치환함으로써 변경될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, ZFP 또는 ZFP-함유 분자는 자연 발생하지 않으며, 예를 들어, 선택된 표적 부위에 결합하도록 조작된다. 예를 들어, Beerli 등(2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo 등(2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan 등(2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal 등(2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo 등(2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; 미국 특허 번호 6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; 및 미국 특허 공개 번호 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061을 참조하여, 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0416] 많은 유전자-특이적 조작된 징크 핑거는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어, Sangamo Biosciences(미국 캘리포니아주 리치먼드 소재)는 Sigma-Aldrich(미국 미주리주 세인트루이스 소재)와 제휴하여 징크 핑거 구축을 위한 플랫폼(CompoZr)을 개발하여, 연구자들이 징크 핑거 구축 및 검증을 완전히 우회하도록 하고 수천 개의 단백질에 대해 특이적으로 표적화된 징크 핑거를 제공한다(Gaj 등, Trends in Biotechnology, 2013, 31(7), 397-405). 일부 구현예에서, 상업적으로 입수가능한 징크 핑거가 사용되거나 맞춤 설계된다.
- [0417] 일부 구현예에서, 부위 특이적 결합 도메인은 전사 활성화제-유사 단백질 효과기(TALE) 단백질에서와 같은 자연 발생 또는 조작된(비자연 발생) 전사 활성화제-유사 단백질(TAL) DNA 결합 도메인을 포함하며, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 20110301073을 참조하고 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0418] 일부 구현예에서, 부위 특이적 결합 도메인은 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래된다. 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 Cas 유전자를 암호화하는 서열, tracr(전사활성화 CRISPR) 서열(예를 들어 tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), tracr-mate 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "직접 반복" 및 tracrRNA-처리된 부분 직접 반복 포함), 가이드 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서", 또는 "표적화 서열"로도 언급됨), 및/또는 CRISPR 유전자좌로부터의 다른 서열 및 전사체를 포함하는, CRISPR-연관("Cas") 유전자의 발현 또는 활성을 지시하는 데 수반되는 전사체 또는 다른 요소를 일괄하여 지칭한다.
- [0419] 일반적으로, 가이드 서열은 표적 서열과 혼성화하고 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 지시하기 위해 폴리뉴클레오티드 서열과 충분한 상보성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 표적화 도메인(예를 들어 표적화 서열)을 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 서열과 상응하는 표적 서열 사이의 상보성 정도는 적합한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬되는 경우 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99%, 또는 그 이상 또는 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99%, 또는 그 이상보다 크다. 일부 경우에, gRNA의 표적화 도메인은 표적 핵산 상의 표적 서열에 상보적이며, 예를 들어, 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 상보적, 예를 들어, 완전히 상보적이다.
- [0420] 일부 구현예에서, gRNA는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것일 수 있다. 특정 구현예에서, gRNA는 서열번호:200784-231885(WO2016183041의 표 29, 부록 22) 중 임의의 하나에 제시된 것과 같은 CD47; 서열번호:189859-193183(WO2016183041의 표 19, 부록 12) 중 임의의 하나에 제시된 것과 같은 HLA-E; 서열번호:688808-699754(WO2016183041의 표 45, 부록 38) 중 임의의 하나에 제시된 것과 같은 HLA-F; 서열번호:188372-189858(WO2016183041의 표 18, 부록 11) 중 임의의 하나에 제시된 것과 같은 HLA-G; 또는 서열번호:193184-200783(WO2016183041의 표 21, 부록 14) 중 임의의 하나에 제시된 것과 같은 PD-L1의 표적 부위에 상보적인 표적화 서열을 갖는다.
- [0421] 일부 구현예에서, 표적 부위는 표적 유전자의 전사 개시 부위의 상류에 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 유전자의 전사 개시 부위에 인접하다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 유전자의 전사 개시 부위의 하류에 있는 RNA 중합효소 정지 부위에 인접하다.

- [0422] 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 전사 개시, 하나 이상의 전사 인핸서 또는 활성인자, 및/또는 RNA 중합효소의 결합을 촉진하기 위해 표적 유전자의 프로모터 영역을 표적하도록 구성된다. 하나 이상의 gRNA는 유전자의 프로모터 영역을 표적하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자의 하나 이상의 영역은 표적화될 수 있다. 특정 측면에서, 표적 부위는 유전자의 전사 시작 부위(TSS)의 양쪽 상의 600개 염기쌍 내에 있다.
- [0423] 엑손 서열 및 프로모터 및 활성인자를 포함한 조절 영역의 서열을 포함하여 유전자를 표적화하는 서열이거나 이를 포함하는 gRNA 서열(즉 gRNA 표적화 서열)을 설계하거나 식별하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. CRISPR 게놈 편집을 위한 게놈 와이드 gRNA 데이터베이스는 공개적으로 이용가능하며, 이는 인간 게놈 또는 마우스 게놈에서 유전자의 구성적 엑손에 예시적인 단일 가이드 RNA(sgRNA) 표적 서열을 함유한다(예를 들어, genescript.com/gRNA-database.html 참조; 또한 Sanjana 등(2014) *Nat. Methods*, 11:783-4; www.e-crisp.org/E-CRISP/; crispr.mit.edu/ 참조). 일부 구현예에서, gRNA 서열은 비표적 유전자에 대한 표적의 결합이 최소화된 표적화 서열이거나 이를 포함한다.
- [0424] 일부 구현예에서, 조절 인자는 기능적 도메인, 예를 들어, 전사 활성인자를 추가로 포함한다.
- [0425] 일부 구현예에서, 전사 활성인자는 표적 유전자의 하나 이상의 전사 제어 요소와 같은 하나 이상의 조절 요소이거나 이를 포함하며, 이에 의해 상기 제공된 바와 같은 부위 특이적 도메인은 이러한 유전자의 발현을 구동하도록 인식된다. 일부 구현예에서, 전사 활성인자는 표적 유전자의 발현을 구동한다. 일부 경우에, 전사 활성인자는 이중 전사활성화 도메인의 전부 또는 일부일 수 있거나 이를 함유한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 전사 활성인자는 단순 포진 유래 전사활성화 도메인, Dnmt3a 메틸트랜스퍼라제 도메인, p65, VP16, 및 VP64로부터 선택된다.
- [0426] 일부 구현예에서, 조절 인자는 징크 핑거 전사 인자(ZF-TF)이다. 일부 구현예에서, 조절 인자는 VP64-p65-Rta(VPR)이다.
- [0427] 특정 구현예에서, 조절 인자는 전사 조절 도메인을 추가로 포함한다. 공통 도메인은 예를 들어, 전사 인자 도메인(활성인자, 억제제, 보조 활성인자, 공동 억제제), 사일렌서, 종양유전자(예를 들어, *myc*, *jun*, *fos*, *myb*, *max*, *mad*, *rel*, *ets*, *bcl*, *myb*, *mos* 계열 구성원 등); DNA 복구 효소 및 그들의 연관 인자 및 변형체; DNA 재배열 효소 및 그들의 연관 인자 및 변형체; 염색질 연관 단백질 및 그들의 변형체(예를 들어 키나제, 아세틸라제 및 데아세틸라제); 및 DNA 변형 효소(예를 들어, 메틸트랜스퍼라제 예컨대 DNMT 패밀리(예를 들어, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L 등의 구성원, 토포이소머라제, 헬리카제, 리가제, 키나제, 포스파타제, 중합효소, 엔도뉴클레아제) 및 그들의 연관 인자 및 변형체를 포함한다. 예를 들어, 미국 공개 번호 2013/0253040을 참조하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0428] 활성화를 달성하기에 적합한 도메인은 HSV VP 16 활성화 도메인(예를 들어, Hagmann 등, *J. Virol.* 71, 5952-5962(1997) 참조) 핵 호르몬 수용체(예를 들어, Torchia 등, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383(1998) 참조); 핵 인자 카파 B의 p65 서브유닛(Bitko & Bank, *J. Virol.* 72:5610-5618(1998) 및 Doyle & Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942(1997)); Liu 등, *Cancer Gene Ther.* 5:3-28(1998)), 또는 인공 키메라 기능적 도메인 예컨대 VP64(Beerli 등, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33), 및 테그론(degron)(Molinari 등, (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447)을 포함한다. 추가적인 예시적인 활성화 도메인은 Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2, 및 CTF1(Seipel 등, *EMBO J.* 11, 4961-4968(1992) 뿐만 아니라 p300, CBP, PCAF, SRC1 PVALF, AtHD2A 및 ERF-2를 포함한다. 예를 들어, Robyr 등, (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347; Collingwood 등, (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275; Leo 등, (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska(1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKenna 등, (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12; Malik 등, (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; 및 Lemon 등, (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504를 참조한다. 추가의 예시적인 활성화 도메인은 OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -1, 및 -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, 및 TRAB1을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, Ogawa 등, (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami 등, (1996) *Genes Cells* 1 :87-99; Goff 등, (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho 등, (1999) *Plant Mol Biol* 40:419-429; Ulmason 등, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels 등, (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong 등, (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; 및 Hobo 등, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353을 참조한다.
- [0429] 유전적 억제제를 만드는 데 사용될 수 있는 예시적인 억제 도메인은 KRAB A/B, KOX, TGF-베타-유도성 초기 유전자(TIEG), v-erbA, SID, MBD2, MBD3, DNMT 계열(예를 들어, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L 등)의 구성원, Rb, 및 MeCP2를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, Bird 등, (1999) *Cell* 99:451-454; Tyler 등, (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepfler 등, (1999) *Cell* 99:447-450; 및 Robertson 등, (2000) *Nature Genet.* 25:338-

342를 참조한다. 추가의 예시적인 억제 도메인은 ROM2 및 AtHD2A를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, Chem 등, (1996) Plant Cell 8:305-321; 및 Wu 등, (2000) Plant J. 22:19-27을 참조한다.

[0430] 일부 경우에, 도메인은 염색체의 후생적 조절에 수반된다. 일부 구현예에서, 도메인은 히스톤 아세틸트랜스퍼라제(HAT), 예를 들어 유형- A, 핵 국소화 예컨대 MYST 계열 구성원 MOZ, Ybf2/Sas3, MOF, 및 Tip60, GNAT 계열 구성원 Gcn5 또는 pCAF, p300 계열 구성원 CBP, p300 또는 Rtt109(Bemdsen and Denu(2008) Curr Opin Struct Biol 18(6):682-689)이다. 다른 경우에, 도메인은 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 예컨대 클래스 I(HDAC-1, 2, 3, 및 8), 클래스 II 분자(HDAC IIA(HDAC-4, 5, 7 및 9), HDAC IIB(HDAC 6 및 10)), 클래스 IV(HDAC-11), 클래스 III(시르투인(SIRT))으로도 알려짐; SIRT1-7)(Mottamal 등, (2015) 분자 20(3):3898-3941 참조)이다. 일부 구현예에서 사용되는 또 다른 도메인은 히스톤 포스포릴라제 또는 키나제이며, 여기서 예는 MSK1, MSK2, ATR, ATM, DNA-PK, Bub1, VprBP, IKK-a, PKCpi, Dik/Zip, JAK2, PKC5, WSTF 및 CK2를 포함한다. 일부 구현예에서, 메틸화 도메인이 사용되고 Ezh2, PRMT1/6, PRMT5/7, PRMT 2/6, CARM1, set7/9, MLL, ALL-1, Suv 39h, G9a, SETDB1, Ezh2, Set2, Dot1, PRMT 1/6, PRMT 5/7, PR-Set7 및 Suv4-20h와 같은 군으로부터 선택될 수 있으며, 수모일화 및 비오닐화에 수반되는 도메인(Lys9, 13, 4, 18 및 12)이 또한 일부 구현예에서 사용될 수 있다(검토는 Kousarides(2007) Cell 128:693-705를 참조함).

[0431] 융합 분자는 당업자에게 잘 알려져 있는 클로닝 및 생화학 접합 방법에 의해 구성된다. 융합 분자는 DNA-결합 도메인 및 기능적 도메인(예를 들어, 전사 활성화 또는 억제 도메인)을 포함한다. 융합 분자는 또한 임의적으로 핵 국소화 신호(예컨대, 예를 들어, SV40 매질 T-항원으로부터의 것) 및 에피토프 태그(예컨대, 예를 들어, FLAG 및 헤마글루티닌)를 포함한다. 융합 단백질(및 이들을 암호화하는 핵산)은 번역 판독 프레임이 융합의 구성요소 사이에 보존되도록 설계된다.

[0432] 기능적 도메인(또는 이의 기능적 단편)의 폴리펩티드 구성요소와 다른 한편으로는 비-단백질 DNA-결합 도메인(예를 들어, 항생제, 인터칼레이터, 소수 홈 결합제, 핵산) 사이의 융합은 당업자에게 알려진 생화학적 접합 방법에 의해 구성된다. 예를 들어, Pierce Chemical Company(Rockford, IL) 카탈로그를 참조한다. 소수 홈 결합제와 폴리펩티드 사이에 융합을 만들기 위한 방법 및 조성물이 기재된 바 있다. Mapp 등, (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935. 마찬가지로, 폴리펩티드 구성요소 기능 도메인과 회합된 sgRNA 핵산 구성요소를 포함하는 CRISPR/Cas TF 및 뉴클레아제가 또한 당업자에게 알려져 있고 본원에 기재되어 있다.

[0433] *b. 외인성 폴리펩티드*

[0434] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 증가된 발현(즉 과발현)은 과발현될 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 1차 세포 내로 도입함으로써 매개된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 재조합 핵산이다. 잘 알려진 재조합 기술이 본원에 요약된 바와 같은 재조합 핵산을 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0435] 특정 구현예에서, 관용원성 인자 또는 키메라 항원 수용체와 같은 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 재조합 핵산은 발현 작제물에서 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 치료될 숙주 세포 및 수용자 대상체에 적합할 것이다. 다양한 숙주 세포에 대한 다양한 유형의 적절한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열이 당업계에 알려져 있다. 전형적으로, 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 종결 서열, 번역 시작 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성인자 서열을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 당업계에 알려진 바와 같은 구성적 또는 유도성 프로모터가 또한 고려된다. 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 초과와 프로모터 요소를 조합하는 하이브리드 프로모터일 수 있다. 발현 작제물은 플라스미드와 같은 에피솜 상의 세포에 존재할 수 있거나, 발현 작제물은 염색체에 삽입될 수 있다. 구체적 구현예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 허용하는 선택가능한 마커 유전자를 포함한다. 특정 구현예는 적어도 하나의 조절 서열에 작동가능하게 연결된 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 본원에서 사용하기 위한 조절 서열은 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현 제어 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포, 발현하고자 하는 특정 변이체 폴리펩티드, 벡터의 카피 수, 카피 수를 제어하는 능력, 및/또는 항생제 마커와 같은 벡터에 의해 암호화된 임의의 다른 단백질의 발현을 선택하기 위해 설계된다.

[0436] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 조작된 세포에서 외인성 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 적합한 포유류 프로모터의 예는 예를 들어, 다음 유전자로부터의 프로모터를 포함한다: 신장 인자 1 알파(EF1a) 프로모터, 햄스터의 유비퀴틴/S27a 프로모터(WO 97/15664), 유인원 공포화 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복 영역(RSV), 마우스 유전 종양 바이러스 프로모터(MMTV), 몰로니 뮤린 백혈병 바

이러스 긴 말단 반복 영역, 및 인간 사이토메갈로바이러스(CMV)의 초기 프로모터. 다른 이중 포유류 프로모터의 예는 액틴, 면역글로불린 또는 열 충격 프로모터(들)이다. 추가적 구현예에서, 포유류 숙주 세포에서 사용하기 위한 프로모터는 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스(1989년 7월 5일 공개된 UK 2,211,504), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스 및 유인원 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 게놈으로부터 취득될 수 있다. 추가의 구현예에서, 이중 포유류 프로모터가 사용된다. 예는 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 및 열 충격 프로모터를 포함한다. SV40의 초기 및 후기 프로모터는 또한 SV40 바이러스 복제 기점을 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 취득된다(Fiers 등, Nature 273: 113-120(1978)). 인간 사이토메갈로바이러스의 급 초기 프로모터는 HindIII 제한 효소 단편으로 편리하게 취득된다(Greenaway 등, Gene 18: 355-360(1982)). 전술한 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0437] 일부 구현예에서, 발현 벡터는 비시스트로닉 또는 멀티시스트로닉 발현 벡터이다. 비시스트로닉 또는 멀티시스트로닉 발현 벡터는 (1) 오픈 리딩 프레임 각각에 융합된 다중 프로모터; (2) 유전자 사이에 스플라이싱 신호 삽입; (3) 발현이 단일 프로모터에 의해 구동되는 유전자의 융합; 및 (4) 유전자 사이에 단백질분해 절단 부위 삽입(자기-절단 펩티드) 또는 유전자 사이에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 삽입을 포함할 수 있다.

[0438] 일부 구현예에서, 본원에서 발현 벡터 또는 작제물은 멀티시스트로닉 작제물이다. 용어 "멀티시스트로닉 작제물" 및 "멀티시스트로닉 벡터"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고 단일 mRNA 분자에 전사될 재조합 DNA 작제물을 지칭하며, 여기서 단일 mRNA 분자는 2개 이상의 유전자(예를 들어, 2개 이상의 이식유전자)를 암호화한다. 다중-시스트로닉 작제물은 2개의 유전자를 암호화하는 경우 비시스트로닉 작제물로 언급되고, 3개의 유전자를 암호화하는 경우 트리시스트로닉 작제물로 언급되고, 4개의 유전자를 암호화하는 경우 콰드로시스트로닉 작제물 등으로 언급된다.

[0439] 일부 구현예에서, 벡터 또는 작제물(예를 들어, 이식유전자)에 의해 포함된 2개 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 각각 멀티시스트로닉 분리 요소에 의해 분리된다. 일부 구현예에서, 멀티시스트로닉 분리 요소는 IRES 또는 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소를 암호화하는 서열이다. 일부 구현예에서, 멀티시스트로닉 분리 요소는 IRES, 예컨대 뇌척수심근염(EMCV) 바이러스 IRES이다. 일부 구현예에서, 멀티시스트로닉 분리 요소는 2A 펩티드와 같은 절단가능한 펩티드이다. 예시적인 2A 펩티드는 P2A 펩티드, T2A 펩티드, E2A 펩티드, 및 F2A 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드는 T2A이다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드)는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드는 각각 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 동일한 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 EF1 프로모터이다.

[0440] 일부 경우에, 외인성 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 기재된 관용원성 인자 또는 보체 억제제를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드)는 멀티시스트로닉 벡터에 의해 암호화된 외인성 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에서 T2A와 같은 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소를 암호화한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소의 포함은 단일 번역 개시 부위로부터 2개 이상의 폴리펩티드의 발현을 허용한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드는 T2A이다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 15로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 16으로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 21로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 22로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다.

[0441] 일부 구현예에서, 벡터 또는 작제물은 외인성 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 전사 단위의 발현을 구동하는 단일 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 벡터 또는 작제물은 멀티시스트로닉(비시스트로닉 또는 트리시스트로닉, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,060,273 참조)일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터 전사된 RNA로부터 유전자 산물(예를 들어 하나 이상의 관용원성 인자 예컨대 CD47)의 공발현을 허용하는 IRES(내부 리보솜 진입 부위)를 함유하는 비시스트로닉 단위로서 조각될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 벡터 또는 작제물은 비시스트로닉이므로, 벡터 또는 작제물이 2개의 별도의 폴리펩티드를 발현하도록 한다. 일부 경우에, 벡터 또는 작제물에 의해 암호화된 2개의 별도의 폴리펩티드는 관용원성 인자(예를 들어, DUX4, B2M-HLA-E, CD35, CD52, CD16, CD52, CD47, CD46, CD55, CD59, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, SERPINB9, CD35, IL-39, CD16 Fc 수용체, IL15-RF, 및 H2-M3(이의 임의의 조합 포함)으로부터 선택된 2개의 인자이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200, 및 Mfge8(이의 임의의 조합 포함) 중 2개 이상이다. 일부 구현예에서, 벡터 또는 작제물에 의해 암호화된 2개의 별도의 폴리펩티드

는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 벡터 또는 작제물은 트리시스트로닉이므로, 벡터 또는 작제물이 3개의 별도의 폴리펩티드를 발현하도록 한다. 일부 경우에, 트리시스트로닉 벡터 또는 작제물의 3개의 핵산 서열은 관용원성 인자 예컨대 CD47이다. 일부 경우에, 트리시스트로닉 벡터 또는 작제물의 3개의 핵산 서열은 DUX4, B2M-HLA-E, CD35, CD52, CD16, CD52, CD47, CD46, CD55, CD59, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, SERPINB9, CD35, IL-39, CD16 Fc 수용체, IL15-RF, 및 H2-M3(이의 임의의 조합 포함)으로부터 선택된 3개의 관용원성 인자이다. 일부 구현예에서, 3개의 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200, 및 Mfge8(이의 임의의 조합 포함)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 벡터 또는 작제물은 콰드로시스트로닉이므로, 벡터 또는 작제물이 4개의 별도의 폴리펩티드를 발현하도록 한다. 일부 경우에, 콰드로시스트로닉 벡터 또는 작제물의 4개의 별도의 폴리펩티드는 DUX4, B2M-HLA-E, CD35, CD52, CD16, CD52, CD47, CD46, CD55, CD59, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, SERPINB9, CD35, IL-39, CD16 Fc 수용체, IL15-RF, 및 H2-M3(이의 임의의 조합 포함)으로부터 선택된 4개의 관용원성 인자이다. 일부 구현예에서, 4개의 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200, 및 Mfge8(이의 임의의 조합 포함)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 벡터 또는 작제물을 포함하며, 여기서 각각의 벡터 또는 작제물은 상기 기재된 바와 같은 모노시스트로닉 또는 멀티시스트로닉 작제물이고, 모노시스트로닉 또는 멀티시스트로닉 작제물은 하나 이상의 관용원성 인자를 임의의 조합 또는 순서로 암호화한다.

[0442] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 벡터 또는 작제물을 포함하며, 여기서 각각의 벡터 또는 작제물은 상기 기재된 바와 같은 모노시스트로닉 또는 멀티시스트로닉 작제물이며, 모노시스트로닉 또는 멀티시스트로닉 작제물은 하나 이상의 관용원성 인자를 임의의 조합 또는 순서로 암호화한다.

[0443] 일부 구현예에서, 단일 프로모터는 단일 오픈 리딩 프레임(ORF)에서 자기-절단 펩티드(예를 들어, 2A 서열) 또는 프로테아제 인식 부위(예를 들어, 푸린)를 암호화하는 서열에 의해 또 다른 하나로부터 분리된 2, 3, 또는 4개의 유전자(예를 들어 관용원성 인자(예를 들어, CD47)를 암호화함)를 함유하는 RNA의 발현을 지시한다. 따라서 ORF는 번역 도중(2A의 경우) 또는 후에 개별 단백질로 처리되는 단일 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 경우에, T2A와 같은 펩티드는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩티드 결합의 합성을 스킵(리보솜 스킵핑)하여 2A 서열의 단부와 다음 펩티드 하류 사이에 분리를 야기할 수 있다(예를 들어, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13(2004) 및 deFelipe 등 Traffic 5:616-626(2004) 참조). 많은 2A 요소는 당업계에서 알려져 있다. 본원에 개시된 방법 및 핵산에 사용될 수 있는 2A 서열의 예는 제한 없이, 미국 특허 공개 번호 20070116690에 기재된 바와 같은 수족구병(foot-and-mouth disease) 바이러스(F2A, 예를 들어, 서열번호: 20), 말 비염 A 바이러스(E2A, 예를 들어, 서열번호: 19), 테사 아시그나(*thoesa asigna*) 바이러스(T2A, 예를 들어, 서열번호: 15, 16, 21, 또는 22), 및 돼지 테스코바이러스-1(P2A, 예를 들어, 서열번호: 17 또는 18)로부터의 2A 서열을 포함한다.

[0444] 벡터 또는 작제물(예를 들어, 이식유전자)이 단백질을 암호화하는 하나 초과와 핵산 서열, 예를 들어, CD47을 암호화하는 제1 외인성 폴리뉴클레오티드, 및 제2 이식유전자를 암호화하는 제2 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유하는 경우에, 벡터 또는 작제물(예를 들어, 이식유전자)은 제1 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우에, 제1 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드 사이에 위치한 핵산 서열은 번역 도중 또는 후에 제1 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드의 번역 생성물을 분리하는 펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 자기-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑(리보솜 스킵 요소)을 유발하는 펩티드, 예컨대 T2A 펩티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소의 포함은 단일 번역 개시 부위로부터 2개 이상의 폴리펩티드의 발현을 허용한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 T2A 펩티드인 자기-절단 펩티드이다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 15로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 16으로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 21로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열번호: 22로 제시된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다.

[0445] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 1차 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질 매개 형질감염, 전기천공법, 트랜스포사제-매개 전달, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스 형질도입)을 통해 세포 내로 도입되거나 달리 바이러스 벡터 상에 전달된다(예를 들어, 융합원-매개 전달). 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 패키징하는 벡터는 패

키징된 폴리뉴클레오티드를 세포 또는 세포 집단에 전달하는 데 사용될 수 있다. 이들 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 바이러스 벡터 및 입자를 포함한 임의의 종류의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 데 사용될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 잘 알려져 있으며 Sambrook 등(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 종양용해성 바이러스 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 것은 특이적(표적화) 또는 비특이적(예를 들어 비표적화)일 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 것은 세포의 게놈 내의 통합 또는 삽입을 초래할 수 있다. 다른 구현예에서, 도입된 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포에서 비통합되거나 에피솜일 수 있다. 당업자는 본원에 기재된 임의의 예시적인 방법을 포함하여 핵산 이식유전자를 세포 내로 도입하는 방법에 친숙하며, 적합한 방법을 선택할 수 있다.

[0446] 1) 비표적화 전달

[0447] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 임의의 다양한 비표적화 방법에 의해 1차 세포(예를 들어 공급원 세포) 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포의 무작위 게놈 유전자좌로 삽입된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 포함한 바이러스 벡터는 유전적 물질을 숙주 세포에 전달하고 외래 또는 외인성 유전자를 숙주 세포에 무작위로 삽입하여 유전자의 안정한 발현 및 복제를 용이하게 하는 데 통상적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 비표적화 도입하는 것은 세포 내 외인성 폴리뉴클레오티드의 안정한 발현을 위한 조건 하에 이루어진다. 일부 구현예에서, 세포에서 안정한 발현을 위해 핵산을 도입하는 방법은 핵산을 세포의 게놈 내로 안정하게 통합되도록 하는 임의의 방법을 수반하여, 통합된 세포가 분할하는 경우 증식될 수 있도록 한다.

[0448] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 렌티바이러스 벡터는 전달된 핵산 전사체 내에 함유된 유전자의 안정한 발현을 허용하므로 성공적인 바이러스 형질도입을 위한 특히 유용한 수단이다. 렌티바이러스 벡터는 역전사효소 및 인테그라제를 발현하며, 두 효소는 전달된 핵산 전사체 내에 함유된 유전자의 안정한 발현에 필요하다. 역전사효소는 RNA 전사체를 DNA로 전환하는 반면, 인테그라제는 DNA를 표적 세포의 게놈 내로 삽입하고 통합한다. 일단 DNA가 게놈 내로 안정하게 통합되면, 숙주와 함께 분열한다. 통합된 DNA 내에 함유된 관심 유전자는 구성적으로 발현될 수 있거나 유도성일 수 있다. 숙주 세포 게놈의 일부로서, 표적 세포에서 인자의 숙주에 따라 활성화 또는 억제를 포함한 세포 조절을 겪을 수 있다.

[0449] 렌티바이러스는 바이러스의 레트로비리다에(Retroviridae) 계열의 하위그룹이며, 숙주 게놈 내로 통합되기 전에 바이러스 RNA 게놈의 DNA로의 역전사가 필요하기 때문에 명명된다. 이와 같이, 렌티바이러스 비히클/입자의 가장 중요한 특징은 유전적 물질이 표적/숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 것이다. 렌티바이러스의 일부 예는 인간 면역결핍 바이러스: HIV-1 및 HIV -2, 유인원 면역결핍 바이러스(SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 소 면역결핍 바이러스(BIV), 캄브라나병 바이러스(JDV), 말 전염성 빈혈 바이러스(EIAV), 말 전염성 빈혈, 바이러스, 비스나-메디(visna-maedi) 및 염소 관절염 뇌염 바이러스(CAEV)를 포함한다.

[0450] 전형적으로, 유전자 전달 비히클을 구성하는 렌티바이러스 입자는 그 자체로 복제 결함이 있다("자기-불활성화"라고도 언급됨). 렌티바이러스는 온전한 숙주 핵 외피를 통한 진입 메커니즘에 의해 분할 및 비분할 세포 둘 다를 감염시킬 수 있다(Naldini L 등, *Curr. Opin. Bioiecknol*, 1998, 9: 457-463). 재조합 렌티바이러스 비히클/입자는 HIV 독성 유전자를 다중적으로 약화시킴으로써 생성되었으며, 예를 들어, 유전자 Env, Vif, Vpr, Vpu, Nef 및 Tat가 결실되어 벡터를 생물학적으로 안전하게 만든다. 상응하게, 예를 들어, HIV- 1 /HIV-2로부터 유래된 렌티바이러스 비히클은 이식유전자의 비분할 세포로의 효율적인 전달, 통합 및 장기간 발현을 매개할 수 있다.

[0451] 렌티바이러스 입자는 인간 HEK293T 세포와 같은 생산자 세포에서 바이러스 패키징 요소 및 벡터 게놈 게놈 자체를 공동 발현함으로써 생성될 수 있다. 이들 요소는 일반적으로 3개(제2 세대 렌티바이러스 시스템) 또는 4개의 별도의 플라스미드(제3 세대 렌티바이러스 시스템)에 제공된다. 생산자 세포는 바이러스의 코어(즉 구조적 단백질) 및 효소적 구성요소, 및 외피 단백질(들)(패키징 시스템으로 언급됨)을 포함한 렌티바이러스 구성요소를 암호화하는 플라스미드, 및 표적 세포인 비히클 자체로 전달될 외래 이식유전자를 포함하는 게놈(전달 벡터로도 언급됨)을 암호화하는 플라스미드로 공동 형질감염된다. 일반적으로, 플라스미드 또는 벡터는 생산자 세포주에 포함된다. 플라스미드/벡터는 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 생산자 세포주에 도입된다. 형질감염, 형질

도입 또는 감염 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 비제한적인 예로서, 패키징 및 전달 작제물은 일반적으로 네오마이신(neo), 디하이드폴레이트 환원효소(DHFR), 글루타민 합성효소 또는 아데노신 데아미나제(ADA)와 같은 우세한 선택가능한 마커와 함께 인산칼슘 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공법에 의해 생산자 세포주 내로 도입된 후, 적절한 약물의 존재 하에 선택되고 클론이 단리될 수 있다.

[0452] 생산자 세포는 외래 유전자, 예를 들어, 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 재조합 바이러스 입자를 생성한다. 재조합 바이러스 입자는 배양 배지로부터 회수되고 당업자에 의해 사용되는 표준 방법에 의해 적정된다. 재조합 렌티바이러스 비히클은 섹션 II.C에 기재된 임의의 것을 포함하여 공급원 세포와 같은 표적 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있다.

[0453] 높은 역가 렌티바이러스 입자를 생성하는 데 사용될 수 있는 세포는 HEK293T 세포, 293G 세포, STAR 세포 (Relander 등, Mol Ther. 2005, 11: 452- 459), FreeStyle™ 293 발현 시스템(ThermoFisher, Waltham, MA), 및 다른 HEK293T- 기반 생산자 세포주(예를 들어, Stewart 등, Hum Gene Ther. 2011, 2,2.(3):357~369; Lee 등, Biotechnol Bioeng, 2012, 10996): 1551-1560; Throm 등. Blood. 2009, 113(21): 5104-5110)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0454] 렌티바이러스 입자에 제공되는 추가적인 요소는 5' 또는 3' 말단에 레트로바이러스 LTR(긴 말단 반복부), 레트로바이러스 유출 요소, 임의적으로 렌티바이러스 역반응 요소(RRE), 프로모터 또는 이의 활성 부분, 및 유전자 좌 제어 영역(LCR) 또는 이의 활성 부분을 포함할 수 있다. 다른 요소는 비분할 세포에서 형질도입 효율을 개선시키는 중앙 폴리퓨린 관(cPPT) 서열, 이식 유전자의 발현을 향상시키고 역가를 증가시키는 우드척 간염 바이러스(WHP) 전사후 조절 요소(WPRE)를 포함한다.

[0455] 재조합 렌티바이러스 입자를 생성하는 방법은 당업자, 예를 들어, 미국 특허 번호: 8,846,385; 7,745,179; 7,629,153; 7,575,924; 7,179,903; 및 6,808,905에 알려져 있다. 사용되는 렌티바이러스 벡터는 pLVX, pLenti, pLenti6, pLJMI, FUGW, pWPXL, pWPI, pLenti CMV 퓨로 DEST, pLJMI-EGFP, pULTRA, pInducer2Q, pHIV-EGFP, pCW57.1, pTRPE, pELPS, pRRL, 및 pLionII로부터 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 임의의 알려진 렌티바이러스 비히클이 또한 사용될 수 있다(미국 특허 번호 9,260,725: 9,068,199: 9,023,646: 8,900,858: 8,748,169; 8,709,799; 8,420,104; 8,329,462; 8,076,106; 6,013,516: 및 5,994, 136; 국제 특허 공개 번호: WO2012079000 참조).

[0456] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 외인성 폴리뉴클레오티드의 에피솜 전달을 초래하는 방법에 의해서와 같은 세포의 일시적 발현을 위한 조건 하에 세포 내로 도입된다.

[0457] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 아데노 연관 바이러스 (rAAV) 벡터에 패키징될 수 있다. 이러한 벡터 또는 바이러스 입자는 임의의 알려진 혈청형 캡시드 또는 혈청형 캡시드의 조합을 활용하도록 설계될 수 있다. 혈청형 캡시드는 임의의 식별된 AAV 혈청형 및 이의 변이체, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV2G9, AAV3, AAV4, AAV4-4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 및 AAVrh10으로부터의 캡시드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 혈청형은 미국 공개 번호 US20030138772; Pulicherla 등 Molecular Therapy, 2011, 19(6): 1070-1078; 미국 특허 번호 : 6,156,303; 7,198,951; 미국 특허 공개 번호 : US2015/0159173 및 US2014/0359799: 및 국제 특허 공개 번호: WO1998/011244, WO2005/033321 및 WO2014/14422에 기재된 바와 같은 서열일 수 있거나 가질 수 있다.

[0458] AAV 벡터는 단일 가닥 벡터뿐만 아니라 자기 상보성 AAV 벡터(scAAV)를 포함한다. scAAV 벡터는 함께 어닐링되어 이중 가닥 벡터 게놈을 형성하는 DNA를 함유한다. 제2 가닥 합성을 스킵핑함으로써, scAAV는 세포에서 신속한 발현을 허용한다. rAAV 벡터는 sf9 곤충 세포 또는 HEK293 세포와 같은 인간 세포의 현탁액 세포 배양물에서 삼중 형질감염에 의해서와 같은 당업계의 표준 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0459] 일부 구현예에서, 비바이러스 기반 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 바늘, 전기천공법, 초음파천공, 수산화천공과 같은 물리적 방법; 무기 입자(예를 들어 인산칼슘, 실리카, 금)와 같은 화학적 담체 및/또는 화학적 방법에 의한 비바이러스 방법에 의해 세포에 전달될 수 있다. 다른 측면에서, 양이온성 지질, 지질 나노 에멀전, 나노입자, 펩티드-기반 벡터, 또는 중합체-기반 벡터와 같은 합성 또는 천연 생분해성 제제가 전달을 위해 사용될 수 있다.

[0460] 2) 표적화 전달

[0461] 외인성 폴리뉴클레오티드는 1차 세포의 임의의 적합한 표적 게놈 유전자좌로 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 표적 유전자좌 내로의 표적화된 통합에 의해 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서,

표적화 통합은 상동성 의존적 또는 상동성 독립적 재조합을 수반하는 과정에서 하나 이상의 뉴클레아제 및/또는 니카제 및 공여자 주형을 사용하는 유전자 편집에 의해 달성될 수 있다.

[0462] 예를 들어 상동성 지시 복구(HOR), 상동성 매개 말단 연결(HMEJ), 상동성 독립적 표적화 통합(HITI), 절대 결찰 개폐 재조합(ObliGaRe), 또는 표적 염색체 내로의 정확한 통합(PITCh)을 포함하는 다수의 유전자 편집 방법을 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 선택된 특이적 게놈 유전자좌로 삽입할 수 있다.

[0463] 일부 구현예에서, 뉴클레아제는 게놈 내 원하는 위치(예를 들어 표적 부위)에 특이적 이중 가닥 파손(DSB)을 생성하고, 유도된 파손을 복구하기 위해 세포의 내인성 메커니즘을 활용한다. 니카제는 게놈 내 원하는 위치에 특이적 단일 가닥 파손을 생성한다. 하나의 비제한적인 예에서, 2개의 니카제를 사용하여 표적 DNA의 반대 가닥 상에 2개의 단일 가닥 파손을 생성하여, 뭉뚱하거나 점착성 말단을 생성할 수 있다. CRISPR-연관 단백질(Cas) 뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 다른 엔도- 또는 엑소-뉴클 에아제(nucl ease), 이의 변이체, 이의 단편, 및 이의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 뉴클레아제가 세포 내로 도입되어 표적 DNA 서열의 게놈 편집을 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제 또는 니카제가 내인성 게놈 표적 유전자좌, 예를 들어 안전한 항구 유전자좌에 또는 근처에 있는 서열에 상동성인 상동성 서열(예를 들어, 상동성 아암)의 측면에 있는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형(이식유전자좌도 불림)과 함께 도입되는 경우, DNA 손상 복구 경로는 세포 내 표적 부위에서 이식유전자 서열의 통합을 초래할 수 있다. 이는 상동성 의존적 과정에 의해 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 공여자 주형은 원형 이중 가닥 플라스미드 DNA, 단일 가닥 공여자 올리고뉴클레오티드(ssODN), 선형 이중 가닥 중합효소 연쇄 반응(PCR) 단편, 또는 온전한 자매 염색분체의 상동 서열이다. 공여자 주형 형태에 따라, 상동성 매개 유전자 삽입 및 대체는 상동성 지시 복구(HDR), 합성 의존적 가닥 어닐링(SDSA), 미세상동성 매개 말단 연결(MMEJ), 및 상동성 매개 말단 연결(HMEJ) 경로와 같은 특이적 DNA 복구 경로를 통해 수행될 수 있다.

[0464] 예를 들면, DNA 복구 메커니즘은 (i) 각 가닥에 SSB가 있어서 단일 가닥 돌출부를 유도하는 2개의 SSB; 또는 (ii) 두 가닥의 동일한 절단 부위에서 발생하여 뭉뚱한 단부 파손을 유도하는 DSB 이후 뉴클레아제에 의해 유도될 수 있다. 이들 제제 중 하나에 의한 절단 시, SSB 또는 DSB가 있는 표적 유전자좌는 DNA 손상 복구를 위한 다음 2가지 주요 경로 중 하나를 겪는다: (1) 오류가 발생하기 쉬운 비상동 말단 연결(NHEJ), 또는 (2) 고충실도 상동성 지시 복구(HDR) 경로. 일부 구현예에서, SSB 또는 DSB가 있는 세포 내로 도입된 공여자 주형(예를 들어 원형 플라스미드 DNA 또는 선형 DNA 단편, 예컨대 ssODN)은 HDR 및 공여자 주형의 표적 유전자좌로의 통합을 초래할 수 있다. 일반적으로, 공여자 주형의 부재 하에, NHEJ 과정은 절단된 DNA 가닥의 단부를 재결찰하여 절단 부위에서 뉴클레오티드 결실 및 삽입을 빈번하게 초래한다.

[0465] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 부위 지정 삽입하는 것은 HDR-기반 접근법을 통해 달성될 수 있다. HDR은 세포가 DNA에서 이중 가닥 파손(DSB)을 복구하는 메커니즘이며 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR)/Cas 시스템, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 및 트랜스포사제를 포함한 다양한 유전자 편집 시스템을 사용하여 많은 유기체에서 게놈을 변경시키는 데 활용될 수 있다.

[0466] 일부 구현예에서, 표적화 통합은 DNA-결합 표적화 뉴클레아제 및 유전자 편집 뉴클레아제 예컨대 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 및 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 RNA-가이드 뉴클레아제 예컨대 CRISPR-연관 뉴클레아제(Cas) 시스템을 포함하는 표적화하도록 특이적으로 설계된 하나 이상의 서열-특이적 또는 표적화 뉴클레아제를 표적 유전자의 적어도 하나의 표적 부위(들) 서열에 도입함으로써 수행된다. 예시적인 ZFN, TALE, 및 TALEN은 예를 들어, Lloyd 등, *Frontiers in Immunology*, 4(221): 1-7(2013)에 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 표적 부위 또는 근처에서 표적화된 유전적 파괴는 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR) 및 CRISPR-연관(Cas) 단백질을 사용하여 수행된다. Sander and Joung, (2014) *Nature Biotechnology*, 32(4): 347-355를 참조한다.

[0467] 섹션 II. A.1에 기재된 유전자 파괴를 위한 임의의 시스템이 사용될 수 있고, 또한 외인성 폴리뉴클레오티드를 갖는 적절한 공여자 주형과 함께 도입되는 경우, 예를 들어 이식유전자 서열은 유전적 파괴의 표적 부위 또는 근처에 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적화 통합을 초래할 수 있다. 특정 구현예에서, 유전적 파괴는 하나 이상의 가이드 RNA(gRNA) 및 Cas 단백질을 함유하는 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 매개된다. 예시적인 Cas 단백질 및 gRNA는 상기 섹션 II.A에 기재되어 있으며, 그 중 임의의 것이 외인성 폴리뉴클레오티드의 CRISPR/Cas 시스템을 특이적인 표적 유전자좌 내로 HDR 매개 통합하는 데 사용될 수 있다. 예컨대 HDR에 의한 외인성 폴리뉴클레오티드의 절단 및 통합을 위한 특정 표적 유전자좌 및 표적부위에 따라 적절한 Cas 뉴클레아제 및 gRNA를 선

택하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 추가로, 표적 유전자좌에 따라 당업자는 아래에 추가로 기재된 것과 같은 적절한 공여자 주형을 용이하게 제조할 수 있다.

- [0468] 일부 구현예에서, DNA 편집 시스템은 RNA-가이드 CRISPR/Cas 시스템(예컨대 RNA-기반 CRISPR/Cas 시스템)이며, 여기서 CRISPR/Cas 시스템은 표적 유전자좌(예를 들어 안전한 항구 유전자좌)에서 이중 가닥 파손을 생성하여 이식유전자의 표적 유전자좌로의 삽입을 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제 시스템은 CRISPR/Cas9 시스템이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 플라스미드-기반 Cas9를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 RNA-기반 Cas9를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9 mRNA 및 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 단백질/RNA 복합체, 또는 플라스미드/RNA 복합체, 또는 단백질/플라스미드 복합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 이식유전자 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형 및 DNA 뉴클레아제 시스템(예를 들어 Cas9) 및 유전자좌-특이적 gRNA를 포함하는 DNA 뉴클레아제 시스템을 공급원 세포(예를 들어 1차 세포)에 도입하는 것을 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, Cas9는 mRNA로서 도입된다. 일부 구현예에서, Cas9는 gRNA와 함께 리보핵단백질 복합체로서 도입된다.
- [0469] 일반적으로, 삽입될 공여자 주형은 관심 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 관용원성 인자 또는 CAR)를 함유하는 적어도 이식유전자 카세트(예를 들어, 프로모터, 예를 들어, 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된 이식유전자); 및 (ii) 이식유전자 카세트 측면에 있고 DNA 뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예컨대 Cas9 또는 Cas12) 절단 부위의 양쪽에서 표적 유전자좌(예를 들어 안전한 항구 유전자좌)의 부분에 상동성인 2개의 상동성 아암을 포함한다. 공여자 주형은 선택가능한 마커, 검출가능한 마커, 및/또는 정제 마커를 추가로 포함할 수 있다.
- [0470] 일부 구현예에서, 공여자 주형(예를 들어, 재조합 공여자 복구 주형)은 (i) 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 이식유전자 카세트(예를 들어, 프로모터, 예를 들어, 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된 이식유전자); 및 (ii) 이식유전자 카세트 측면에 있고 DNA 뉴클레아제(예를 들어, Cas 뉴클레아제, 예컨대 Cas9 또는 Cas12) 절단 부위의 양쪽에서 표적 유전자좌(예를 들어 안전한 항구 유전자좌)의 부분에 상동성인 2개의 상동성 아암을 포함한다. 공여자 주형은 선택가능한 마커, 검출가능한 마커, 및/또는 정제 마커를 추가로 포함할 수 있다.
- [0471] 일부 구현예에서, 상동성 아암은 동일한 길이이다. 다른 구현예에서, 상동성 아암은 상이한 길이이다. 상동성 아암은 적어도 약 10개의 염기쌍(bp), 예를 들어, 적어도 약 10 bp, 15 bp, 20 bp, 25 bp, 30 bp, 35 bp, 45 bp, 55 bp, 65 bp, 75 bp, 85 bp, 95 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp, 550 bp, 600 bp, 650 bp, 700 bp, 750 bp, 800 bp, 850 bp, 900 bp, 950 bp, 1000 bp, 1.1 킬로염기(kb), 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb, 1.5 kb, 1.6 kb, 1.7 kb, 1.8 kb, 1.9 kb, 2.0 kb, 2, 1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2,7 kb, 2,8 kb, 2,9 kb, 3.0 kb, 3.1 kb, 3.2 kb, 3.3 kb, 3.4 kb, 3.5 kb, 3.6 kb, 3.7 kb, 3.8 kb, 3.9 kb, 4.0 kb, 또는 그 이상일 수 있다. 상동성 아암은 약 10 bp 내지 약 4 kb, 예를 들어, 약 10 bp 내지 약 20 bp, 약 10 bp 내지 약 50 bp, 약 10 bp 내지 약 100 bp, 약 10 bp 내지 약 200 bp, 약 10 bp 내지 약 500 bp, 약 10 bp 내지 약 1 kb, 약 10 bp 내지 약 2 kb, 약 10 bp 내지 약 4 kb, 약 100 bp 내지 약 200 bp, 약 100 bp 내지 약 500 bp, 약 100 bp 내지 약 1 kb, 약 100 bp 내지 약 2 kb, 약 100 bp 내지 약 4 kb, 약 500 bp 내지 약 1 kb, 약 500 bp 내지 약 2 kb, 약 500 bp 내지 약 4 kb, 약 1 kb 내지 약 2 kb, 약 1 kb 내지 약 4 kb, 또는 약 2 kb 내지 약 4 kb일 수 있다.
- [0472] 일부 구현예에서, 공여자 주형은 발현 벡터에 클로닝될 수 있다. 당업자에게 알려져 있는 통상적인 바이러스 및 비바이러스 기반 발현 벡터가 사용될 수 있다.
- [0473] 일부 구현예에서, 통합을 위해 표적화된 표적 유전자좌는 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자의 통합을 표적화하는 것을 허용하거나 바람직한 임의의 유전자좌일 수 있다. 표적 유전자좌의 비제한적인 예는 CXCR4 유전자, 알부민 유전자, SHS231 유전자좌, F3 유전자(CD142로도 알려짐), MICA 유전자, MICB 유전자, LRP1 유전자(CD91로도 알려짐), HMGB1 유전자, ABO 유전자, RHD 유전자, FUT1 유전자, KDM5D 유전자(HY로도 알려짐), B2M 유전자, CIITA 유전자, TRAC 유전자, TRBC 유전자, CCR5 유전자, F3(즉, CD142) 유전자, LRP1 유전자, HMGB1 유전자, ABO 유전자, RHD 유전자, FUT1 유전자, KDM5D(즉, HY) 유전자, PDGFRa 유전자, OLIG2 유전자, 및/또는 GFAP 유전자를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 인트론, 엑손, 및/또는 유전자 코딩 영역(코딩 서열, 또는 "CDS"로도 알려짐)을 포함한 표적 유전자좌(예를

들어 안전한 항구 유전자좌)의 적합한 영역에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 삽입은 표적 게놈 유전자좌의 하나의 대립유전자에서 발생한다. 일부 구현예에서, 삽입은 표적 게놈 유전자좌의 두 대립유전자에서 발생한다. 이들 구현예 중 어느 하나에서, 표적 게놈 유전자좌로 삽입된 이식유전자의 배향은 해당 유전자좌에서 유전자의 방향과 동일하거나 반대일 수 있다.

[0474] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 안전한 항구 유전자 유전자좌의 인트론, 엑손, 또는 코딩 서열 영역에 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 내인성 유전자에 삽입되며 여기서 삽입은 내인성 유전자의 침묵 또는 감소된 발현을 유발한다. 외인성 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위한 예시적인 게놈 유전자좌는 표 4에 도시되어 있다.

[0475] 표 4: 외인성 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위한 예시적인 게놈 유전자좌

번호	종	이름	Ensembl ID	절단을 위한 표적 부위	알려진 다른 이름
1	인간	B2M	ENSG00000166710	CDS	
2	인간	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	인간	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	인간	PPP1R12C	ENSG00000125503	인트론 1 및 2	AAVS1
5	인간	CLYBL	ENSG00000125246	인트론 2	
6	인간	CCR5	ENSG00000160791	엑손 1-3, 인트론 1-2, 및 CDS	
7	인간	THUMP3-AS1	ENSG00000206573	인트론 1	ROSA26
8	인간	Ch-4:58,976,613		500 bp 창	SHS231
9	인간	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	인간	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	인간	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	인간	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	인간	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	인간	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	인간	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	인간	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	인간	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

[0476]

[0477] 일부 구현예에서, 표적 유전자좌는 안전한 항구 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 안전한 항구 유전자좌는 인근 또는 인접한 내인성 유전자, 조절 요소 등에 최소한으로 영향을 미치는 통합된 DNA의 안정한 발현을 허용하는 게놈 위치이다. 일부 경우에, 안전한 항구 유전자는 지속가능한 유전자 발현을 가능하게 하며 유도체를 포함한 1차 세포, 및 이의 분화된 세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 유전자 변형을 위해 조작된 뉴클레아제에 의해 표적화될 수 있다. 안전한 항구 유전자좌의 비제한적인 예는 CCR5 유전자 유전자좌, PPP1R12C(AAVS1로도 알려짐) 유전자 유전자좌, CLYBL 유전자 유전자좌, 및/또는 Rosa 유전자 유전자좌(예를 들어, ROSA26 유전자 유전자좌)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예, 안전한 항구 유전자좌는 AAVS1 유전자좌, CCR5 유전자좌, 및 CLYBL 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에 SHS231은 많은 세포 유형에서 안전한 항구 유전자좌로서 표적화될 수 있다. 일부 경우에, 특정 유전자좌는 특정 세포 유형에서 안전한 항구 유전자좌로서 기능할 수 있다. 예를 들면, PDGFRa는 신경교 전구 세포(GPC)에 대한 안전한 항구이고, OLIG2는 희소돌기아 교세포에 대한 안전한 항구 유전자좌이고, GFAP는 성상세포에 대한 안전한 항구 유전자좌이다. 특정한 조작된 세포 유형에 따라 적절한 안전한 항구 유전자좌를 선택하는 것이 당업자의 수준 내에 있다. 일부 경우에, 하나 초과 안전한 항구 유전자가 표적화되어 하나 초과 이식유전자가 유전자 변형된 세포 내로 도입될 수 있다.

[0478] 일부 구현예에서, 이식유전자 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열 및 DNA 뉴클레아제 시스템(예를 들어 Cas9)을 포함한 DNA 뉴클레아제 시스템 및 CCR5 유전자 유전자좌, PPP1R12C(AAVS1로도 알려짐) 유전자 유전자좌, CLYBL 유전자 유전자좌, 및/또는 Rosa 유전자 유전자좌(예를 들어, ROSA26 유전자 유전자좌)에 특이적인 상보적 부분을 포함하는 유전자좌-특이적 gRNA(예를 들어 gRNA 표적화 서열)를 함유하는 공여자 주형을 공급원 세포(예를 들어 1차 세포) 내로 도입하는 것을 포함하는 조작된 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 게놈 유전자좌는 기재된 바와 같은 임의의 유전자좌의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내에 위치한다.

[0479] 일부 구현예에서, 이식유전자의 HDR 매개 삽입을 위해 본원에 사용된 gRNA는 AAVS1에서 표적 서열을 인식하는 상보적 부분(예를 들어 gRNA 표적화 서열)을 포함한다. 특정한 이들 구현예에서, 표적 서열은 AAVS 1의 인트론 1에 위치한다. AAVS1은 염색체 19: 55,090,918-55,117,637 역가닥에 위치하고, AAVS1 인트론 1(전사체 ENSG00000125503에 기반)은 염색체 19: 55,117,222-55,112,796 역가닥에 위치한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 19: 55, 117,222-55, 112,796의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 유전자좌를 표적한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 유전자좌를 표적한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 19: 55, 115,674, 또는 염색체 19: 55, 115,674의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오티드 이내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에서, gRNA는 Li 등, Nat. Methods 16:866-869(2019)에 기재된 "sgAAVS1-1"로도 알려진 GET000046이다. 이 gRNA는 서열번호: 26에 제시된 핵산 서열(예를 들어 표 5)을 갖는 상보적 부분(예를 들어 gRNA 표적화 서열)을 포함하고 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐)의 인트론 1을 표적한다.

[0480] 일부 구현예에서, 이식유전자의 HDR 매개 삽입을 위해 본원에 사용되는 gRNA는 CLYBL에서 표적 서열을 인식하는 상보적 부분(예를 들어 gRNA 표적화 서열)을 포함한다. 특정한 이들 구현예에서, 표적 서열은 CL YBL의 인트론 2에 위치한다. CLYBL은 염색체 13: 99,606,669-99,897, 134 정방향 가닥에 위치하고, CLYBL 인트론 2(전사체 ENST00000376355.7에 기반)는 염색체 13: 99,773,011-99,858,860 정방향 가닥에 위치한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 13: 99,773,011-99,858,860의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 유전자좌를 표적한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 13: 99,822,980의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 유전자좌를 표적한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 13: 99,822,980, 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 0, 15, 20, 30, 40 또는 50개 뉴클레오티드 이내의 위치에 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에서, gRNA는 서열번호: 27에 제시된 핵산 서열(예를 들어 표 5)을 갖는 상보적 부분(예를 들어 gRNA 표적화 서열)을 포함하고 CLYBL의 인트론 2를 표적하는 GET000047이다. 표적 부위는 Cerbini 등, PLoS One, 10(1): e0116032(2015)에 기재된 바와 같은 TALEN의 표적 부위와 유사하다.

[0481] 일부 구현예에서, 이식유전자의 HDR 매개 삽입을 위해 본원에 사용되는 gRNA는 CCR5에서 표적 서열을 인식하는 상보적 부분(예를 들어 gRNA 표적화 서열)을 포함한다. 특정한 이들 구현예에서, 표적 서열은 CCR5의 엑손 3에 위치한다. CCR5는 염색체 3: 46,370,854-46,376,206 정방향 가닥에 위치하고, CCR5 엑손 3(전사체 ENST00000292303.4에 기반)은 염색체 3: 46,372,892-46,376,206 정방향 가닥에 위치한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 3: 46,372,892-46,376,206의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 유전자좌를 표적한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 3: 46,373,180의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내의 게놈 유전자좌를 표적한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 3: 46,373,180, 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40, 또는 50개 뉴클레오티드 이내의 위치에 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에서 gRNA는 Mandal 등, Cell Stem Cell 15:643-652(2014)에 기재된 "crCCR5_D"로도 알려진 GET000048이다. 이 gRNA는 서열번호: 28에 제시된 핵산 서열(예를 들어 표 5)을 갖는 상보적 부분을 포함하고 CCR5의 엑손 3(대안적으로 Ensembl 게놈 데이터베이스에서 엑손 2로 주석이 달림)을 표적한다. Gomez-Ospina 등, Nat. Comm. 10(1):4045(2019)를 참조한다.

[0482] 표 5는 예시적인 gRNA 표적화 서열을 제시한다. 일부 구현예에서, gRNA 표적화 서열은 표 5에 제시된 상보적 부분 서열 중 우라실로 치환된 하나 이상의 티민을 함유할 수 있다. 우라실 및 티민은 우라실의 경우 'u' 및 티민의 경우 't' 대신 둘 다 't'로 표시될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이며; 리보핵산의 맥락에서, 't'는 달리 나타내지 않는 한 우라실을 표시하기 위해 사용되는 것으로 이해될 것이다.

[0483] 표 5. CCR5에 대한 예시적인 gRNA 표적화 서열

설명	핵산 서열	서열번호
GET000046 가이드	(5' →3') accccacagtggggccacta	26
GET000047 가이드	(5' →3') tgttgaaggatgaggaaat	27
GET000048 가이드	(5' →3') tcactatgctgcccccagt	28

[0484] 일부 구현예에서, 표적 유전자좌는 세포에서 녹아웃되기를 바라는 유전자좌이다. 이러한 구현예에서, 이러한 표

적 유전자좌는 세포의 표현형 또는 기능을 조절하는 것과 같이 세포에서 파괴 또는 제거가 바람직한 임의의 표적 유전자좌이다. 예를 들면, 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 섹션 II.A에 기재된 임의의 유전자 변형은 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적화된 통합을 위한 원하는 표적 유전자좌일 수 있으며, 여기서 표적 유전자의 유전적 파괴 또는 녹아웃 및 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적화 삽입에 의한 과발현은 세포 내 동일한 표적 부위 또는 유전자좌에서 달성될 수 있다. 예를 들면, HDR 과정은 표 1b에 제시된 임의의 표적 유전자의 발현을 제거 또는 감소(예를 들어 녹다운)시키기 위한 유전자 파괴를 초래하면서 유전적 파괴의 표적 부위 또는 근처에서 핵산 서열에 상동성인 상동성 아암이 측면에 있는 공여자 주형을 사용함으로써 외인성 폴리뉴클레오티드를 표적 유전자 내로 통합(예를 들어 녹인)시키는 데 사용될 수 있다.

[0486] 일부 구현예에서, 이식유전자 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열 및 DNA 뉴클레아제 시스템(예를 들어 Cas9)을 포함한 DNA 뉴클레아제 시스템 및 B2M 유전자좌, CIITA 유전자좌, TRAC 유전자좌, TRBC 유전자좌에 특이적인 상보적 부분을 포함하는 유전자좌-특이적 gRNA를 함유하는 공여자 주형을 공급원 세포(예를 들어 1차 세포) 내로 도입하는 것을 포함하는 조작된 1차 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 게놈 유전자좌는 기재된 바와 같은 임의의 유전자좌의 4000 bp 이내, 3500 bp 이내, 3000 bp 이내, 2500 bp 이내, 2000 bp 이내, 1500 bp 이내, 1000 bp 이내, 또는 500 bp 이내에 위치한다.

[0487] 특정 구현예에서, 표적 유전자좌는 B2M이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 B2M 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템을 사용함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산(gRNA) 서열은 W02016/183041의 부록 2 또는 표 15의 서열번호:81240-85644로 이루어진 군으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 상동성 아암 측면에 있는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 B2M 유전자좌 내로 통합된다.

[0488] 특정 구현예에서, 표적 유전자좌는 CIITA이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 CIITA 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열은 W0201618304의 부록 1 또는 표 12의 서열번호:5184-36352로 이루어진 군으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 상동성 아암 측면에 있는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 CIITA 유전자좌 내로 통합된다.

[0489] 일부 구현예에서, 1차 세포는 T 세포이고 내인성 TRAC 또는 TRBC 유전자좌의 발현은 유전자 편집 방법에 의해 세포에서 감소되거나 제거된다. 예를 들면, HDR 과정은 TRAC 또는 TRBC 유전자의 발현을 제거 또는 감소(예를 들어 녹아웃)시킴으로써 유전적 파괴를 초래하면서 또한 유전적 파괴의 표적 부위 또는 근처에 있는 핵산 서열에 상동성인 상동성 아암 측면에 있는 공여자 주형을 사용함으로써 외인성 폴리뉴클레오티드를 동일한 유전자좌로 통합(예를 들어 녹인)하는 것을 초래하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 유전자의 CRISPR/Cas-기반 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 서열은 표 6에 제공되어 있다. 서열은 US20160348073에서 찾을 수 있으며, 서열 목록을 포함한 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0490] 표 6. 유전자를 표적화하는 데 유용한 예시적인 gRNA 표적화 서열

유전자명	US20160348073의 서열번호
TRAC	서열번호: 532-609 및 9102-9797
TRB(또한 TCRB, 및 TRBC)	서열번호:610-765 및 9798-10532

[0491] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 TRAC 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TRAC

유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열(예를 들어 gRNA 표적화 서열)은 US20160348073의 서열번호: 서열번호: 532-609 및 9102-9797로 이루어진 군으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 상동성 아암 측면에 있는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 TRAC 유전자좌 내로 통합된다.

[0493] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 TRBC 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TRBC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 가이드 리보핵산 서열(예를 들어 gRNA 표적화 서열)은 US20160348073의 서열번호: 서열번호:610-765 및 9798-10532로 이루어진 군으로부터 선택되며, 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 상동성 아암 측면에 있는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 TRBC 유전자좌 내로 통합된다.

[0494] 일부 구현예에서, 기재된 바와 같은 HDR 매개 통합 접근법에 사용하기 위한 새로운 유전자좌 및/또는 gRNA 서열을 식별하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우, 특정 유전자좌(예를 들어, 예를 들어 표 1b에 제시된 표적 유전자좌 내)에 대한 기존 gRNA가 알려져 있는 경우, "인치 워밍" 접근법은 일반적으로 게놈에 걸쳐 약 100개 염기쌍(bp)마다 발생하는 PAM 서열에 대한 유전자좌의 양쪽에 있는 측면 영역을 스캐닝함으로써 이식유전자의 표적화 삽입을 위한 추가적인 유전자좌를 식별하는 데 사용될 수 있다. PAM 서열은 상이한 뉴클레아제가 일반적으로 상이한 상응하는 PAM 서열을 갖기 때문에 사용되는 특정 Cas 뉴클레아제에 따라 달라질 것이다. 유전자좌의 양쪽에 있는 측면 영역은 약 500 내지 4000 bp 길이, 예를 들어, 약 500 bp, 약 1000 bp, 약 1500 bp, 약 2000 bp, 약 2500 bp, 약 3000 bp, 약 3500 bp, 또는 약 4000 bp 길이일 수 있다. PAM 서열이 검색 범위 내에서 식별되는 경우, 새로운 가이드는 유전적 파괴 방법에서 사용하기 위한 해당 유전자좌의 서열에 따라 설계될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템이 예시로서 기재되어 있지만, 기재된 바와 같은 임의의 HDR 매개 접근법은 ZFN, TALENS, 메가뉴클레아제 및 트랜스포사제를 사용하는 것들을 포함하여 새로운 유전자좌를 식별하는 이 방법에 사용될 수 있다.

[0495] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 외인성 CD47 폴리펩티드(예를 들어, 인간 CD47 폴리펩티드)를 암호화하고 외인성 폴리펩티드는 본원에 개시된 바와 같은 안전한 항구 유전자 유전자좌 또는 안전한 항구 부위 또는 내인성 유전자의 침묵 또는 감소된 발현을 유발하는 게놈 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 CCR5 유전자 유전자좌, PPP1R12C(AAVS1로도 알려짐) 유전자 유전자좌, CLYBL 유전자 유전자좌, 및/또는 Rosa 유전자 유전자좌(예를 들어, ROSA26 유전자 유전자좌)에 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRBC, PD1 또는 CTLA4 유전자 유전자좌로 삽입된다.

[0496] **C. 세포**

[0497] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 유전자가 감소되거나 결실되도록(예를 들어 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 유전자) 세포의 게놈이 변형되거나 유전자 또는 폴리뉴클레오티드가 과발현되거나 발현이 증가되는(예를 들어 CD47과 같은 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드) 조작(또는 변형)된 세포(예를 들어, 1차 세포), 또는 이의 집단을 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0498] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 조작되거나 변형된 세포는 1차 세포이다.

[0499] 세포는 척추동물 세포, 예를 들어, 포유류 세포, 예컨대 인간 세포 또는 마우스 세포일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 변형될 수 있다. 바람직하게는, 세포가 질환, 장애, 결함 또는 상처의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환, 장애, 결함 또는 상처를 치료하는 데 사용될 수 있도록 세포는 치료적 가치를 갖거나 갖는 것으로 여겨진다.

[0500] 일부 구현예에서, 세포는 배아 또는 신생아 조직으로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 세포는 섬유아세포, 단핵구 전구체, B 세포, 외분비 세포, 췌장 선조체, 내분비 선조체, 간모세포, 근모세포, 지방전구세포, 선조 세포,

간세포, 연골세포, 평활근 세포, K562 인간 적혈구 백혈병 세포주, 골 세포, 활막 세포, 힘줄 세포, 인대 세포, 반월 세포, 지방 세포, 수지상 세포, 또는 자연 살해 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 근육 세포, 적혈구-거핵구 세포, 호산구, iPS 세포, 대식세포, T 세포, 섬 클러스터, 섬 세포, 섬 베타-세포, 뉴런, 심근세포, 혈액 세포, 내분비 선조체, 외분비 선조체, 췌관 세포, 선포 세포, 알파 세포, 베타 섬 세포, 델타 세포, PP 세포, 간세포, 담관세포, 또는 갈색 지방세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 근육 세포(예를 들어, 골격근, 평활근, 또는 심근 세포), 적혈구-거핵구 세포, 호산구, iPS 세포, 대식세포, T 세포, 섬 섬 클러스터, 섬 세포, 베타-세포, 뉴런, 심근세포, 혈액 세포(예를 들어, 적혈구, 백혈구, 또는 혈소판), 내분비 선조체, 외분비 선조체, 췌관 세포, 선포 세포, 알파 세포, 베타 섬 세포, 델타 세포, PP 세포, 간세포, 담관세포, 또는 백색 또는 갈색 지방세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 호르몬 분비 세포(예를 들어, 인슐린, 옥시토신, 엔돌핀, 바소프레신, 세로토닌, 소마토스타틴, 가스트린, 세크레틴, 글루카곤, 갑상선 호르몬, bom베신, 콜레시스토키닌, 테스토스테론, 에스트로겐, 또는 프로게스테론, 레닌, 그렐린, 아밀린, 또는 췌장 폴리펩티드를 분비하는 세포), 표피 각질세포, 상피 세포(예를 들어, 외분비 분비 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 각질화 상피 세포, 담낭 상피 세포, 또는 각막, 혀, 구강, 식도, 항문관, 원위 요도, 또는 질의 표면 상피 세포), 신장 세포, 생식 세포, 골격 관절 윤활막 세포, 골막 세포, 골 세포(예를 들어, 파골세포 골모세포), 연골막 세포(예를 들어, 연골모세포 또는 연골세포), 연골 세포(예를 들어, 연골세포), 섬유아세포, 내피 세포, 심막 세포, 뇌막 세포, 각질세포 전구체 세포, 각질세포 줄기 세포, 혈관주위세포, 교질 세포, 뇌실막 세포, 양막 또는 태반막으로부터 단리된 세포, 또는 장막 세포(예를 들어, 체강에 막을 형성하는 장막 세포)이다.

[0501] 일부 구현예에서, 세포는 체세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 피부 또는 다른 장기, 예를 들어, 심장, 뇌 또는 척수, 간, 폐, 췌장, 방광, 골수, 비장, 장, 또는 위로부터 유래된다. 세포는 인간 또는 다른 포유동물(예를 들어, 설치류, 비인간 영장류, 소, 또는 돼지 세포)로부터 유래될 수 있다.

[0502] 일부 구현예에서, 세포는 T 세포, NK 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포 예컨대 RPE, 갑상선, 피부, 또는 간세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 1차 세포로부터 변형된 조작된 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 조작된 1차 세포(예를 들어, 조작된 1차 T 세포, NK 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포 예컨대 RPE, 갑상선, 피부, 또는 간세포)이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하며, 여기서 조작된 1차 T 세포, NK 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포 예컨대 RPE, 갑상선, 피부, 또는 간세포.

[0503] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 T 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 T 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) T 세포는 본원, 예를 들어 섹션 V에 기재된 것 중 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법으로 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) T 세포는 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0504] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 NK 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, NK는 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) NK 세포는 본원, 예를 들어 섹션 V에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법으로 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) NK 세포는 암을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0505] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 섬 세포는 본원, 예를 들어 섹션 IV에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법으로 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 섬 세포는 제I형 당뇨병과 같은 당뇨병을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 1차 베타 섬 세포를 포함하는 1차 섬 세포의 클러스터이다.

- [0506] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 베타 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 베타 섬 세포는 본원, 예를 들어 섹션 V에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법으로 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 베타 섬 세포는 제I형 당뇨병과 같은 당뇨병을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0507] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 내피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 내피 세포는 본원, 예를 들어 섹션 V에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법의 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 내피 세포는 혈관화 또는 안구 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0508] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 상피 세포는 RPE이다. 일부 구현예에서, 상피 세포는 갑상선 세포이다. 일부 구현예에서, 상피 세포는 피부 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 상피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 상피 세포는 본원, 예를 들어 섹션 V에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법으로 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 상피 세포는 갑상선 질환 또는 피부 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0509] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 1차 간세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴, 및 (iii) *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 상피 세포는 본원, 예를 들어 섹션 IV에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함하는 동종이계 세포 요법으로 다양한 적응증을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어 저면역원성) 간세포 세포는 간 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0510] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 건강한 대상체, 예컨대 치료될 특정 질환 또는 병태가 있는 것으로 알려지거나 의심되지 않는 대상체로부터의 세포이다. 예를 들면, 1차 베타 섬 세포가 예컨대 당뇨병을 치료하기 위해 공여자 대상체로부터 단리되거나 획득되는 경우, 공여자 대상체는 대상체가 당뇨병 또는 또 다른 질환 또는 병태를 앓고 있는 것으로 알려지거나 의심되지 않는 경우 건강한 대상체이다.
- [0511] 치료적 적용을 위해, 개시된 방법에 따라 제조된 세포는 전형적으로 등장성 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 형태로 공급될 수 있고, 인간 투여를 위해 충분히 멸균되는 조건 하에 제조된다. 세포는 배포 또는 임상 용도에 적합하 장치 또는 용기에서 포장될 수 있다.
- [0512] **1. 1차 세포**
- [0513] 일부 구현예에서 본원에 제공된 바와 같이 조작된 세포는 1명 이상의 개별 대상체 또는 공여자로부터 획득되거나 단리된 1차 세포로부터 유래된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 1명 이상(예를 들어 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상)의 상이한 공여자 대상체로부터 획득된 단리된 1차 세포 풀로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 복수의 상이한 공여자 대상체(예를 들어 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 40명 이상, 또는 100명 이상)로부터 단리되거나 획득된 1차 세포는 배치에서 함께 풀링되고 제공된 방법에 따라 조작된다.
- [0514] 일부 구현예에서, 1차 세포는 수용자 대상체(예를 들어, 세포가 투여된 환자)와 상이한 1명 이상의 공여자 대상체로부터의 1차 세포 풀로부터 유래된다. 1차 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100명 이상의 공여자 대상체로부터 획득되고 함께 풀링될 수 있다. 1차 세포는 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 6명 이상, 7명 이상, 8명 이상, 9명 이상, 10명, 또는 이상 20명 이상, 50명 이상 또는 100명 이상의 공여자 대상체로부터 획득되고 함께 풀링될 수 있다. 일부 구현예에서, 1차 세포는 1명 또는 복수의 개체물부터

수확되고, 일부 경우에, 1차 세포 또는 1차 T 세포 풀은 시험관 내에서 배양된다. 일부 구현예에서, 1차 세포 또는 1차 T 세포 풀은 본원에 제공된 방법에 따라 조작되거나 변형된다.

[0515] 일부 구현예에서, 방법은 개별 공여자 대상체로부터 원하는 유형의 1차 세포(예를 들어 T 세포, NK 세포, 내피 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 간세포 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 1차 세포)를 획득하거나 단리하는 단계, 세포를 풀링하여 1차 세포 유형의 배치를 획득하는 단계, 및 세포를 본원에 제공된 방법으로 조작하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 원하는 유형의 1차 세포(예를 들어 T 세포, NK 세포, 내피 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 간세포 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 1차 세포)를 획득하거나 단리하는 단계, 개별 공여자 각각의 세포를 본원에 제공된 방법으로 조작하는 단계, 및 적어도 2개의 개별 샘플의 조작된(변형된) 세포를 풀링하여 1차 세포 유형의 조작된 1차 세포의 배치를 획득하는 단계를 포함한다.

[0516] 일부 구현예에서, 1차 세포는 개체 또는 1명 초과와 개별 공여자로부터 단리되거나 획득된 1차 세포 풀로부터 단리되거나 획득된다. 1차 세포는 섹션 II.C.3에 기재된 임의의 것을 포함하는 본원에 기재된 임의의 유형의 1차 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 1차 세포는 T 세포, NK 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포 예컨대 RPE, 전립선, 피부, 또는 간세포로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 개별 공여자 또는 개별 공여자의 풀로부터의 1차 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된다.

[0517] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 근육 세포(예를 들어, 골격근, 평활근, 또는 심근 세포), 적혈구-거핵구 세포, 호산구, iPS 세포, 대식세포, T 세포, 섬 클러스터, 섬 세포, 베타-세포, 뉴런, 심근세포, 혈액 세포(예를 들어, 적혈구, 백혈구, 또는 혈소판), 내분비 선조체, 외분비 선조체, 췌관 세포, 선포 세포, 알파 세포, 베타 섬 세포, 델타 세포, PP 세포, 간세포, 담관세포, 또는 백색 또는 갈색 지방세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 호르몬 분비 세포(예를 들어, 인슐린, 옥시토신, 엔돌핀, 바소프레신, 세로토닌, 소마토스타틴, 가스트린, 세크레틴, 글루카곤, 갑상선 호르몬, 붐베신, 콜레시스토키닌, 테스토스테론, 에스트로겐, 또는 프로게스테론, 레닌, 그렐린, 아밀린, 또는 췌장 폴리펩티드를 분비하는 세포), 표피 각질세포, 상피 세포(예를 들어, 외분비 분비 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 각질화 상피 세포, 담낭 상피 세포, 또는 각막, 혀, 구강, 식도, 항문관, 원위 요도, 또는 질의 표면 상피 세포), 신장 세포, 생식 세포, 골격 관절 활액막 세포, 골막 세포, 골 세포(예를 들어, 파골세포 또는 골모세포), 연골막 세포(예를 들어, 연골모세포 또는 연골세포), 연골 세포(예를 들어, 연골세포), 섬유아세포, 내피 세포, 심막 세포, 뇌막 세포, 각질세포 전구체 세포, 각질세포 줄기 세포, 혈관주위세포, 교질 세포, 뇌실막 세포, 양막 또는 태반막으로부터 단리된 세포, 또는 장막 세포(예를 들어, 체강에 막을 형성하는 장막 세포)이다.

[0518] 예시적인 세포는 다음 하위섹션에 기재되어 있다.

[0519] a. T 세포

[0520] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 T 림프구(T 세포라고도 불림)이다. 일부 구현예에서, 1차 T 림프구는 1명 이상의 개별 공여자 대상체, 예컨대 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어 질환 또는 감염이 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어, 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)로부터 단리되거나 획득된다. 일부 경우에, T 세포는 1명 이상의 개체로부터의 1차 T 세포의 집단 또는 하위집단이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 T 림프구를 단리하거나 획득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 T 림프구가 본원에 제공된다. 예를 들면, 조작된 T 세포는 조작된 T 세포를 대상체에게 주입함으로써 대상체(예를 들어 수용자, 예컨대 환자)에게 투여된다.

[0521] 일부 구현예에서, 1차 T 세포는 대상체 또는 개체로부터 획득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 T 세포는 T 세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함한 1명 이상의 인간)로부터 유래되도록 T 세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 T 세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 치료 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, T 세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, T 세포의 풀이 획득된 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.

[0522] 1차 T 세포의 비제한적인 예는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 미처리 T 세포, 조절 T(Treg) 세포, 비조절 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, T-세포성 헬퍼(Tfh) 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 효과기 T(Teff) 세포, 중추 기억 T(Tcm) 세포, 효과기 기억 T(Tem) 세포, 효과기 기억 T 세포 발현

CD45RA(TEMRA 세포), 조직 상주 기억(Trm) 세포, 가상 기억 T 세포, 선천성 기억 T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, 및 T 세포의 임의의 다른 하위유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 1차 T 세포는 세포독성 T-세포, 헬퍼 T-세포, 기억 T-세포, 조절 T-세포, 중앙 침윤 림프구, 및 이의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0523] 본 개시내용의 예시적인 T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 기억 T 세포, 중추 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, 효과기 기억 RA T 세포, 조절 T 세포, 조직 침윤 림프구, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 많은 구현예에서, T 세포는 CCR7, CD27, CD28, 및 CD45RA를 발현한다. 일부 구현예에서, 중추 T 세포는 CCR7, CD27, CD28, 및 CD45RO를 발현한다. 다른 구현예에서, 효과기 기억 T 세포는 PD-1, CD27, CD28, 및 CD45RO를 발현한다. 다른 구현예에서, 효과기 기억 RA T 세포는 PD-1, CD57, 및 CD45RA를 발현한다.

[0524] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같이 조작하기 전에, 단리된 1차 T 세포 또는 분화된 T 세포와 같은 T 세포는 하나 이상의 확장 또는 활성화 단계를 거칠 수 있다. 일부 구현예에서, 조작될 T 세포 집단은 항-CD3 및 항-CD28 항체 시약과의 인큐베이션에 의해 자극되거나 활성화된다. 항-CD3 및 항-CD28은 이들 시약의 혼합물로 코팅된 비드 형태로 적절하게 제공될 수 있다. 항-CD3 및 항-CD28 비드는 조작될 T 세포 집단에 대해 1:1의 비율로 적절하게 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 인큐베이션 동안 배지는 또한 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예컨대 재조합 IL-2 또는 재조합 IL-15를 함유할 수 있다.

[0525] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 T 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 T 세포는 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된(예를 들어, 변형된) T 세포를 포함한다. 본원에 기재된 CAR을 포함하는 임의의 적합한 CAR은 T 세포에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 손상된 세포, 이형성 세포, 감염된 세포, 면역원성 세포, 염증성 세포, 악성 세포, 화생성 세포, 돌연변이체 세포, 및 이의 조합 중 적어도 하나의 표면 상에서 발현되는 관심 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 키메라 항원 수용체를 발현한다. 다른 경우에, 조작된 T 세포는 세포가 인접한 세포, 조직, 또는 장기에 근접할 때 세포가 인접한 세포, 조직, 또는 장기에서 관심 생물학적 효과를 조절하는 적어도 하나의 단백질을 발현하도록 하는 변형을 포함한다. 1차 T 세포를 포함하여 T 세포에 대한 유용한 변형은 US2016/0348073 및 W02020/018620에 상세하게 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 포함된다.

[0526] 일부 구현예에서, T 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오티드는 게놈 유전자좌로 삽입된다. 렌티바이러스 기반 형질도입 방법 또는 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 임의의 적합한 방법은 T 세포의 게놈 유전자좌에 CAR을 삽입하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3(CD142로도 알려짐), MICA, MICB, LRP1(CD91로도 알려짐), HMGB1, ABO, RHD, FUT1, 또는 KDM5D 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRBC, PD1 또는 CTLA4 유전자좌에 삽입된다.

[0527] 일부 구현예에서, 조작되거나 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 내인성 T 세포 수용체의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 또는 TRBC 유전자좌는 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴되거나 제거된다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 폴리뉴클레오티드와 같은 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자는 파괴된 TRAC 또는 TRBC 유전자좌로 삽입된다.

[0528] 일부 구현예에서, 조작되거나 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 세포독성 T-림프구 연관 단백질 4(CTLA4)의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CTLA-4 유전자좌는 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴되거나 제거된다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 외인성 폴리뉴클레오티드와 같은 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자는 파괴된 CTLA-4 유전자좌로 삽입된다.

[0529] 다른 구현예에서, 조작되거나 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 프로그램화 세포 사망(PD1)의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, PD1 유전자좌는 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴되거나 제거된다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 외인성 폴리뉴클레오티드와 같은 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자는 파괴된 PD1 유전자좌로 삽입된다. 특정 구현예에서, 조작되거나 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 CTLA4 및 PD1의 감소된 발현을 포함한다.

- [0530] 특정 구현예에서, 조작되거나 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 PD-L1의 향상된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, PD-L1 유전자좌는 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴되거나 제거된다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 외인성 폴리뉴클레오티드와 같은 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자는 파괴된 PD-L1 유전자좌로 삽입된다.
- [0531] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 T 세포와 같은 조작된 T 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 T 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 또한 CAR을 발현하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 예컨대 TRAC 유전자 또는 TRBC 유전자에서 게놈 변형(예를 들어 유전자 파괴)에 의해 TCR 복합체 분자의 발현이 감소되거나 결여된다. 일부 구현예에서, T 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47) 및 CAR을 과발현하고 다음 유전자: B2M, CIITA, TRAC 및 TRBC 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 게놈 변형을 보유한다.
- [0532] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 T 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 T 세포와 같은 조작된 본원에 기재된 T 세포는 환자(예를 들어, 투여시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 조작된 본원에 기재된 T 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0533] 본원에 제공된 T 세포는 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암을 포함하나 이에 제한되지 않는 적합한 암의 치료에 유용하다.
- [0534] *b. 자연 살해 세포*
- [0535] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 1차 NK 세포는 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어 질환 또는 감염이 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)와 같은 1명 이상의 개별 공여자 대상체로부터 단리되거나 수득된다. 일부 경우에, NK 세포는 1명 이상의 개체로부터의 1차 NK 세포의 집단 또는 하위집단이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 NK 세포를 단리하거나 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어 수용자로서의 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 NK 세포가 본원에 제공된다. 예를 들면, 조작된 T 세포는 조작된 NK 세포를 대상체에게 주입함으로써 대상체(예를 들어 수용자, 예컨대 환자)에게 투여된다.
- [0536] 일부 구현예에서, 1차 NK 세포는 대상체 또는 개체로부터 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 NK 세포는 NK 세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함한 1명 이상의 인간)로부터 유래되도록 NK 세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 NK 세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체이다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 조작된 NK 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, NK 세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, NK 세포의 풀이 수득된 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.
- [0537] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 NK 세포를 포함한 NK 세포는 CD56(예를 들어 CD56^{dim} 또는 CD56^{bright})을 발현하고 CD3(예를 들어 CD3^{neg})이 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 NK 세포는 또한 ADCC를 매개하는 저친화도 Fc γ 수용체 CD16을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 또한 하나 이상의 자연 살해 세포 수용체 NKG2A 및 NKG2D 또는 하나 이상의 천연 세포독성 수용체 NKp46, NKp44, NKp30을 발현한다. 예를 들어, 1차 NK 세포의 경우, 특이적 경우에, 1차 세포는 CD3, CD14, 및/또는 CD19에 대해 양성인 세포의 고갈에 의해 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 함유하는 샘플과 같은 NK 세포의 출발 공급원으로부터 단리될 수 있다. 예를 들면, 세포는 각각 CD3, CD14, 및/또는 CD 19)에 대한 항체에 부착되어 있는 면역원성 비드를 사용하여 고갈시켜, NK 세포의 풍부화된 집단을 생성할 수 있다. 다른

경우에, 1차 NK 세포는 CD56, CD16, NKp46, 및/또는 NKG2D와 같은 NK 세포 상의 하나 이상의 마커의 존재에 대해 세포를 선택함으로써 혼합 집단(예를 들어 PBMC)인 출발 공급원으로부터 분리될 수 있다.

[0538] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작 전에, 분리된 1차 NK 세포와 같은 NK 세포는 하나 이상의 확장 또는 활성화 단계를 거칠 수 있다. 일부 구현예에서, 확장은 NK 세포를 배양보조 세포, 예컨대 조사될 수 있거나 조사되지 않을 수 있는 항원 제시 세포와 함께 배양함으로써 달성될 수 있다. 확장 단계에서 NK 세포 대 항원 제시 세포(APC)의 비율은 예를 들어 1:1, 1:1.5, 1:2, 또는 1:3과 같은 특정 수일 수 있다. 특정 측면에서, APC는 막 결합된 IL-21(mbIL- 21)을 발현하도록 조작된다. 특정 측면에서, APC는 대안적으로 또는 추가적으로 IL-21, IL-15, 및/또는 IL-2를 발현하도록 조작된다. 특정 구현예에서, 확장 단계(들)가 발생하는 배지는 하나 이상의 재조합 사이토카인과 같은 확장을 용이하게 하는 하나 이상의 체제를 포함한다. 구체적 구현예에서, 배지는 IL-2, IL-15, IL-18, 및/또는 IL-21로부터의 하나 이상의 재조합 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형을 도입함으로써 NK 세포를 조작하는 단계는 확장 개시 후 2-12일, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일차 또는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일차에 수행된다.

[0539] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 분리된 1차 NK 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 NK 세포는 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하나 이에 제한되지 않는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된(예를 들어, 변형된) NK 세포를 포함한다. 본원에 기재된 CAR을 포함하는 임의의 적합한 CAR은 NK 세포에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 NK 세포는 손상된 세포, 이형성 세포, 감염된 세포, 면역원성 세포, 염증성 세포, 악성 세포, 화생성 세포, 돌연변이체 세포, 및 이의 조합의 표면 상에서 발현되는 관심 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 키메라 항원 수용체를 발현한다. 다른 경우에, 조작된 NK 세포는 세포가 인접한 세포, 조직, 또는 장기에 근접할 때 세포가 인접한 세포, 조직, 또는 장기에서 관심 생물학적 효과를 조절하는 적어도 하나의 단백질을 발현하도록 하는 변형을 포함한다.

[0540] 일부 구현예에서, NK 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오티드는 게놈 유전자좌로 삽입된다. 렌티바이러스 기반 형질도입 방법 또는 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 임의의 적합한 방법은 CAR을 NK 세포의 게놈 유전자좌로 삽입하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3(CD142로도 알려짐), MICA, MICB, LRP1(CD91로도 알려짐), HMGB1, ABO, RHD, FUT1, 또는 KDM5D 유전자 유전자좌와 같으나 이에 제한되지 않는 안전한 항구 유전자좌로 삽입된다.

[0541] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 분리된 1차 NK 세포와 같은 조작된 NK 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 NK 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 NK 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 NK 세포는 또한 CAR을 발현하도록 조작된다.

[0542] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 NK 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 분리된 1차 NK 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 NK 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 NK 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[0543] 본원에 제공된 NK 세포는 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암을 포함하나 이에 제한되지 않는 적합한 암의 치료에 유용하다.

[0544] *c. 베타 섬 세포*

[0545] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 1차 섬 세포는 1차 섬 세포의 클러스터이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 베타 섬 세포(췌장 섬 세포 또는 췌장 베타 섬 세포로도 알려짐)이다. 일부 구현예에서, 1차 베타 섬 세포는 1명 이상의 개별 공여자 대상체, 예컨대 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어 질환 또는 감염이 알려져

있거나 의심되지 않는, 예를 들어, 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)로부터 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 베타 섬 세포를 단리하거나 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착하기 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 베타 섬 세포가 본원에 제공된다.

[0546] 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 대상체 또는 개체로부터 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 베타 섬 세포는 베타 섬 세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함하는 1명 이상의 인간)로부터 유래하도록 하는 베타 섬 세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 베타 섬 세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 치료 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포의 풀이 수득된 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.

[0547] 본 기술에서 사용하기 위한 것을 포함하는 췌장 섬 세포의 추가적인 설명은 W02020/018615에서 발견되며, 개시 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0548] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 베타 섬 세포 또는 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 내피 세포와 같은 조작된 베타 섬 세포 집단은 투여 전에 배양물에서 유지되며, 일부 경우에 확장된다. 특정 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[0549] 예시적인 췌장 섬 세포 유형은 췌장 섬 선조 세포, 미성숙 췌장 섬 세포, 성숙 췌장 섬 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 췌장 세포는 당뇨병을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0550] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 베타 섬 세포와 같은 본원에 개시된 바와 같이 조작된 췌장 섬 세포는 인슐린을 분비한다. 일부 구현예에서, 췌장 섬 세포는 포도당에 반응하여 인슐린의 분비, 및 베타 섬 세포 마커의 발현과 같으나 이에 제한되지 않는 내인성 췌장 섬 세포의 적어도 2개의 특성을 나타낸다.

[0551] 예시적인 베타 섬 세포 마커 또는 베타 섬 세포 선조체 마커는 c-펩티드, Pdx1, 포도당 수송체 2(Glut2), HNF6, VEGF, 글루코키나제(GCK), 프로호르몬 전환효소(PC 1/3), Cdcpl, NeuroD, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.1, Nkx6.2, Pax4, Pax6, Ptf1a, Isl1, Sox9, Sox17, 및 FoxA2를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0552] 일부 구현예에서, 1차 췌장 베타 섬 세포는 1차 췌장 섬으로부터 단리되거나, 1차 췌장 섬 내의 1차 췌장 베타 섬 세포로부터 유래되거나, 1차 췌장 섬의 구성요소로서 단리될 수 있다. 예를 들어, 1차 췌장 베타 섬 세포는 단일 베타 섬 세포, 베타 섬 세포 집단, 또는 1차 췌장 섬의 구성요소(예를 들어, 다른 세포 유형과 함께 1차 췌장 섬 내에 존재하는 1차 췌장 베타 섬 세포)로서 편집될 수 있다. 또 다른 예로서, 1차 췌장 베타 섬 세포는 단일 베타 섬 세포, 베타 섬 세포 집단, 또는 1차 췌장 섬의 구성요소(예를 들어, 1 다른 세포 유형과 함께 1차 췌장 섬 내에 존재하는 1차 췌장 섬)로서 환자에게 투여될 수 있다. 췌장 베타 섬 세포가 다른 세포 유형과 함께 췌장 섬 내에 존재하는 구현예에서, 다른 세포 유형은 또한 본원에 기재된 방법에 의해 편집될 수 있다.

[0553] 일부 구현예에서, 1차 췌장 섬 세포는 유전자 조작과 같은 조작 전에 또는 후에 1차 섬으로부터 해리된다. 이러한 해리된 섬 세포는 환자에게 투여 전에 클러스터링될 수 있고 클러스터는 베타 섬 세포 뿐만 아니라 1차 섬으로부터의 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 세포 유형을 포함할 수 있다. 클러스터 내 섬 세포의 수는 약 50개, 약 100개, 약 250개, 약 500개, 약 750개, 약 1000개, 약 1250개, 약 1500개, 약 1750개, 약 2000개, 약 2250개, 약 2500개, 약 2750개, 약 3000개, 약 3500개, 약 4000개, 약 4500개, 또는 약 5000개의 세포와 같이 달라질 수 있다. 환자에게 약 10개, 약 20개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 75개, 약 100개, 약 125개, 약 150개, 약 200개, 약 250개, 약 300개, 약 325개, 약 350개, 약 375개, 약 400개, 약 425개, 약 450개, 약 475개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 또는 약 1000개의 클러스터가 투여될 수 있다.

[0554] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 췌장 섬 세포는 포도당의 증가에 반응하여 인슐린을 생성한다. 일부 구현예에서, 췌장 섬 세포는 베타 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 포도당 제어 능력을 평가하기 위해 모니터링된다. 포도당 제어를 모니터링하기 위한 검정은 지속적인 혈당 수준 모니터링, 공복 기간 후 혈당 수준 모니터링, 내당능(예를 들어, 포도당 유발(glucose

challenge) 검사, 포도당 활용 및 산화, 예컨대 U-PLEX® Meso Scale Discovery(MSD) 검정 및/또는 포도당 자극 인슐린 분비(GSIS) 검정에 의한 인슐린 분비, 특이적 전사 인자 및 경로(예를 들어, 호메오박스 전사 인자 SIX2, NKX6-1, 및 PDX1)의 존재 측정, 미토콘드리아 호흡 측정, 및 포도당 유도성 Ca^{2+} 상승, Ca^{2+} -활성화 세포 외유출과 같은 세포내 Ca^{2+} 칼슘 플럭스의 변화 측정을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 포도당 제어를 측정하는 다양한 방법은 Velazco-Cruz 등, Cell Reports, 2020, 31, 107687; Pagliuca 등, Cell, 2014, 159(2): 428-439; Davis 등, Cell Reports, 2020, 31(6): 107623; 및, Alcazar 등, Cell Transplantation, 2020, 29에 기재된 것들과 같이 당업계에 알려져 있으며, 도면, 도면 범례, 및 방법 설명을 포함한 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포(예를 들어, 조작된 베타 섬 세포)는 GSIS를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, GSIS는 관류 GSIS 검정으로 측정된다. 일부 구현예에서, GSIS는 제1 및 제2 단계 동적 인슐린 분비를 포함하는 동적 GSIS이다. 일부 구현예에서, GSIS는 정적 GSIS이다. 예를 들어, 정적 인큐베이션 지수는 1 초과 또는 약 1 초과, 2 초과 또는 약 2 초과, 5 초과 또는 약 5 초과, 10 초과 또는 약 10 초과 또는 20 초과 또는 약 20 초과일 수 있다. 다양한 구현예에서, 췌장 섬 세포는 포도당 증가에 반응하여 인슐린을 분비한다. 일부 구현예에서, 세포는 조각돌 세포 형태와 같은 뚜렷한 형태 및/또는 약 17 μ m 내지 약 25 μ m의 직경을 갖는다.

[0555] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 베타 섬 세포와 같은 조작된 베타 섬 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 게놈 변형을 보유한다.

[0556] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 베타 섬 세포는 면역 인식을 회피한다. 예를 들어, 조작된 베타 섬 세포는 NK 세포 매개 세포 사멸, 대식세포 매개 세포 사멸, 및/또는 PMBC 매개 세포 사멸을 회피할 수 있다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 베타 섬 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 베타 섬 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 예를 들어, 이식 후, 조작된 베타 섬 세포를 받은 대상체는 야생형 베타 섬 세포를 받은 대상체와 비교하여 더 낮은 수준의 인터페론 감마(IFN γ)를 나타낼 수 있다. 유사하게는, 이식 후, 조작된 베타 섬 세포를 받은 대상체는 야생형 베타 섬 세포를 받은 대상체와 비교하여 더 낮은 수준의 공여자-특이적 항체(DSA) 결합(예를 들어, IgG 또는 IgM)을 나타낼 수 있다. 본원에 기재된 조작된 베타 섬 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 질환은 제I형 당뇨병 또는 제II형 당뇨병과 같은 당뇨병이다.

[0557] *d. 내피 세포*

[0558] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 1차 내피 세포는 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어, 질환 또는 감염이 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어, 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)와 같은 1명 이상의 개별 공여자 대상체로부터 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 내피 세포를 단리하거나 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 내피 세포 유형이 본원에 제공된다.

[0559] 일부 구현예에서, 1차 내피 세포는 대상체 또는 개체로부터 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 내피 세포는 내피 세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함하는 1명 이상의 인간)로부터 유래되도록 하는 내피 세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 내피 세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체이다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 치료 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 내피 세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 내피 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.

[0560] 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위한 내피 세포의 추가적인 설명은 W02020/018615에서 발견되며, 개시내용은

그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0561] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 내피 세포와 같은 조작된 내피 세포 집단은 투여 전에 배양물에서 유지되며, 일부 경우에 확장된다. 특정 구현예에서, 내피 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.
- [0562] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 내피 세포와 같은 조작된 내피 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 내피 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 게놈 변형을 보유한다.
- [0563] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 내피 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자로부터 단리된 1차 내피 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 내피 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 내피 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0564] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 내피 세포와 같은 조작된 내피 세포는 환자, 예를 들어, 이를 필요로 하는 인간 환자에게 투여된다. 조작된 내피 세포는 심혈관 질환, 혈관 질환, 말초 혈관 질환, 허혈성 질환, 심근 경색, 울혈성 심부전, 말초 혈관 폐쇄성 질환, 뇌졸중, 재관류 손상, 사지 허혈, 신경병증(예를 들어, 말초 신경병증 또는 당뇨병 신경병증), 장기 부전(예를 들어, 간부전, 신부전 등), 당뇨병, 류마티스 관절염, 골다공증, 혈관 손상, 조직 손상, 고혈압, 관상 동맥 질환으로 인한 협심증 및 심근 경색, 신장 혈관 고혈압, 신장 동맥 협착증으로 인한 신부전, 하지의 과행(claudication of the lower extremities) 등과 같으나 이에 제한되지 않는 질환 또는 병태를 앓고 있는 환자에게 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 환자는 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack) 또는 뇌졸중을 앓았거나 앓고 있는 중이며, 일부 경우에, 뇌혈관 질환 때문일 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포는 예를 들어, 아테롬성동맥 경화증, 심근 경색, 및 사지 허혈에서 발생하는 것과 같은 조직 허혈을 치료하고 손상된 혈관을 복구하기 위해 투여된다. 일부 경우에, 세포는 이식편의 생체공학에 사용된다.
- [0565] 예를 들면, 조작된 내피 세포는 허혈성 조직 복구, 혈관 및 심장 판막 형성, 인공 혈관 조직, 손상된 혈관 복구, 및 조작된 조직에서 혈관 형성 유도(예를 들어, 이식 전)를 위한 세포 요법에서 사용될 수 있다. 추가적으로, 내피 세포는 종양을 표적하고 치료하기 위한 제제를 전달하도록 추가로 변형될 수 있다.
- [0566] 많은 구현예에서, 혈관 세포 또는 혈관화가 필요한 조직에 대한 복구 또는 대체 방법이 본원에 제공된다. 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 인간에게 조작된 내피 세포, 예컨대 단리된 1차 내피 세포 또는 분화된 내피 세포를 함유하는 조성물을 투여하여 이러한 조직에서 혈관화를 촉진하는 것을 수반한다. 혈관 세포 또는 혈관화가 필요한 조직은 그 중에서도 심장 조직, 간 조직, 췌장 조직, 신장 조직, 근육 조직, 신경 조직, 뼈 조직일 수 있으며, 이는 손상되고 과도한 세포 사멸을 특징으로 하는 조직, 손상 위험이 있는 조직, 또는 인공으로 조작된 조직일 수 있다.
- [0567] 일부 구현예에서, 심장 질환 또는 장애와 연관될 수 있는 혈관 질환은 본원에 기재된 바와 같이 유래된 최종적인 혈관 내피 세포 및 심장내 내피 세포와 같으나 이에 제한되지 않는 내피 세포를 투여함으로써 치료될 수 있다. 이러한 혈관 질환은 관상 동맥 질환, 뇌혈관 질환, 대동맥 협착증(aortic stenosis), 대동맥 자루(aortic aneurysm), 말초 동맥 질환, 아테롬성동맥경화증, 정맥류성 정맥(varicose veins), 혈관병(angiopathy), 관상 동맥 관류가 결여된 심장의 경색 부위, 치유되지 않은 상처, 당뇨병성 또는 비당뇨병성 궤양, 또는 혈관 형성을 유도하는 것이 바람직한 임의의 다른 질환 또는 장애를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0568] 특정 구현예에서, 내피 세포는 혈관 재건 수술에서 사용되는 보철용 이식물(예를 들어, Dacron 및 Gortex와 같은 합성 물질로 만들어진 혈관)을 개선하는 데 사용된다. 예를 들어, 보철용 동맥 이식편은 종종 중요 기관 또는 사지에 관류하는 병든 동맥을 대체하는 데 사용된다. 다른 구현예에서, 조작된 내피 세포는 판막 표면에서 혈전형성을 줄임으로써 색전 형성 위험을 감소시키도록 인공 심장 판막의 표면을 덮는 데 사용된다.
- [0569] 요약된 내피 세포는 조직 및/또는 단리된 세포를 혈관에 이식하기 위한 잘 알려진 수술 기술을 사용하여 환자에

게 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 주사(예를 들어, 심근내 주사, 관상동맥내 주사, 경심내막 주사, 경외심막 주사, 경피 주사), 주입, 생착, 및 이식에 의해 환자의 심장 조직에 도입된다.

- [0570] 내피 세포의 투여(전달)는 피하 또는 정맥내, 동맥내(예를 들어, 관상동맥내), 근육내, 복강내, 심근내, 경심내막, 경외심막, 비강내 투여 뿐만 아니라 척수강내, 및 주입 기술을 포함한 비경구 투여를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0571] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 세포는 세포 유형 및 이들 세포의 궁극적인 사용 둘 다에 의존하는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 이식된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 정맥내로 또는 환자의 특정 위치에 주사에 의해 이식된다. 특정 위치에 이식되는 경우, 세포는 유지되는 동안 분산을 방지하기 위해 겔 매트릭스에 현탁될 수 있다.
- [0572] 예시적인 내피 세포 유형은 모세관 내피 세포, 혈관 내피 세포, 대동맥 내피 세포, 동맥 내피 세포, 정맥 내피 세포, 신장 내피 세포, 대뇌 내피 세포, 간 내피 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0573] 단리된 1차 내피 세포와 같은 본원에 요약된 내피 세포는 하나 이상의 내피 세포 마커를 발현할 수 있다. 이러한 마커의 비제한적인 예는 VE-카드헤린(CD 144), ACE(안지오텐신 전환 효소)(CD 143), BNH9/BNF13, CD31, CD34, CD54(ICAM-1), CD62E(E-셀렉틴), CD105(엔도글린(Endoglin)), CD146, 엔도칸(Endocan)(ESM-1), 엔도글릭스(Endoglyx)-1, 엔도뮤신(Endomucin), 예오타신(Eotaxin)-3, EPAS1(내피 PAS 도메인 단백질 1), 인자 VIII 관련 항원, FLI-1, Flk-1(KDR, VEGFR-2), FLT-1(VEGFR-1), GATA2, GBP-1(구아닐레이트 결합 단백질-1), GRO-알파, HEX, ICAM-2(세포간 부착 분자 2), LMO2, LYVE-1, MRB(매직 로터리), 뉴클레올린(Nucleolin), PAL-E(병태학적 해부 라이덴 내피, RTK, sVCAM-1, TALI, TEM1(중양 내피 마커 1), TEM5(중양 내피 마커 5), TEM7(중양 내피 마커 7), 트롬보모듈린(TM, CD141), VCAM-1(혈관 세포 부착 분자- 1)(CD106), VEGF, vWF(폰 빌레브란트 인자), ZO-1, 내피 세포-선택적 부착 분자(ESAM), CD102, CD93, CD184, CD304, 및 DLL4를 포함한다.
- [0574] 일부 구현예에서, 내피 세포는 장애/병태를 치료하거나 장애/병태의 증상을 개선하는 데 유용한 효소, 호르몬, 수용체, 리간드, 또는 약물과 같으나 이에 제한되지 않는 관심 단백질을 암호화하는 외인성 유전자를 발현하도록 추가로 유전자 변형된다. 내피 세포를 유전적으로 변형시키기 위한 표준 방법은 예를 들어, US5,674,722에 기재되어 있다.
- [0575] 이러한 내피 세포는 질환의 예방 또는 치료에 유용한 폴리펩티드 또는 단백질의 구성적 합성 및 전달을 제공하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 폴리펩티드는 개체의 혈류 또는 다른 신체 부위(예를 들어, 중추신경계)에 직접 분비된다. 일부 구현예에서, 내피 세포는 인슐린, 혈액 응고 인자(예를 들어, 인자 VIII 또는 폰 빌레브란트 인자), 알파-1 항트립신, 아데노신 데아미나제, 조직 플라스미노겐 활성화인자, 인터류킨(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3) 등을 분비하도록 변형될 수 있다.
- [0576] 특정 구현예에서, 내피 세포는 이식된 이식편의 맥락에서 그들의 성능을 개선시키는 방식으로 변형될 수 있다. 비제한적인 예시적인 예는 내강 혈전 형성을 방지하기 위한 혈전용해제의 분비 또는 발현, 평활근 비대로 인한 관강 협착을 방지하기 위한 평활근 증식 억제제의 분비, 및 발현 및/또는 내피 세포 증식을 자극하고 이식편 내강의 내피 세포 내벽의 정도 또는 지속기간을 개선하는 내피 세포 미토겐 또는 자가분비 인자의 분비를 포함한다.
- [0577] 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포는 치료 수준의 분비된 생성물을 특이적 기관 또는 사지에 전달하기 위해 활용된다. 예를 들어, 시험관 내에서 조작된(형질도입된) 내피 세포가 줄지어 있는 혈관 이식물은 특이적 기관 또는 사지에 생착될 수 있다. 형질도입된 내피 세포의 분비된 생성물은 관류된 조직에 고농도로 전달되어, 표적화된 해부학적 위치에 원하는 효과를 달성할 것이다.
- [0578] 다른 구현예에서, 내피 세포는 혈관화 종양에서 내피 세포에 의해 발현될 때 혈관형성을 방해하거나 억제하는 유전자를 함유하도록 추가로 유전자 변형된다. 일부 경우에, 내피 세포는 또한 종양 치료 완료 시 생착된 내피 세포의 음성 선택을 허용하는 본원에 기재된 선택가능한 자살 유전자 중 임의의 하나를 발현하도록 유전자 변형될 수 있다.
- [0579] 일부 구현예에서, 단리된 1차 내피 세포와 같은 본원에 기재된 내피 세포는 혈관 손상, 심혈관 질환, 혈관 질환, 말초 혈관 질환, 허혈성 질환, 심근 경색, 울혈성 심부전, 말초 혈관 폐쇄성 질환, 고혈압, 허혈성 조직 손상, 재관류 손상, 사지 허혈, 뇌졸중, 신경병증(예를 들어, 말초 신경병증 또는 당뇨병 신경병증), 장기 부전(예를 들어, 간부전, 신부전 등), 당뇨병, 류마티스 관절염, 골다공증, 뇌혈관 질환, 고혈압, 관상 동맥 질환으로 인한 협심증 및 심근 경색, 신장 혈관 고혈압, 신장 동맥 협착증으로 인한 신부전, 하지의 파행, 다른 혈관

병태 또는 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈관 장애를 치료하기 위해 수용자 대상체에게 투여된다.

- [0580] e. 상피 세포
- [0581] 1) 망막 색소 상피(RPE) 세포
- [0582] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 망막 색소 상피(RPE) 세포이다. 일부 구현예에서, 1차 RPE 세포는 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어 질환 또는 감염이 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어, 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)와 같은 1명 이상의 개별 공여자 대상체로부터 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 RPE 세포를 단리하거나 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 RPE 세포가 본원에 제공된다.
- [0583] 일부 구현예에서, 1차 RPE 세포는 대상체 또는 개체로부터 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 RPE 세포는 RPE 세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함하는 1명 이상의 인간)로부터 유래되도록 RPE 세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 RPE 세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 치료 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, RPE 세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, RPE 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.
- [0584] 본 기술에서 사용하기 위한 방법을 포함하여 RPE 세포의 추가적인 설명은 W02020/018615에서 발견되며, 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0585] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 RPE 세포와 같은 조작된 RPE 세포 집단은 투여 전에 배양물에서 유지되며, 일부 경우에 확장된다. 특정 구현예에서, RPE 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.
- [0586] 예시적인 RPE 세포 유형은 망막 색소 상피(RPE) 세포, RPE 선조 세포, 미성숙 RPE 세포, 성숙 RPE 세포, 기능적 RPE 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0587] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 RPE 세포와 같은 RPE 세포는 천연 RPE 세포와 유사하거나 실질적으로 유사한 유전적 발현 프로필을 갖는다. 이러한 RPE 세포는 평면 기질 상에 함유하도록 성장할 때 천연 RPE 세포의 다각형 평면 시트 형태를 가질 수 있다.
- [0588] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 RPE 세포와 같은 조작된 RPE 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 RPE 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 RPE 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 RPE 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 게놈 변형을 보유한다.
- [0589] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 RPE 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 RPE 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 RPE 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 RPE 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0590] RPE 세포는 황반 변성(macular degeneration)을 앓고 있는 환자 또는 RPE 세포가 손상된 환자에게 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 연령 관련 황반 변성(AMD), 초기 AMD, 중기 AMD, 후기 AMD, 비신생혈관 연령 관련 황반 변성, 건성 황반 변성(건성 연령 관련 황반 변성), 습성 황반 변성(습성 연령 관련 황반 변성), 연소기 황반 변성(JMD)(예를 들어, 스타가르트병(Stargardt disease), 베스트병(Best disease), 및 연소기 망막층간분리증(juvenile retinoschisis)), 레베르 선천성 흑암시(Leber's Congenital Ameurosis), 또는 망막색소변성증(retinitis pigmentosa)을 갖는다. 다른 구현예에서, 환자는 망막 박리(retinal detachment)를 앓고 있다.

[0591] 2) 갑상선 세포

[0592] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 갑상선 세포이다. 일부 구현예에서, 1차 갑상선 세포는 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어 질환 또는 감염이 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)와 같은 1명 이상의 개별 공여자 대상체로부터 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 갑상선 세포를 단리하거나 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착하기 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 갑상선 세포가 본원에 제공된다.

[0593] 일부 구현예에서, 1차 갑상선 세포는 대상체 또는 개체로부터 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 갑상선 세포는 갑상선 세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함하는 1명 이상의 인간)로부터 유래하도록 갑상선 세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 갑상선 세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 치료 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 갑상선 세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 갑상선 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.

[0594] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 갑상선 세포와 같은 조작된 갑상선 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 갑상선 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 갑상선 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 갑상선 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 게놈 변형을 보유한다.

[0595] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 갑상선 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 갑상선 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 갑상선 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 내피 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[0596] f. 간세포

[0597] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 1차 간세포이다. 일부 구현예에서, 1차 간세포는 1명 이상의 개별 건강한 공여자(예를 들어 질환 또는 감염이 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이의 임상 징후를 나타내지 않는 대상체)와 같은 1명 이상의 개별 공여자 대상체로부터 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개체로부터 간세포를 단리하거나 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상체(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하는 조작된 1차 간세포가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포는 간세포 기능 상실 또는 간경변을 해결하기 위한 세포 요법으로서 투여될 수 있다.

[0598] 일부 구현예에서, 1차 간세포는 대상체 또는 개체로부터 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거, 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 1차 간세포는 간세포가 1명 이상의 대상체(예를 들어, 1명 이상의 건강한 인간을 포함하는 1명 이상의 인간)로부터 유래하도록 간세포의 풀로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 1차 간세포의 풀은 1-100명, 1-50명, 1-20명, 1-10명, 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 30명 이상, 40명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 대상체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 환자(예를 들어, 치료 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 간세포의 풀은 환자로부터의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 간세포의 풀이 수득되는 공여자 대상체 중 1명 이상은 환자와 상이하다.

[0599] 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 간세포와 같은 조작된 간세포의 집단은 투여 전에 배양물에서 유지되며, 일부 경우에 확장된다. 특정 구현예에서, 간세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[0600] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이

상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 간세포와 같은 조작된 간세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 간세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 간세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 간세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 과표현하는 게놈 변형을 보유한다.

[0601] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 간세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 1명 이상의 개별 공여자(예를 들어 건강한 공여자)로부터 단리된 1차 간세포와 같은 본원에 기재된 조작된 간세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 간세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[0602] g. 심장 세포

[0603] 대상체(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착하기 위한 심장 세포 유형이 본원에 제공된다.

[0604] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 심장 세포는 소아 심근병증(pediatric cardiomyopathy), 연령 관련 심근병증(age-related cardiomyopathy), 확장성 심근병증(dilated cardiomyopathy), 비후성 심근병증(hypertrophic cardiomyopathy), 제한성 심근병증(restrictive cardiomyopathy), 만성 허혈성 심근병증(chronic ischemic cardiomyopathy), 분만전후 심근병증(peripartum cardiomyopathy), 염증성 심근병증(inflammatory cardiomyopathy), 특발성 심근병증(idiopathic cardiomyopathy), 다른 심근병증, 심근 허혈성 재관류 손상(myocardial ischemic reperfusion injury), 심실 기능장애(ventricular dysfunction), 심부전, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 말기 심장 질환, 아테롬성동맥경화증, 허혈, 고혈압, 재발협착증(restenosis), 협심증, 류마티스성 심장(rheumatic heart), 동맥 염증(arterial inflammation), 심혈관 질환, 심근 경색, 심근 허혈(myocardial ischemia), 울혈성 심부전, 심근 경색, 심장 허혈(cardiac ischemia), 심장 손상, 심근 허혈, 혈관 질환, 후천성 심장 질환, 선천성 심장 질환, 아테롬성동맥경화증, 관상 동맥 질환, 전도계 기능장애, 기능이상 관상 동맥 기능장애, 폐고혈압, 심부정맥(cardiac arrhythmias), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육량 이상(muscle mass abnormality), 근육 변성(muscle degeneration), 심근염(myocarditis), 감염성 심근염, 약물- 또는 독소-유발 근육 이상, 과민성 심근염, 및 자가면역 심내막염(autoimmune endocarditis)으로 이루어진 군으로부터 선택된 심장 장애를 치료하기 위해 수용자 대상체에게 투여된다.

[0605] 따라서, 심장 손상 또는 심장 질환 또는 장애의 치료 및 예방을 필요로 하는 대상체에서 심장 손상 또는 심장 질환 또는 장애를 치료하고 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 방법은 심장의 구조 및/또는 기능에 병리학적 손상을 초래하는 것들과 같은 다수의 심장 질환 또는 그의 증상을 치료, 개선, 예방 또는 그의 진행을 둔화시키는 데 사용될 수 있다. 용어 "심장 질환," "심장 장애," 및 "심장 손상"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며 판막, 내피, 경색대(infarcted zones), 또는 심장의 다른 구성요소 또는 구조를 포함하여 심장과 관련한 병태 및/또는 장애를 지칭한다. 이러한 심장 질환 또는 심장 관련 질환은 그 중에서도 심근 경색, 심부전, 심근병증, 선천성 심장 결함, 심장 판막 질환 또는 기능이상, 심내막염, 류마티스성 열(rheumatic fever), 승모판 탈출증(mitral valve prolapse), 감염성 심내막염(infective endocarditis), 비후성 심근병증, 확장성 심근병증, 심근염, 심비대증, 및/또는 승모판 부전증(mitral insufficiency)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0606] 일부 구현예에서, 조작된 심장 세포 집단은 투여 전에 배양물에서 유지되며, 일부 경우에 확장된다. 특정 구현예에서, 심장 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[0607] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 조작된 심장 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 심장 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 심장 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 심장 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 과표현하는 게놈 변형을 보유한다.

[0608] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 심장 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 심장 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 심장 세포 집단은 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이

제공된다.

- [0609] 일부 구현예에서, 투여는 대상체의 심장 조직으로의 이식, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 관상동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 심근내 주사, 경심내막 주사, 경외심막 주사, 또는 주입을 포함한다.
- [0610] 일부 구현예에서, 조작된 심장 세포가 투여된 환자는 또한 심장 약물이 투여된다. 조합 요법에 사용하기에 적합한 심장 약물의 예시적인 예는 성장 인자, 성장 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 혈관신생제, 칼슘 채널 차단제, 항고혈압제, 항유사분열제, 수축제, 항-동맥경화제, 항-응고제, 베타- 차단제, 항-부정맥제, 항-염증제, 혈관확장제, 혈전용해제, 강심배당체(cardiac glycoside), 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 원생동물을 억제하는 제제, 질산염, 안지오텐신 전환 효소(ACE) 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 뇌 나트륨이노 펩티드(BNP); 항신생물제, 스테로이드 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0611] 본원에 제공된 방법에 따른 요법의 효과는 다양한 방식으로 모니터링될 수 있다. 예를 들면, 심전도(ECG) 또는 홀리어(holier) 모니터가 치료 효능을 결정하는 데 활용될 수 있다. ECG는 심장 박동 및 전기 자극을 측정하고, 요법이 대상체의 심장에서 전기 전하도 저하를 개선 또는 유지하거나, 예방하거나, 둔화시켰는지 여부를 결정하는 매우 효과적이고 비침습적인 방식이다. 심장 이상, 부정맥 장애 등을 모니터링하기 위해 장시간 동안 착용할 수 있는 휴대용 ECG인 홀리어 모니터의 사용이 또한 요법의 효과를 평가하는 신뢰할 수 있는 방법이다. ECG 또는 핵 연구가 심실 기능의 개선을 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0612] *h. 신경 세포*
- [0613] 수용자 대상체에게 후속 이식 또는 생착하는 데 유용한 상이한 신경 세포 유형이 본원에 제공된다. 예시적인 신경 세포 유형은 대뇌 내피 세포, 뉴런(예를 들어, 도파민성 뉴런), 교질 세포 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0614] 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포 집단은 투여 전에 배양물에서 유지되거나, 일부 경우에 확장된다. 특정 구현예에서, 신경 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.
- [0615] 일부 구현예에서, 본 기술은 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된 조작된 신경 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조작된 신경 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 B2M 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 CIITA 유전자에 게놈 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포는 관용원성 인자(예를 들어 CD47)를 과발현하고 다음 유전자: B2M 및 CIITA 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 게놈 변형을 보유한다.
- [0616] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 신경 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 뉴랄(neural) 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 본원에 기재된 조작된 신경 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0617] 일부 구현예에서, 신경 세포는 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington disease), 다발성 경화증, 다른 신경퇴행성 질환 또는 병태, 주의력 결핍 과잉행동 장애(ADHD), 투렛 증후군(TS), 정신분열증, 정신병, 우울증, 다른 신경정신과적 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경 세포는 뇌졸중을 치료하거나 개선하기 위해 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 뉴런 및 교질 세포는 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 앓고 있는 대상체에게 투여된다.
- [0618] 1) 대뇌 내피 세포
- [0619] 일부 구현예에서, 대뇌 내피 세포는 뇌출혈의 증상 또는 영향을 완화하기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 도파민성 뉴런은 파킨슨병을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 노르아드레날린성 뉴런, GABA성 개재뉴런은 간질성 발작(epileptic seizure)을 경험한 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 운동 뉴런, 개재뉴런, 슈반(Schwann) 세포, 희소돌기아교세포, 및 소교세포(microglia)는 척수 손상을 경험한 환자에게 투여된다.
- [0620] 2) 도파민성 뉴런
- [0621] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 HIP 세포는 도파민성 뉴런이다.

- [0622] 일부 경우에, 용어 "도파민성 뉴런"은 도파민 합성을 위한 속도 제한 효소인 티로신 수산화효소(TH)를 발현하는 뉴런 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 도파민성 뉴런은 신경전달물질 도파민을 분비하고, 도파민 수산화효소를 거의 또는 전혀 발현하지 않는다. 도파민성(DA) 뉴런은 다음 마커: 뉴런-특이적 에놀라제(NSE), 1-방향족 아미노산 탈탄산효소, 소포성 모노아민 수송체 2, 도파민 수송체, Nurr-1, 및 도파민-2 수송체(D2 수송체) 중 하나 이상을 발현할 수 있다.
- [0623] 일부 구현예에서, DA 뉴런은 신경퇴행성 질환 또는 병태를 치료하기 위해 환자, 예를 들어, 인간 환자에게 투여된다. 일부 경우에, 신경퇴행성 질환 또는 병태는 파킨슨병, 헌팅턴병, 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, DA 뉴런은 신경정신과적 장애, 예컨대 주의력 결핍 과잉행동 장애(ADHD), 투렛 증후군(TS), 정신분열증, 정신병, 및 우울증 중 하나 이상의 증상을 치료하거나 개선하는 데 사용된다. 또 다른 구현예에서, DA 뉴런은 DA 뉴런이 손상된 환자를 치료하는 데 사용된다.
- [0624] 일부 구현예에서, 분화된 DA 뉴런은 정맥내로 또는 환자의 특정 위치에 주사에 의해 이식된다. 일부 구현예에서, DA 세포는 파킨슨병을 유발한 변형이 있는 DA 뉴런을 대체하기 위해 뇌의 흑색질(특히 치밀 영역 내 또는 인접), 복측 피개 영역(VTA), 꼬리, 피각, 중격핵, 시상하부 핵, 또는 이의 임의의 조합에 이식된다. DA 세포는 세포 현탁액으로서 표면 부위에 주입될 수 있다. 대안적으로, DA 세포는 이러한 전달 장치를 함유하는 경우 지지 매트릭스 또는 스캐폴드에 함침될 수 있다. 일부 구현예에서, 스캐폴드는 생분해성이다. 다른 구현예에서, 스캐폴드는 생분해성이 아니다. 스캐폴드는 천연 또는 합성(인공) 물질을 포함할 수 있다.
- [0625] DA 뉴런의 전달은 리포솜, 마이크로입자, 또는 마이크로캡슐과 같으나 이에 제한되지 않는 적합한 비히클을 사용함으로써 달성될 수 있다. 다른 구현예에서, DA 뉴런은 등장성 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로 투여된다. 약제학적 조성물은 인간 투여를 위해 충분히 멸균되는 조건 하에 제조된다. 일부 구현예에서, DA는 약제학적 조성물의 형태로 공급된다.
- [0626] 3) 교질 세포
- [0627] 일부 구현예에서, 기재된 신경 세포는 소교세포, 성상세포, 희소돌기아교세포, 뇌실막 세포 및 슈만 세포, 교질 전구체, 및 교질 선조체와 같으나 이에 제한되지 않는 교질 세포를 포함한다.
- [0628] 척수 손상에 대한 신경 세포 이식의 효능은 예를 들어, McDonald, 등, Nat. Med., 1999, 5:1410 및 Kim, 등, Nature, 2002, 418:50에 기재된 바와 같이 급성 손상 척수에 대한 래트 모델에서 평가될 수 있다. 예를 들면, 성공적인 이식은 2-5주 후에 병변에 존재하는 이식 유래 세포가 성상세포, 희소돌기아교세포, 및/또는 뉴런으로 분화되고 병변 끝으로부터 척수를 따라 이동하여, 보행, 좌표, 및 체중 부하의 개선을 나타낼 수 있다. 특이적 동물 모델은 신경 세포 유형 및 치료될 신경학적 질환 또는 병태에 기반하여 선택된다.
- [0629] 신경 세포는 이들을 의도된 조직 부위에 생착시키고 기능적으로 결합이 있는 부위를 재구성하거나 재생하는 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 신경 세포는 치료되는 질환에 따라 중추신경계의 실질 또는 척수강내 부위에 직접 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 대뇌 내피 세포, 뉴런, 도파민성 뉴런, 뇌실막 세포, 성상세포, 미세교질 세포, 희소돌기아교세포, 및 슈만 세포를 포함하는 본원에 기재된 임의의 신경 세포는 정맥내, 척수내, 뇌실내, 척수강내, 동맥내, 근육내, 복강내, 피하, 근육내, 복강내, 안구내, 안구위 및 이의 조합 방식으로 환자에게 주입된다. 일부 구현예에서, 세포는 볼루스 주사 또는 연속 주입의 형태로 주입되거나 침착된다. 특정 구현예에서, 신경 세포는 뇌에 주사, 적절한 뇌에 주사, 및 이의 조합에 의해 투여된다. 주사는 예를 들어, 대상체의 두개골에 만들어진 천두술(burr hole)을 통해 이루어질 수 있다. 적합한 신경 세포를 뇌에 투여하기에 적합한 부위는 대뇌실, 측뇌실, 대뇌수조, 피각, 기저핵, 해마 피질, 선조체, 뇌의 미상 영역 및 이의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0630] 본 기술에 사용하기 위한 도파민성 뉴런을 포함하는 신경 세포의 추가적인 설명은 W02020/018615에서 발견되며, 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0631] 2. 줄기 세포
- [0632] 일부 구현예에서, 세포는 줄기 세포 또는 선조 세포(예를 들어, iPSC, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 또는 선조 세포, 생식계열 줄기 세포, 폐 줄기 또는 선조 세포, 유선 줄기 세포, 후각 성체 줄기 세포, 모낭 줄기 세포, 다분화성 줄기 세포, 양막 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 또는 신경 줄기 또는 선조 세포)이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 성체 줄기 세포(예를 들어, 체세포 줄기 세포 또는 조직 특이적 줄기 세포)이다. 일부 구현예에서, 줄기 또는 선조 세포는 분화될 수 있다(예를 들

어, 줄기 세포는 전능성, 다능성, 또는 다분화성임). 일부 구현예에서, 세포는 근육 세포, 적혈구-거핵구 세포, 호산구, iPSC 세포, 대식세포, T 세포, 섬 베타-세포, 뉴런, 심근세포, 혈액 세포, 내분비 선조체, 외분비 선조체, 췌관 세포, 선포 세포, 알파 세포, 베타 세포, 델타 세포, PP 세포, 간세포, 담관세포, 또는 갈색 지방세포로 조작(예를 들어, 전환 또는 분화)된다.

[0633] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작된 세포는 유도 다능성 줄기 세포이거나 유도 다능성 줄기 세포로부터 유래되거나 분화된 조작된 세포이다. 마우스 및 인간 다능성 줄기 세포(일반적으로 iPSC로 언급됨; 무린 세포의 경우 miPSC 또는 인간 세포의 경우 hiPSC)의 생성은 일반적으로 당업계에 알려져 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, iPSC의 생성을 위한 다양한 상이한 방법이 있다. 최초의 유도는 4개의 전사 인자, Oct3/4, Sox2, c-Myc 및 Klf4의 바이러스 도입을 사용하여 마우스 배아 또는 성체 섬유아세포로부터 수행되었으며; Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676(2006)을 참조하고, 그 전문 및 구체적으로 여기에 요약된 기술에 대해 본원에 참조로 포함된다. 그 이후로, 다수의 방법이 개발되었으며; 검토를 위해 Seki 등, World J. Stem Cells 7(1): 116-125(2015)를 참조하고, Lakshmiathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013을 참조하며, 둘 다 그 전문, 및 특히 hiPSC를 생성하는 방법(예를 들어 후자 참고문헌의 3장 참조)에 대해 본원에 참조로 명시적으로 포함된다.

[0634] 일반적으로, iPSC는 에피솜 벡터를 사용하여 도입되는 숙주 세포에서 하나 이상의 재프로그래밍 인자"의 일시적 발현에 의해 생성된다. 이러한 조건 하에, 소량의 세포가 iPSC가 되도록 유도된다(일반적으로, 이 단계의 효율은 선택 마커가 사용되지 않기 때문에 낮음). 일단 세포가 "재프로그래밍"되고, 다능성에게 되면, 이들은 에피솜 벡터(들)를 상실하고 내생 유전자를 사용하여 인자를 생성한다.

[0635] 또한 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 사용될 수 있거나 사용되는 재프로그래밍 인자의 수는 달라질 수 있다. 통상적으로, 더 적은 수의 재프로그래밍 인자가 사용되는 경우, 세포를 다능성 상태로 형질전환하는 효율, 뿐만 아니라 "전분화능"이 감소하며, 예를 들어, 더 적은 수의 재프로그래밍 인자는 완전히 다능성이지만 더 적은 세포 형으로만 분화할 수 있는 세포를 초래할 수 있다.

[0636] 일부 구현예에서, 단일 재프로그래밍 인자인 OCT4가 사용된다. 다른 구현예에서, 2개의 재프로그래밍 인자인 OCT4 및 KLF4가 사용된다. 다른 구현예에서, 3개의 재프로그래밍 인자인 OCT4, KLF4 및 SOX2가 사용된다. 다른 구현예에서, 4개의 재프로그래밍 인자인 OCT4, KLF4, SOX2 및 c-Myc가 사용된다. 다른 구현예에서, SOKMNL; SOX2, OCT4(POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28, 및 SV40L T 항원으로부터 선택된 5, 6 또는 7개의 재프로그래밍 인자가 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 재프로그래밍 인자 유전자는 당업계에 알려져 있고 상업적으로 입수가능한 것과 같이 에피솜 벡터 상에 제공된다.

[0637] 일부 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍(reprogramming) 인자를 형질감염시키는 데 사용되는 숙주 세포는 비-다능성 줄기 세포이다. 일반적으로, 당업계에 알려져 있는 바와 같이, iPSC는 본원에 기재된 바와 같은 재프로그래밍 인자를 일시적으로 발현함으로써 혈액 세포, 섬유아세포 등과 같으나 이에 제한되지 않는 비-다능성 세포로부터 만들어진다. 일부 구현예에서, 비-다능성 세포, 섬유아세포와 같은 비-다능성 세포는 세포를 재프로그래밍하기 전에 1명 이상의 개별 대상체 또는 공여자로부터 획득되거나 단리된다. 일부 구현예에서, iPSC는 1명 이상(예를 들어 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상)의 상이한 공여자 대상체로부터 획득된 단리된 비-다능성 줄기 세포, 예를 들어 섬유아세포의 풀로부터 만들어진다. 일부 구현예에서, 섬유아세포와 같은 비-다능성 세포는 iPSC로서 재프로그래밍된 배지에서 함께 풀링된 복수의 상이한 공여자 대상체(예를 들어 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 10명 이상, 20명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상)로부터 단리되거나 획득되고 제공된 방법에 따라 조작된다.

[0638] 일부 구현예에서, iPSC는 수용자 대상체(예를 들어, 세포가 투여된 환자)와 상이한 1명 이상의 공여자 대상체로부터의 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)의 풀로부터의 세포에 하나 이상의 재프로그래밍 인자를 일시적으로 형질감염시키는 것으로부터 유래된다. iPSC로 유도될 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100명 이상의 공여자 대상체로부터 획득되고 함께 풀링될 수 있다. 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)는 1명 이상, 2명 이상, 3명 이상, 4명 이상, 5명 이상, 6명 이상, 7명 이상, 8명 이상, 9명 이상, 10명, 이상 20명 이상, 50명 이상, 또는 100명 이상의 공여자 대상체로부터 획득되고 함께 풀링될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)는 1명 또는 복수의 개체로부터 수확되고, 일부 경우에, 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포) 또는 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)의 풀은 시험관 내에서 배양되고 하나 이상의 재프로그래밍 인자로 형질감염시켜 iPSC의 생성을 유도한다. 일부 구현예에서, 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포) 또는 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)의 풀은 본원에 제공된 방법에

따라 조작되거나 변형된다. 그런 다음 일부 구현예에서, 조작된 iPSC 또는 조작된 iPSC의 풀은 유기체 및 조직의 임의의 세포로의 분화를 위해 분화 과정을 거친다.

[0639] 일단 조작된 iPSC 세포가 생성되면, 이들은 W02016183041 및 W02018132783에 기재된 바와 같이 저면역원성 및/또는 전분화능 유지에 대해 검정될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성은 W02018132783의 도면 13 및 도면 15에 예시된 바와 같은 다수의 기술을 사용하여 검정된다. 이러한 기술은 동종이계 숙주로의 이식 및 숙주 면역계를 피하는 저면역원성 다능성 세포 성장(예를 들어 기형종)에 대한 모니터링을 포함한다. 일부 경우에, 저면역원성 다능성 세포 유도체는 루시페라제를 발현하도록 형질도입된 다음 생물발광 이미징을 사용하여 추적될 수 있다. 유사하게는, 이러한 세포에 대한 숙주 동물의 T 세포 및/또는 B 세포 반응을 테스트하여 세포가 숙주 동물에서 면역 반응을 유발하지 않는다는 것을 확인한다. T 세포 반응은 Elispot, ELISA, FACS, PCR, 또는 질량 세포분석법(CYTOF)에 의해 평가될 수 있다. B 세포 반응 또는 항체 반응은 FACS 또는 Luminex를 사용하여 평가된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 세포는 일반적으로 W02018132783의 도 14 및 15에 제시된 바와 같이, 선천성 면역 반응, 예를 들어, NK 세포 사멸을 피하는 능력에 대해 검정될 수 있다.

[0640] 일부 구현예에서, 세포의 면역원성은 당업자에 의해 인식되는 T 세포 증식 검정, T 세포 활성화 검정, 및 T 세포 사멸 검정과 같은 T 세포 면역검정을 사용하여 평가된다. 일부 경우에, T 세포 증식 검정은 세포를 인터페론-감마로 전처리하고 세포를 표지된 T 세포와 공배양하고 미리 선택된 시간 후에 T 세포 집단(또는 증식 T 세포 집단)의 존재를 검정하는 것을 포함한다. 일부 경우에, T 세포 활성화 검정은 T 세포를 본원에 요약된 세포와 공배양하고 T 세포에서 T 세포 활성화 마커의 발현 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0641] 생체 내 검정은 본원에 요약된 세포의 면역원성을 평가하기 위해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작되거나 변형된 iPSC의 생존 및 면역원성은 동종이계 인간화 면역결핍 마우스 모델을 사용하여 결정된다. 일부 경우에, 조작되거나 변형된 iPSC는 동종이계 인간화 NSG-SGM3 마우스에 이식되고 세포 거부, 세포 생존, 및 기형종 형성에 대해 검정된다. 일부 경우에, 생착되는 조작된 iPSC 또는 이의 분화된 세포는 마우스 모델에서 장기간 생존을 나타낸다.

[0642] 세포의 저면역원성을 포함한 면역원성을 결정하는 추가적인 기술은 예를 들어, Deuse 등, Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 및 Han 등, Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446에 기재되어 있으며, 도면, 도면 범례, 및 방법 설명을 포함한 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0643] 유사하게는, 전분화능 유지는 다수의 방식으로 테스트된다. 하나의 구현예에서, 전분화능은 일반적으로 본원에 기재되고 W02018132783의 도면 29에 제시된 바와 같은 특정 전분화능 특이적 인자의 발현에 의해 검정된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 다능성 세포는 전분화능의 표시로서 하나 이상의 세포 유형으로 분화된다.

[0644] 일단 조작된 다능성 줄기 세포(조작된 iPSC)가 생성되면, 이들은 iPSC를 유지하는 것으로 알려진 바와 같이 미분화된 상태로 유지될 수 있다. 예를 들어, 세포는 분화를 방지하고 전분화능을 유지하는 배양 배지를 사용하여 Matrigel에서 배양될 수 있다. 게다가, 이들은 전분화능을 유지하는 조건 하에 배양 배지에 있을 수 있다.

[0645] 본원에 기재된 임의의 다능성 줄기 세포는 유기체 및 조직의 임의의 세포로 분화될 수 있다. 한 측면에서, 수용자 대상체로의 후속 이식을 위해 iPSC와 상이한 세포 유형으로 분화되는 조작된 세포가 본원에 제공된다. 분화는 일반적으로 세포 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 검정될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화되는 조작된(예를 들어 저면역원성) 다능성 세포 유도체는 세포 유형 및 이들 세포의 궁극적인 사용 모두에 의존하는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, iPSC는 본원에 기재된 임의의 세포 유형으로 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, iPSC는 T 세포, NK 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포 예컨대 RPE, 전립선, 피부, 또는 간세포로부터 선택된 세포 유형으로 분화된다. 일부 구현예에서, 개별 공여자 또는 개별 공여자의 풀로부터의 비-다능성 세포(예를 들어 섬유아세포)와 같은 숙주 세포는 단리되거나 수득되어 iPSC로 생성된 다음 iPSC는 본원에 기재된 변형(예를 들어 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 다음 원하는 세포 유형으로 분화된다.

[0646] **3. ABO 혈액형 및 Rh 항원 발현**

[0647] 혈액 생성물은 사람 신체 내 모든 적혈구의 표면 상에서 항원의 존재 또는 부재에 따라 상이한 그룹으로 분류될 수 있다(ABO 혈액형). A, B, AB, 및 A1 항원은 적혈구의 당단백질 상의 올리고당류의 서열에 의해 결정된다. 혈액형 항원 그룹에서 유전자는 항원 단백질을 만드는 지침을 제공한다. 혈액형 항원 단백질은 적혈구의 세포 막 내에서 다양한 기능을 수행한다. 이들 단백질 기능은 다른 단백질 및 세포 안팎으로 수송하고, 세포 구조를 유지하고, 다른 세포 및 분자에 부착하고, 화학 반응에 참여하는 것을 포함한다.

[0648] 레서스 인자(Rh) 혈액형은 ABO 혈액형 시스템 다음으로 두번째로 가장 중요한 혈액형 시스템이다 Rh 혈액형 시스템은 49개의 정의된 혈액형 항원으로 이루어지며, 그 중에서 5개의 항원인 D, C, c, E, 및 e가 가장 중요하다. 개체의 Rh(D) 상태는 일반적으로 ABO 유형 뒤에 양수 또는 음수 접미사로 설명된다. 용어 "Rh 인자," "Rh 양성," 및 "Rh 음성"은 Rh(D) 항원만을 지칭한다. Rh 항원에 대한 항체는 용혈성 수혈 반응에 수반될 수 있으며 Rh(D) 및 Rh(c) 항원에 대한 항체는 태아 및 신생아의 용혈성 질환의 상당한 위험을 부여한다. ABO 항체는 모든 인간에서 생애 초기에 발생한다. 그러나, Rh- 인간에서 레서스 항체는 전형적으로 사람이 감염된 경우에만 발생한다. 이것은 예를 들어, Rh+ 아기를 출산하거나 Rh+ 수혈을 받음으로써 발생할 수 있다.

[0649] A, B, H, 및 Rh 항원은 혈액, 조직 및 세포 이식에 대한 조직접합성 벤벤(benveen) 공여자 및 수용자의 주요 결정인자이다. ABO 유전자에 의해 암호화된 글리코실트랜스퍼라제 활성은 세포의 표면 상에 표시되는 A, B, AB, O 조직-혈액형 항원을 생성하는 역할을 한다. 그룹 A 개체는 (1,3)N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 활성을 생성하는 특이성을 갖는 ABO 유전자 산물을 암호화하고 그룹 B 개체는 (1, 3) 갈락토실트랜스퍼라제 활성을 생성하는 특이성을 갖는다. O형 개체는 기능적 갈락토실트랜스퍼라제를 전혀 생성하지 않으므로 변형을 생성하지 않는다. AB형 개체는 각각 1개의 카피를 보유하고 두 유형의 변형을 생성한다. ABO 유전자의 효소 생성물은 H 항원 상에 기질로서 작용하므로, ABO 활성이 결여된 O형 개체는 비변형된 H 항원을 제시하므로 종종 O(H)형으로 언급된다.

[0650] H 항원 자체는 *FUT1* 유전자에 의해 암호화된 (1,2)푸코실트랜스퍼라제 효소의 생성물이다. 매우 드문 개체에서 *FUT1* 유전자 파괴의 결과로서 H 항원의 완전한 손실이 존재하고 ABO가 A형 또는 B형 조직-혈액형을 생성하는 경우 기질이 존재하지 않을 것이다. 이러한 개체는 Bombay 조직-혈액형이라고 한다. Rh 항원은 *RHD* 유전자에 의해 암호화되고, Rh 음성인 개체는 *RHD* 유전자의 결실 또는 파괴를 보유한다.

[0651] 일부 구현예에서, 본원에 제공되는 세포 또는 세포 집단은 ABO O형 Rh 인자 음성이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 ABO O형 Rh 인자 음성 세포는 ABO O형 Rh 인자 음성 공여자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 ABO O형 Rh 인자 음성 세포는 ABO A형, ABO B형, 또는 Rh 인자 항원의 제시가 결여되도록 조작된다. 일부 구현예에서, ABO O형 및/또는 Rh 음성 세포는 *ABO* 유전자의 부분적 또는 완전한 불활성화를 포함하고/하거나 (예를 들어, *ABO* 유전자의 유해한 변이에 의해 또는 *ABO* 유전자의 엑손 6 258delG 변이의 삽입에 의해), *RHD* 유전자의 발현은 *RHD* 유전자의 유해한 변이에 의해 부분적으로 또는 완전히 불활성화된다. 일부 구현예에서, ABO O형 Rh 음성 세포는 *FUT1* 유전자의 부분적 또는 완전한 불활성화를 포함하고/하거나 *RHD* 유전자의 발현은 *RHD* 유전자의 유해한 변이에 의해 부분적으로 또는 완전히 불활성화된다. 일부 구현예에서, 조작된 ABO O형 및/또는 Rh 인자 음성 세포는 예를 들면, A형 세포를 O형 세포로, B형 세포를 O형 세포로, AB형 세포를 O형 세포로, A+형 세포를 O-형 세포로, A-형 세포를 O-형 세포로, AB+형 세포를 O-형 세포로, AB-형 세포를 O-형 세포로, B+형 세포를 O-형 세포로, 그리고 B-형 세포를 O-형 세포로 변형시키기 위해 유전자 편집을 사용하여 생성된다. 예시적인 조작된 ABO O형 Rh 인자 음성 세포 및 이를 생성하는 방법은 WO2021/146222에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0652] **4. 성염색체**

[0653] 특정 측면에서, 성염색체를 갖는 세포는 특정 항원(예를 들어, Y 항원)을 발현할 수 있고, 수용자는 이러한 항원에 대해 기존의 민감성을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 남자 태아를 임신한 여성은 남성 공여자로부터의 세포를 거절할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 공여자는 남성이고 수용자는 남성이다. 일부 구현예에서, 공여자는 여성이고 수용자는 여성이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 프로토카드헤린 Y 및/또는 뉴로리긴 Y와 같은 항원의 발현을 감소시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로토카드헤린 Y를 암호화하는 유전자(PCDH11Y; Ensembl ID ENSG00000099715)는 조작된 세포에서 감소되거나 제거되며, 예를 들어 녹아웃된다. 일부 구현예에서, 뉴로리긴 Y를 암호화하는 유전자(NLGN4Y; Ensembl ID ENSG00000165246)는 조작된 세포에서 감소되거나 제거되며, 예를 들어 녹아웃된다. 본원에 기재된 임의의 것과 같은 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, PCDH11Y 및/또는 NLGN4Y는 CRISPR/Cas 시스템을 사용하는 것과 같은 뉴클레아제-매개 유전자 편집 방법에 의해 조작된 세포에서 감소되거나 제거된다.

[0654] **D. 조작된 1차 세포의 예시적인 구현예**

[0655] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 조작된 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 인간 세포 또는 동물 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 공여자 대상체(예를 들어, 공여자 샘플이 개별 공여자 대상체로부터 수득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않은 건강한 공여자 대상체)로부터 단리된 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망

막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0656] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현, 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 복합체 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 하나 이상의 MHC 클래스 I 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 과발현을 부여하는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0657] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 B2M의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 CIITA의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 NLRC5의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 B2M 및 CIITA의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 B2M 및 NLRC5의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 CIITA 및 NLRC5의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현 및 B2M, CIITA 및 NLRC5의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 본원에 기재된 임의의 조작된 1차 세포는 또한 CD47, A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD52, CD55, CD59, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-1, PD-L1, 또는 Serpinb9를 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자의 증가된 발현을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 임의의 조작된 1차 세포는 또한 CD47, CD35, CD16 Fc 수용체, CD16, CD52, IL15-RF, H2-M3, DUX4, CD24, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, IL-39, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, 및 Serpinb9를 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터 선택된 하나 이상의 인자의 증가된 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0658] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47, 임의적으로 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 MHC 클래스 I 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47, 임의적으로 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 MHC 클래스 II 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47, 임의적으로 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 MHC 클래스 II의 하나 이상의 분자 및 MHC 클래스 II 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47, 임의적으로 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 B2M의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47 임의적으로, 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 CIITA의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47, 임의적으로 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 B2M 및 CIITA의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47 및 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 B2M 및 NLRC5의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47

및 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 CIITA 및 NLRC5의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 및 이의 집단은 CD47 및 적어도 하나의 다른 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 B2M, CIITA 및 NLRC5의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, CD35, CD16 Fc 수용체, CD16, CD52, IL15-RF, H2-M3, DUX4, CD24, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, IL-39, FasL, CCL21, CCL22, Mfge8, 및 Serpinb9를 포함하나 이에 제한되지 않는 군으로부터의 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 과발현을 부여하는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0659] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 및 이의 집단은 CD47의 과발현, 감소된 발현 B2M, 및 CIITA의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 발현은 B2M의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 발현은 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 발현은 B2M의 제거된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 발현은 B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 발현은 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M의 불활성화 또는 파괴는 B2M 유전자에 indel 또는 B2M 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자는 녹아웃된다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 발현은 CIITA의 감소된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 발현은 CIITA의 제거된 단백질 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 발현은 CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 발현은 세포에서 모든 CIITA 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA의 불활성화 또는 파괴는 CIITA 유전자에 indel 또는 CIITA 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자는 녹아웃된다.

[0660] 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다.

[0661] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0662] 당업자는 유전자, 단백질 또는 분자의 증가된(예를 들어, 과발현) 또는 감소된 발현과 같은 발현 수준이 필적할 만한 세포를 참조하거나 이와 비교될 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, CD47의 증가된 발현을 갖는 조작된 1차 세포는 비변형된 1차 세포와 비교하여 더 높은 수준의 CD47 단백질을 갖는 변형된 1차 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 발현을 갖는 조작된 1차 세포는 비변형된 1차 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 B2M 단백질을 갖는 변형된 1차 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 발현을 갖는 조작된 1차 세포는 비변형된 1차 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 CIITA 단백질을 갖는 변형된 1차 세포를 지칭한다.

[0663] 하나의 구현예에서, 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현하고 하나 이상의 MHC 클래스 I 복합체 단백질, 하나 이상의 MHC 클래스 II 복합체 단백질, 또는 MHC 클래스 I 및 클래스 II 복합체 단백질의 임의의 조합의 감소된 발현을 갖는 조작된 1차 세포(예를 들어, 1차 세포)가 본원에 제공된다. 또 다른 구현예에서, 조작된 1차 세포는 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현하고 감소된 수준의 B2M 및 CIITA 폴리펩티드를 발현한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현하고 B2M 및 CIITA 유전자의 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 보유한다. 일부 경우에, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 B2M 및 CIITA 유전자를 불활성화한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0664]

일부 구현예에서, 조작된 1차 세포(예를 들어, 1차 세포)를 생성하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하고; 세포에서 CD47 발현을 증가(예를 들어, 과발현)시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47의 발현을 증가시키는 변형은 프로모터에 연결된 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지고 이루어지며, 임의적으로 여기서 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 표적 게놈 유전자좌를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 저면역원성 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포 및, 추가로 키메라 항원 수용체(CAR)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 0형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0665]

일부 구현예에서, 조작된 1차 세포(예를 들어, 1차 세포)를 생성하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 B2M의 발현을 감소시키거나 제거하고; 세포 내 CD47의 발현을 증가(예를 들어, 과발현)시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 B2M의 발현을 감소시키거나 제거하는 변형을 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키거나 제거하는 변형은 B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M을 감소시키거나 제거하는 변형은 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴는 B2M 유전자에 indel 또는 B2M 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, indel은 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, B2M 유전자는 녹아웃된다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키거나 제거하는 변형은 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 B2M 단백질 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 B2M 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합은 B2M 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR-Cas 조합은 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체이다. 일부 구현예에서, 방법은 세포에서 CIITA의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 CIITA의 발현을 감소시키거나 제거하는 변형을 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키거나 제거하는 변형은 CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서 CIITA를 감소시키거나 제거하는 변형은 세포에서 모든 CIITA 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴는 CIITA 유전자에 indel 또는 CIITA 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, indel은 프레임시프트 돌연변이이다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자는 녹아웃된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현을 증가시키는 변형은 프로모터에 연결된 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지고 이루어지며, 임의적으로 여기서 표적화 삽입은 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형은 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-매개 유전자 편집은 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 표적 게놈 유전자좌를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 여기서 Cas는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 발현을 증가시키는 변형(들)은 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형은 감소된 표면 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 저면역원성 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK

세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 T 세포 및 NK 세포로부터 선택되고, 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 ABO 혈액형 O형이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포는 레서스 인자 음성(Rh-)이다.

[0666] 일부 측면에서, 본원에 기재된 임의의 조작된 1차 세포와 같은 조작된 1차 세포 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 섬 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 베타 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 T 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 T 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 갑상선 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 갑상선 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 피부 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 피부 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 내피 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 내피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 망막 색소 상피 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조작된 1차 망막 색소 상피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 조작된 1차 세포의 임의의 전술한 구현예에서, 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 추가로 포함할 수 있다.

[0667] **E. 저면역원성 표현형에 대한 검정**

[0668] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포는 저면역원성에 대해 평가되거나 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 저면역원성은 적응성 및 선천성 면역 반응을 도출하는 세포의 능력과 같은 세포의 면역원성을 평가함으로써 결정될 수 있다. 이러한 면역 반응은 당업자에 의해 인식되는 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 반응 검정은 T 세포 증식, T 세포 활성화, T 세포 사멸, NK 세포 증식, NK 세포 활성화, 및 대식세포 활성화에 대한 저면역원성 세포의 효과를 측정한다. 일부 경우에, 저면역원성 세포 및 이의 유도체는 대상체에게 투여 시 T 세포 및/또는 NK 세포에 의한 사멸 감소를 겪는다. 일부 경우에, 저면역원성 세포 및 이의 유도체는 대상체에게 투여 시 대식세포에 의한 사멸 감소를 겪는다. 일부 경우에, 저면역원성 세포 및 이의 유도체는 대상체에게 투여 시 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 의한 사멸 감소를 겪는다. 일부 경우에, 세포 및 이의 유도체는 비변형 또는 야생형 세포와 비교하여 감소된 대식세포 탐식을 나타낸다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 상응하는 비변형된 야생형 세포와 비교하여 수용자 대상체에서 감소되거나 줄어든 면역 반응을 도출한다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 비면역원성이거나 수용자 대상체에서 면역 반응을 도출하는 데 실패한다.

[0669] 일단 저면역원성 세포가 생성되면, 이들은 W02016183041 및 W02018132783에 기재된 바와 같이, 그들의 저면역원성, 생착, 및 기능에 대해 검정될 수 있다.

[0670] 저면역원성 세포는 이들을 의도된 조직 부위에 생착시키고 기능적으로 결합이 있는 영역을 재구성하거나 재생하는 방식으로 투여된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 생착(예를 들어, 성공적인 생착)에 대해 검정된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 생착은 미리 선택된 시간 후에 평가된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 세포 생존에 대해 모니터링된다. 예를 들어, 세포 생존은 생물발광 이미징(BLI)을 통해 모니터링될 수 있으며, 여기서 세포는 세포 생존을 모니터링하기 위해 루시퍼라제 발현 작제물로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 당업계에 알려진 면역염색 및 이미징 방법에 의해 시각화된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 성공적인 생착을 결정하기 위해 검출될 수 있는 알려진 바이오마커를 발현한다. 예를 들어, 유세포 분석법을 사용하여 특정 바이오마커의 표면 발현을 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 예상된 대로 의도된 조직 부위에 생착된다(예를 들어, 저면역원성 세포의 성공적인 생착). 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 필요에 따라 세포 결핍 부위와 같은 의도된 조직 부위에 생착된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 비-조작된 1차 세포(예를 들어, 변형(들)을 포함하지 않는 1차 세포)가 의도된 조직 부위에 생착되는 것과 동일한 방식

으로 의도된 조직 부위에 생착된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 기능에 대해 검정된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 의도된 조직 부위에 생착되기 전에 기능에 대해 검정된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 의도된 조직 부위에 생착된 후에 기능에 대해 검정된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 미리 선택된 양 후에 평가된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포의 기능은 검출가능한 표현형을 생성하는 세포의 능력에 의해 평가된다. 예를 들어, 생착된 심 세포 및/또는 베타 심 세포 기능은 당뇨병으로 인한 손실된 포도당 제어 회복에 기반하여 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 예상된 바와 같다(예를 들어, 항체 매개 거부를 피하면서 저면역원성 세포의 성공적인 기능). 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 필요에 따라 예컨대 항체 매개 거부를 피하면서 세포 결핍증 부위에서 충분한 기능이다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 항체 매개 거부를 피하면서 비-조작된 1차 세포(예를 들어, 변형(들)을 포함하지 않는 1차 세포)가 기능하는 것과 동일한 방식으로 기능한다.

- [0671] 일부 구현예에서, 저면역원성은 W02018132783의 도면 13 및 도면 15에 예시된 바와 같은 다수의 기술을 사용하여 검정된다. 이들 기술은 동종이계로의 이식 및 숙주 면역계를 피하는 저면역원성 세포 성장(예를 들어 기형종)에 대해 모니터링하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 저면역원성 세포 유도체는 루시페라제를 발현하도록 형질도입된 다음 생물발광 이미지를 사용하여 추적될 수 있다. 유사하게는, 이러한 세포에 대한 숙주 동물의 T 세포 및/또는 B 세포 반응을 테스트하여 세포가 숙주 동물에서 면역 반응을 유발하지 않는다는 것을 확인한다. T 세포 반응은 ELISPOT, ELISA, FACS, PCR, 또는 질량 세포분석법(CYTOF)에 의해 평가될 수 있다. B 세포 반응 또는 항체 반응은 FACS 또는 Luminex를 사용하여 평가된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 세포는 일반적으로 W02018132783의 도면 14 및 15에 제시된 바와 같이, 선천성 면역 반응, 예를 들어, NK 세포 사멸을 피하는 능력에 대해 검정될 수 있다.
- [0672] 일부 구현예에서, 세포의 면역원성은 당업자에 의해 인식되는 T 세포 증식 검정, T 세포 활성화 검정, 및 T 세포 사멸 검정과 같은 T 세포 면역검정을 사용하여 평가된다. 일부 경우에, T 세포 증식 검정은 세포를 인터페론-감마로 전처리하고 세포를 표지된 T 세포와 공배양하고 미리 선택된 시간 후에 T 세포 집단(또는 증식 T 세포 집단)의 존재를 검정하는 것을 포함한다. 일부 경우에, T 세포 활성화 검정은 T 세포를 본원에 요약된 세포와 공배양하고 T 세포에서 T 세포 활성화 마커의 발현 수준을 결정하는 것을 포함한다.
- [0673] 생체 내 검정은 본원에 요약된 세포의 면역원성을 평가하기 위해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 생존 및 면역원성은 동종이계 인간화 면역결핍 마우스 모델을 사용하여 결정된다. 일부 경우에, 저면역원성 세포는 동종이계 인간화 NSG-SGM3 마우스로 이식되고 세포 거부, 세포 생존, 및 기형종 형성에 대해 검정된다. 일부 경우에, 생착된 저면역원성 세포는 마우스 모델에서 장기간 생존을 나타낸다.
- [0674] 세포의 저면역원성을 포함하는 면역원성을 결정하기 위한 추가적인 기술은 예를 들어, Deuse 등, Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 및 Han 등, Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446에 기재되어 있으며, 도면, 도면 범례, 및 방법 설명을 포함한 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0675] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 다능성 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 기능(인간 세포로부터 유래된 경우 HLA I)의 성공적인 감소는 당업계에 알려지고 아래 기재된 바와 같은 기술; 예를 들어, HLA 복합체에 결합하는 표지된 항체를 사용하는 FACS 기술을 사용하여; 예를 들어, 인간 주요 조직집합성 HLA 클래스 I 항원의 알파 쇠에 결합하는 상업적으로 입수가 가능한 HLA-A, B, C 항체를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0676] 게다가, 세포를 테스트하여 HLA I 복합체가 세포 표면 상에서 발현되지 않는다는 것을 확인할 수 있다. 이는 위에 논의된 바와 같은 하나 이상의 HLA 세포 표면 구성요소에 대한 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 검정될 수 있다.
- [0677] 다능성 세포 또는 그들의 유도체에서 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 기능(세포가 인간 세포로부터 유래된 경우 HLA II)의 성공적인 감소는 단백질에 대한 항체를 사용하는 웨스턴 블롯팅, FACS 기술, RT-PCR 기술과 같은 당업계에 알려진 기술을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0678] 게다가, 세포를 테스트하여 HLA II 복합체가 세포 표면 상에서 발현되지 않는다는 것을 확인할 수 있다. 다시, 이 검정은 당업계에 알려진 바와 같이 수행되고(예를 들어 W02018132783의 도면 21 참조) 일반적으로 인간 HLA 클래스 II 분자 HLA-DR, DP 및 대부분의 DQ 항원에 결합하는 상업적인 항체에 기반한 웨스턴 블롯 또는 FACS 분석을 사용하여 수행된다.
- [0679] HLA I 및 II(또는 MHC 클래스 I 분자 및 클래스 II 분자)의 감소 외에도, 본원에 제공된 저면역원성 세포는 대식세포 식세포작용 및 NK 세포 사멸에 대한 감소된 감수성을 갖는다. 생성된 저면역원성 세포는 하나 이상의

CD24 이식유전자의 발현으로 인해 면역 대식세포 및 선천성 경로를 "피한다".

[0680] F. 조작된 1차 세포를 생성하는 방법

[0681] 유전자 편집에 의해 세포에서 유전자의 발현을 변형시킴으로써 세포를 변형시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 변형시키는 것과 관련하여 움직이면서 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포를 세포에서 유전자 발현을 변형시키기 위한 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포를 움직이게 하는 것(예를 들어 진탕 또는 파동 움직임)은 세포의 변형 효율을 향상시키거나 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 세포의 변형을 촉진하거나 향상시키는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 내인성 유전자를 불활성화하거나 결실시키는 유전자 파괴에 의해서와 같이 유전자의 발현을 감소시킬 수 있고/있거나, 세포에서 유전자를 과발현하는 것과 같이 유전자의 발현을 증가시키는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 CD47과 같은 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0682] 일부 구현예에서, 세포 집단의 변형 방법이 본원에 제공되며, 여기서 방법은 i) 세포 집단을 하나 이상의 시약과 접촉시켜 집단의 세포에서 유전자 발현을 변형시키는 단계; 및 ii) 세포를 움직이게 하지 않는, 예를 들어 세포를 정적 조건 하에 인큐베이션하는 것과 유사한 방법과 비교하여, 하나 이상의 시약과 접촉시킨 후 세포 집단을 움직이게 하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 집단에서 세포의 변형을 향상시키거나 촉진한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 움직이게 하지 않는, 예를 들어 세포를 정적 조건 하에 인큐베이션하는 것과 유사한 방법과 비교하여 집단에서 세포의 생존력을 증가시킨다.

[0683] 일부 구현예에서, 조작될 세포는 본원에 기재된, 예컨대 섹션 II. C에 기재된 바와 같은 세포일 수 있다.

[0684] 일부 구현예에서, 세포 집단은 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 간세포, 신경교 전구 세포, 도파민성 뉴런, 망막 색소 상피 세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경교 전구 세포, 신경 세포, 심장 세포, 및 혈액 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 1차 세포이다.

[0685] 일부 구현예에서, 세포 집단은 줄기 세포로부터 유래된 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 줄기 세포(PSC), 유도 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 생식계열 줄기 세포, 폐 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 및 다분화성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 유도 다능성 줄기 세포, 간엽 줄기 세포(MSC), 조혈 줄기 세포(HSC), 또는 배아 줄기 세포(ESC)이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 줄기 세포, 또는 이의 선조체로부터 분화된 세포이며, 여기서 분화된 세포는 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T(NKT) 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 간세포, 신경교 전구 세포, 도파민성 뉴런, 망막 색소 상피 세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경교 전구 세포, 신경 세포, 심장 세포, 또는 혈액 세포이다.

[0686] 일부 구현예에서, 많은 기존 유전자 편집 및 세포 조작 방법은 전적으로 정적 배양에서 수행되며, 일부 측면에서 이는 세포에 대한 추가 스트레스를 감소시키는 것으로 여겨진다. 그러나, 관찰은 이러한 방법이 항상 이상적인 것은 아닐 수 있음을 나타낸다. 일부 측면에서, 세포가 생체 내에 존재하는 방식과 보다 밀접하게 일치하는 방식으로 세포를 인큐베이션하거나 배양하는 것은 유전자 편집 방법에 의해서와 같이 세포 변형의 효율을 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 세포 생존력 및/또는 변형 또는 유전자 편집 효율의 개선은 세포를 움직이게 하면서 현탁액(예를 들어 비부착) 조건에서 세포를 배양하거나 인큐베이션함으로써 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포를 접촉시켜 움직이게 하는 것은 세포간 접촉 및 세포의 생존력 및 적합성을 향상시키는 3-D 클러스터의 형성 및 세포의 유전자 변형 효율의 전반적인 증가를 제공하는 세포 응집체를 생성할 수 있다.

[0687] 일부 구현예에서, 세포 집단은 생체 내에서 3D 네트워크에 자연적으로 존재하는 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포 집단이 현탁되도록 수행된다. 일부 구현예에서, 세포가 배양물 또는 응집체에 자연적으로 존재하는 경우, 접촉시키기 전에 부착 배양물 또는 세포 클러스터로부터 세포를 해리시킴으로써 세포의 현탁액이 생성될 수 있다.

[0688] 일부 구현예에서, 세포 집단은 낮은 부착 표면을 갖는 용기에 있다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 비부착 배양 용기에 있다. 일부 구현예에서, 낮은 부착 표면을 갖는 용기(예를 들어 비부착 배양 용기)와 같은 용기는 세포 부착이 예컨대 일정 기간 동안 감소되거나 제한되는 배양 용기를 포함한다. 비부착 배양 용기는 낮은 부착 또는

매우 낮은 부착 표면을 함유할 수 있으며, 예컨대 하이드로겔(예를 들어 중성으로 하전 및/또는 친수성 하이드로겔) 및/또는 계면활성제(예를 들어 플루론산)와 같은 세포 부착을 방지하는 물질로 표면을 처리함으로써 달성될 수 있다. 비부착 배양 용기는 둥글거나 오목한 웰, 및/또는 마이크로웰(예를 들어 AggreWellTM)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 비부착 배양 용기는 AggreWellTM 플레이트이다. 비부착 배양 용기의 경우, 배양 용기로부터 세포를 제거하기 위한 효소의 사용이 필요하지 않을 수 있다.

[0689] 일부 구현예에서, 비부착 배양 용기는 세포 부착을 억제하거나 감소시키는 것과 같이 낮거나 매우 낮은 부착 표면을 갖는 배양 용기이다. 일부 구현예에서, 비부착 배양 용기에서 세포를 배양하는 것은 배양물의 모든 세포가 배양된 용기의 표면에 부착하는 것을 방지하지 않는다.

[0690] 일부 구현예에서, 비부착 배양 용기는 매우 낮은 부착 표면을 갖는 배양 용기이다. 일부 측면에서, 매우 낮은 부착 표면은 일정 기간 동안 세포 부착을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, 매우 낮은 부착 표면은 부착 표면 상에서 동일한 세포 유형의 합류 성장을 수득하는 데 필요한 기간 동안 세포 부착을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서, 매우 낮은 부착 표면은 하이드로겔 층(예를 들어, 중성으로 하전 및/또는 친수성 하이드로겔 층)과 같이 세포 부착을 방지하는 물질로 코팅되거나 처리된다. 일부 구현예에서, 비부착 배양 용기는 첫번째 인큐베이션 전에 계면활성제로 코팅되거나 처리된다. 일부 구현예에서, 계면활성제는 플루론산이다.

[0691] 일부 구현예에서, 용기는 플레이트, 접시, 플라스크, 생물반응기 또는 백이다. 일부 구현예에서, 용기는 다중-웰 플레이트와 같은 플레이트이다. 일부 구현예에서, 용기는 6-웰, 24-웰 플레이트, 48-웰 플레이트 또는 96-웰 플레이트이다. 일부 구현예에서, 배양 용기는 6-웰 플레이트이다. 일부 구현예에서, 다중-웰 플레이트의 웰은 마이크로-웰을 추가로 포함한다. 임의의 제공된 구현예 중 일부에서, 다중-웰 플레이트와 같은 용기는 둥글거나 오목한 웰 및/또는 마이크로웰을 갖는다. 임의의 제공된 구현예에서, 다중-웰 플레이트와 같은 용기는 모서리 또는 이음새가 없다.

[0692] 일부 구현예에서, 용기는 세포 응집체의 3차원 형성을 허용한다. 일부 구현예에서, 세포는 다중-웰 플레이트와 같은 용기에서 배양되고, 움직이게 되어 세포 응집체 또는 클러스터를 생성한다. 일부 구현예에서, 세포를 움직이게 하는 것은 응집체 형성을 촉진한다. 일부 구현예에서, 세포를 움직이게 하는 것은 세포 클러스터를 형성한다.

[0693] 일부 구현예에서, 세포 집단은 생존력을 유지하는 조건 하에 배양된다. 세포 배양 및 생존력에 필요한 환경을 제공하기 위해 적절한 온도, CO₂ 및 산소 조건을 선택하는 것은 숙련자의 수준 내에 있다. 일부 구현예에서, 배지 부피는 세포로의 산소 전달에 대한 확산 장벽을 줄이기 위해 최소화되거나 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 세포를 덮기에 충분한 최소 부피의 배지로 용기에서 유지된다. 세포 배양 및 생존력을 뒷받침하기 위한 배지의 적절한 부피를 결정하는 것은 숙련자의 수준 내에 있다. 예로서, 6-웰 플레이트의 표준 작업 부피는 3.0 mL 내지 5.0 mL이지만, 부피는 세포를 충분히 덮고 세포의 성장을 뒷받침하기 위한 적절한 배양물을 제공하기 위해 1 mL 내지 2 mL 또는 약 1 mL 내지 2 mL로 감소될 수 있다. 일부 경우에, 더 많은 배지를 사용하는 것은 환경의 중간 심층(medium depth) 및 정적 특성을 증가시킬 수 있고, 세포로의 산소 확산이 느려질 수 있으며, 이는 이상적이지 않을 수 있다.

[0694] 일부 구현예에서, 방법은 적어도 정적 조건 하에 수행되는 배양의 기간 또는 일부를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 세포는 움직이게 되지 않지만 움직이거나 고정된 채로 유지된다. 일부 구현예에서, 세포는 변형 또는 유전자 편집을 위한 하나 이상의 시약과 접촉하는 동안 그리고 세포가 움직이게 되기 전에 정적 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는 세포를 움직이게 한 후에 정적 조건 하에 인큐베이션될 수 있다.

[0695] 일부 구현예에서, 하나 이상의 시약은 적어도 2개의 상이한 시약을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 상이한 시약은 각각 상이한 유전자의 발현을 조절하기 위한 것이다. 일부 경우에, 적어도 첫번째 하나 이상의 시약은 기재된 바와 같이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 시약일 수 있고, 적어도 두번째 하나 이상의 시약은 하나 이상의 관용원성 인자, 예를 들어 CD47의 발현을 증가시키기 위한 시약일 수 있다. 일부 구현예에서, 방법의 단계는 반복될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법의 첫번째 반복에서 하나 이상의 시약 방법의 반복된 반복에서 하나 이상의 시약과 상이하다.

[0696] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 또한 유전자 편집과 같은 원하는 변형을 갖는 세포를 선택하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형이 있는 세포를 선택하는 방법은 원하는 세포의 양성 또는 음성 선택에 의해서와 같이 유세포 분석법에 의해 이루어질 수 있다.

- [0697] 일부 측면에서, 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법이 본원에 제공된다. 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법은 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 것을 포함하며, 여기서 1차 섬 클러스터는 1차 베타 섬 세포를 포함한다. 그런 다음 현탁액의 1차 베타 섬 세포가 변형된다(예를 들어, 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것 및/또는 세포에서 이중 단백질의 발현을 증가시키기 위해 하나 이상의 변형을 도입하는 것에 의함). 변형된 1차 베타 섬 세포는 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션될 수 있으며, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행된다.
- [0698] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "움직임"은 세포(예를 들어, 변형된 1차 베타 섬 세포)를 움직이는 것을 지칭한다. 예를 들어, 세포는 원형 움직임으로 움직이고/이거나, 좌우로 움직이고/이거나, 위 아래로 움직이고/이거나, 반전될 수 있다. 일부 구현예에서, 움직임은 진탕이다. 일부 구현예에서, 진탕은 궤도 진탕을 포함한다. 일부 구현예에서, 진탕은 양방향 선형 이동을 포함한다. 일부 구현예에서, 진탕은 선형 이동을 포함한다. 움직임은 궤도 진탕기, 왕복 진탕기, 선회 로커, 마이크로플레이트 진탕기, 벤치탑 진탕기, 및/또는 볼텍스와 같으나 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 움직임은 궤도 진탕기를 사용하여 달성된다. 일부 구현예에서, 궤도 진탕기는 Belly Dancer 궤도 진탕기(IBM Scientific)이다. 일부 구현예에서, 움직임은 조작된 1차 세포를 생성하는 방법에서 움직임을 이용하지 않는 방법과 비교하여 유전자 편집 효율을 개선시킨다. 예를 들어, 움직임은 더 나은 유전자 표적화, 개선된 발현 및/또는 유전자 발현 시 개선된 감소, 및/또는 방법에 의해 표적화된 세포의 수 증가를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 움직임은 조작된 1차 세포를 생성하는 방법에서 유전자 편집 효율을 움직임이 이용하지 않는 조작된 1차 세포를 생성하는 방법과 비교하여, 약 0.1-배 초과, 예컨대 약 0.2-배, 0.3-배, 0.4-배, 0.5-배, 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배, 또는 그 이상 중 임의의 것보다 더 크게 개선시킨다. 일부 구현예에서, 움직임은 조작된 1차 세포를 생성하는 방법에서 유전자 편집 효율을 약 0.1-배 내지 약 100-배, 예컨대 약 0.1-배 내지 약 10-배, 약 0.5-배 내지 약 50-배, 및 약 10-배 내지 약 100-배 개선시킨다.
- [0699] 일부 구현예에서, 세포를 움직이게 함으로써, 세포를 유전자 편집을 위한 하나 이상의 시약과 접촉시키는 데 필요한 시간이 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형 또는 유전자 편집을 위한 하나 이상의 시약과 접촉시키는 것은 세포를 움직이게 하기 전에 2일 미만 동안이다. 일부 구현예에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 30초 내지 24시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24 시간, 또는 약 1분, 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24 시간, 또는 임의의 전술한 값 사이의 임의의 값 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 1분 내지 60분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 2분 내지 30분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 세포를 움직이게 하기 전에 5분 내지 15분 동안 수행된다.
- [0700] 일부 구현예에서, 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 i) 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; ii) 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시키는 단계; 및 iii) 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차 베타 섬 세포를 배양시키되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 1차 섬 클러스터는 인간 1차 섬 클러스터이다. 일부 구현예에서, 1차 섬 클러스터는 인간 1차 사체 섬 클러스터이다. 일부 구현예에서, 1차 세포는 1차 베타 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 현탁액은 단일 세포 현탁액이다.
- [0701] 본원에 제공된 1차 섬 세포를 유전자 편집하기 위한 방법은 하나 이상의 해리 단계(예를 들어, 1차 섬 클러스터를 1차 세포의 현탁액으로 해리) 및 하나 이상의 재클러스터링 단계(예를 들어, 1차 세포를 섬으로 재클러스터링하는 조건 하에 변형된 1차 세포를 인큐베이션)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법은 약 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 해리 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법은 약 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 재클러스터링 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재클러스터링 단계 각각은 하나 이상의 해리 단계 각각 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법은 해리 단계와 재클러스터링 단계를 수행하는 사이의 기간을 포함한다. 일부 구현예에서, 해리 단계와 재클러스터링 단계를 수행하는 사이의 기간은 약 1분 내지 약 10일, 예컨대 약 1분(min) 내지 약 10시간(h), 약 5시간 내지 약 24시간, 및 약 24시간 내지 약 10일이다. 일부 구현예에서, 해리 단계와 재클러스터링 단계를 수행하는 사이의 기간은 약 1분 초과, 예컨대 약 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 10시간, 24시간, 48시간, 5일, 10일, 또는 그 이상 중 임의의 것보다 더 크다. 일부 구현예에서, 해리 단계와 재클러스터링 단계를 수행하는 사이의 기간은 약 10일 미만, 예컨대 약 5일, 48시간, 24시간, 10시간, 5시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 30분, 10분, 5분, 또는 그 이하보다 적다.

[0702] 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬으로 재클러스터링하는 조건 하에 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션 하는 것은 적어도 1 회 수행된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션 하는 것은 간헐적으로 수행되며, 여기서 각 인큐베이션 단계는 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시킨 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션 하는 것은 2 회 수행되며, 여기서 첫번째 인큐베이션 단계는 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자 발현을 감소시키기 위해 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시킨 후에 수행되고, 여기서 두번째 인큐베이션 단계는 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키기 위해 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시킨 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션 하는 것은 2 회 수행되며, 여기서 첫번째 인큐베이션 단계는 세포에서 인간 B2M 유전자 및 인간 CIITA 유전자의 발현을 감소시키기 위해 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시킨 후에 수행되고, 여기서 두번째 인큐베이션 단계는 세포 내 CD47의 발현을 증가시키기 위해 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시킨 후에 수행된다.

[0703] 일부 구현예에서, 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계는 세포 해리 용액에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 1분(min) 내지 약 20분, 예컨대 약 1분 내지 약 5분, 약 3분 내지 약 10분, 약 8분 내지 약 15분, 및 약 12분 내지 약 20분 동안 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 1분 초과, 예컨대 약 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과 동안 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 20분 미만, 예컨대 약 15분, 10분, 9분, 8분, 7분, 6분, 5분, 4분, 3분, 2분, 1분, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만 동안 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 10분 동안 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 30℃ 내지 약 40℃, 예컨대 약 30℃ 내지 약 35℃, 약 33℃ 내지 약 38℃, 및 약 35℃ 내지 약 40℃의 온도에서 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 30℃ 초과, 예컨대 약 31℃, 32℃, 33℃, 34℃, 35℃, 36℃, 37℃, 38℃, 39℃, 40℃, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과 온도에서 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 40℃ 미만, 예컨대 약 39℃, 38℃, 37℃, 36℃, 35℃, 34℃, 33℃, 32℃, 31℃, 30℃, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만의 온도에서 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 37℃의 온도에서 1차 섬 클러스터에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 약 10분 동안 약 37℃의 온도에서 1차 섬 클러스터에 적용된다. 세포 해리 용액은 단백질분해 및 콜라겐분해 효소의 용액을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 ACCUMAX™ 세포 분리 용액이다.

[0704] 일부 구현예에서, 1차 베타 섬 세포의 해리된 현탁액은 변형된다. 일부 구현예에서, 변형은 유전자 조작을 포함한다. 일부 구현예에서, 현탁 1차 베타 섬 세포는 1차 섬 클러스터로부터 해리된 후에 변형된다. 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 B2M의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 CIITA의 발현을 감소시키는 변형이다.

[0705] 일부 구현예에서, 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것은 유전자-편집 시스템을 세포 내로 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 유전자-편집 시스템은 서열 특이적 뉴클레아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자-편집 시스템은 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함한다. 일부 구현예에서, 서열 특이적 뉴클레아제는 RNA-가이드 DNA 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드-뉴클레아제는 유형 II 또는 유형 V Cas 단백질이다. 일부 구현예에서, RNA-가이드-뉴클레아제는 Cas9 동족체 또는 Cpf1 동족체이다.

[0706] 일부 구현예에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제 및 인간 B2M 유전자를 표적화하는 단일 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 B2M 유전자를 표적화하는 단일 gRNA는 CGUGAGUAAACUGAAUCUU(서열번호: 33)의

핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제 및 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA는 CGAUUUGGCAUAAGCCUCCC(서열번호: 34)의 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 B2M 유전자를 표적화하는 단일 gRNA는 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA 전에 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA는 인간 B2M 유전자를 표적화하는 단일 gRNA 전에 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 인간 B2M 유전자를 표적화하는 단일 gRNA는 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA와 동시에 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 변형을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형은 전기천공법에 의해 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 Cas9 효소 및 인간 B2M 유전자를 표적화하는 단일 gRNA를 함유하는 리보핵단백질 복합체로 전기천공된다. 일부 구현예에서, 세포는 Cas9 효소 및 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA를 함유하는 리보핵단백질 복합체로 전기천공된다.

[0707] 일부 구현예에서, 변형은 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위해 하나 이상의 변형을 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, 및 SERPINB9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나는 CD47이다.

[0708] 일부 구현예에서, 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키는 것은 외인성 폴리뉴클레오티드에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 멀티시스트로닉 벡터이다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 통합은 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어진다.

[0709] 일부 구현예에서, 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키는 것은 세포를 CAG 프로모터의 제어 하에 CD47 및 루시퍼라제를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입함으로써 이루어진다. 일부 구현예에서, 세포는 프로타민 술페이트의 존재 하에 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터로의 형질도입은 원심분리(예를 들어, "스핀펙션(spinflection)")을 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 15분 동안 약 300 x g로 프로타민 술페이트의 존재 하에 렌티바이러스 벡터의 존재 하에 원심분리된다.

[0710] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 1차 세포를 유전자 편집하는 방법은 변형된 섬을 선택하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 선택된 변형된 섬은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자(예를 들어, 인간 B2M 유전자 및/또는 인간 CIITA 유전자)의 발현을 감소시키도록 변형되었다. 일부 구현예에서, 선택된 변형된 섬은 세포 내 하나 이상의 이종 단백질(예를 들어, CD47)의 발현을 증가시키도록 변형되었다. 일부 구현예에서, 선택된 변형된 섬은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키고 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키도록 변형되었다. 일부 구현예에서, 선택은 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다. 일부 구현예에서, FACS는 BD FACSAria™ III 세포 분류기의 사용을 포함한다.

[0711] 일부 구현예에서, 변형된 섬은 본원에 기재된 임의의 세포 해리 용액과 같은 세포 해리 용액을 사용하여 FACS용 단일 1차 섬 세포로 해리된다. 일부 구현예에서, 세포 해리 용액은 ACCUMAX™ 세포 분리 용액이다. 일부 구현예에서, 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키도록 변형된 1차 베타 섬 세포는 항-HLA-A,B,C 항체 또는 IgG1 이소형 일치 대조군 항체, 및 항-HLA-DR,DP,DQ 항체 또는 IgG2a 이소형 일치 대조군 항체를 함유하는 세포 해리 용액을 사용하기 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 이종 음성 1차 섬 세포는 FACS를 사용하여 분류된다. 일부 구현예에서, 분류된 이종 음성 1차 섬 세포는 인큐베이션을 사용하여 재클러스터링하기 위해 재플레이팅된다. 일부 구현예에서, 세포에서 내인성 단백질(예를 들어, 인간 B2M 유전자 및 인간 CIITA 유전자)을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키고 세포 내 하나 이상의 이종 단백

질의 발현을 증가시키기 위해 변형된 1차 베타 섬 세포는 항-CD47 항체 또는 IgG1 이소형 일치 대조군 항체를 함유하는 세포 해리 용액을 사용하여 선택된다. 일부 구현예에서, 변형된 섬 세포는 이들이 이소형 대조군과 비교하여 (예를 들어, CD47)과 비교하여 세포 내 하나 이상의 이중 단백질의 발현에서 적어도 약 20-배 증가, 예컨대 발현에서 적어도 약 21-배, 22-배, 23-배, 24-배, 25-배, 또는 그 이상 증가하는 경우 선택된다. 일부 구현예에서, CD47에 양성인 분류된 이중 음성 1차 섬 세포는 인큐베이션을 사용하여 재클러스터링하기 위해 재플레이트링된다.

[0712] 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬에 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 1차 베타 섬 세포의 변형 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 인간 섬 세포 배양 배지에서 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 섬 세포 배양 배지는 PIM(S) 배지(Prodo)이다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 움직이면서 인큐베이션 및 정적 조건 하에 인큐베이션을 포함한다.

[0713] 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 30분 내지 약 2시간(h), 예컨대 약 30분 내지 약 1시간, 약 45분 내지 약 1.5시간, 및 약 1시간 내지 약 2시간 동안 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 30분 초과, 예컨대 약 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 1시간, 1.25시간, 1.5시간, 1.75시간, 2시간, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과 동안 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 2시간 미만, 예컨대 약 1.75시간, 1.5시간, 1.25시간, 1시간, 55분, 50분, 45분, 40분, 35분, 30분, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만 동안 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 1시간 동안 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 30°C 내지 약 40°C, 예컨대 약 30°C 내지 약 35°C, 약 33°C 내지 약 38°C, 및 약 35°C 내지 약 40°C의 온도에서 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 30°C 초과, 예컨대 약 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과 온도에서 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 40°C 미만, 예컨대 약 39°C, 38°C, 37°C, 36°C, 35°C, 34°C, 33°C, 32°C, 31°C, 30°C, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만의 온도에서 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 1시간 동안 약 37°C의 온도에서 정적으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 정적 인큐베이션은 약 2% 내지 약 8% CO₂, 예컨대 약 2% 내지 약 4% CO₂, 약 3% 내지 약 6% CO₂, 및 약 5% 내지 약 8% CO₂에서 수행된다. 일부 구현예에서, 정적 인큐베이션은 약 2% CO₂ 초과, 예컨대 약 3% CO₂, 4% CO₂, 5% CO₂, 6% CO₂, 7% CO₂, 8% CO₂, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과에서 수행된다. 일부 구현예에서, 정적 인큐베이션은 약 8% CO₂ 미만, 예컨대 약 7% CO₂, 6% CO₂, 5% CO₂, 4% CO₂, 3% CO₂, 2% CO₂, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만에서 수행된다. 일부 구현예에서, 정적 인큐베이션은 약 5% CO₂에서 수행된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 약 5% CO₂에서 약 1시간 동안 약 37°C에서 정적으로 인큐베이션된다

[0714] 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 정적 인큐베이션(예를 들어, 약 5% CO₂에서 약 1시간 동안 약 37°C에서 정적 인큐베이션) 후에 움직이면서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 변형된 1차 베타 섬 세포를 섬에 재클러스터링하는 것을 허용한다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 24시간 내지 약 96시간, 예컨대 약 24시간 내지 약 48시간, 약 48시간 내지 약 72시간, 및 약 28시간 내지 약 96시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 24시간 초과, 예컨대 약 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 96시간 미만, 예컨대 약 84시간, 72시간, 60시간, 28시간, 36시간, 24시간, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 72시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 48시간 동안 수행되고, 이어서 완전한 배지 교환이 수행되고, 이어서 추가 24시간의 움직임 인큐베이션이 수행된다. 일부 구현예에서, 변형된 1차 베타 섬 세포는 인간 1차 섬 세포 재클러스터링을 위해 Belly Dancer 궤도 진탕기(ABI Scientific, 아이오와주 더뷰크 소재)에서 움직이면서 인큐베이션된다.

[0715] 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 1의 분 당 회전(RPM) 내지 약 200 RPM, 예컨대 약 1 RPM 내지 약 25 RPM, 약 15 RPM 내지 약 50 RPM, 약 30 RPM 내지 약 75 RPM, 및 약 50 RPM 내지 약 200 RPM, 및 약 85 RPM 내지 약 95 RPM의 속도로 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 1 RPM 초과, 예컨대 약 5 RPM, 10 RPM, 20 RPM, 30 RPM, 40 RPM, 50 RPM, 60 RPM, 70 RPM, 80 RPM, 90 RPM, 100 RPM, 125 RPM, 150 RPM, 175

RPM, 200 RPM, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과로 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 200 RPM 미만, 예컨대 약 175 RPM, 150 RPM, 125 RPM, 100 RPM, 90 RPM, 80 RPM, 70 RPM, 60 RPM, 50 RPM, 40 RPM, 30 RPM, 20 RPM, 10 RPM, 5 RPM, 1 RPM, 또는 그 이하 중 임의의 것 미만의 속도로 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 85 RPM 내지 약 95 RPM의 속도로 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 0° 내지 약 8°, 예컨대 약 0° 내지 약 4°, 약 2° 내지 약 5°, 및 약 4° 내지 약 8°의 피치로 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 0° 초과, 예컨대 약 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8°, 또는 그 이상 중 임의의 것 초과로 피치로 수행된다. 일부 구현예에서, 움직임 인큐베이션은 약 8° 미만, 예컨대 약 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2°, 1°, 또는 그 이하 중 임의의 것 초과로 피치로 수행된다.

[0716] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법의 단계 i)-iii)은 반복된다. 일부 구현예에서, 방법의 첫번째 반복에서의 변형은 방법의 반복된 반복에서의 변형과 상이하다. 일부 구현예에서, 방법의 첫번째 반복에서의 변형은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것, 예를 들어, 인간 B2M 유전자 및/또는 인간 CIITA 유전자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것)을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법의 반복된 반복에서의 변형은 세포 내 하나 이상의 이중 단백질(예를 들어, 하나 이상의 관용원성 인자, 예를 들어, CD47)의 발현을 증가시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다.

[0717] 일부 구현예에서, 변형은 재클러스터링된 섬 세포가 첫번째 변형으로 조작된 첫번째 변형된 섬인 첫번째 변형이며 여기서 방법은 iv) 첫번째 변형된 섬을 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계; v) 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 두번째 변형으로 추가로 변형시키는 단계; 및 vi) 두번째 변형을 포함하는 두번째 변형된 섬을 재클러스터링하기 위한 조건 하에 추가 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 첫번째 변형에서의 변형은 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것, 예를 들어, 인간 B2M 유전자 및/또는 인간 CIITA 유전자의 발현을 감소시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것)을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 변형은 세포 내 하나 이상의 이중 단백질(예를 들어, 하나 이상의 관용원성 인자, 예를 들어, CD47)의 발현을 증가시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 1차 세포를 유전자 편집하는 방법은 첫번째 변형된 섬을 선택하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 선택은 FACS를 포함한다.

[0718] 일부 구현예에서, 두번째 변형된 섬은 이식에 사용된다. 일부 구현예에서, 두번째 변형된 섬은 대상체에서 본원에 기재된 임의의 질환 또는 병태와 같은 질환 또는 병태를 치료하는 데 사용된다.

[0719] **III. 조작된 세포 집단 및 약제학적 조성물**

[0720] 조작된 1차 세포와 같은 복수의 제공된 조작된 세포를 함유하는 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 집단이 본원에 제공된다. 일부 경우에, 세포 집단은 세포의 혼합물을 포함한다. 일부 경우에, 집단 내 세포의 적어도 약 30%는 본원에 기재된 변형 세트를 포함한다. 일부 경우에, 세포 집단은 하나 이상의 상이한 세포 유형을 포함한다.

[0721] 일부 구현예에서, 집단은 섬 세포의 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단은 췌장 베타 세포, 췌장 알파 세포, 및 췌장 감마 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상의 상이한 세포 유형을 포함하는 췌장 섬 세포의 혼합물을 포함한다. 일부 경우에, 집단은 췌장 알파, 베타, 및 감마 세포를 포함한다. 일부 경우에, 집단은 1차 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 집단은 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 분화된 세포(예를 들어, 유도 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 생식계열 줄기 세포, 폐 줄기 세포, 체대혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포(PSC), 및 다분화성 줄기 세포로부터 분화된 세포)를 포함한다.

[0722] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단은 하나 초과로 공여자 대상체로부터 풀링된 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 하나 초과로 공여자 대상체 각각은 건강한 대상체이거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 수득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1

차 세포 집단은 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)로부터 선택된다.

[0723] 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99% 중 임의의 것은 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 비변경된 세포에 비해 상대적인 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99% 중 임의의 것은 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 비변경된 세포에 비해 B2M 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 집단의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99% 중 임의의 것은 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 비변경된 세포에 비해 B2M 및 CIITA의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99% 중 임의의 것은 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 비변경된 세포에 비해 B2M 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99% 중 임의의 것은 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 비변형 또는 비변경된 세포에 비해 CIITA 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0724] 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 내인성 B2M 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 내인성 CIITA 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0725] 또한 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 또한 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 집단을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 추가로 포함한다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메트늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레솔); 저분자량(약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 포도당, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온 예컨대 나트륨; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제 예컨대 폴리소르베이트(TWEEN™), 플록사머(PLURONICS™) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 완충액(예를 들어, 중성 완충 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수)을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 예를 들어, 조성물의 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 등장도, 냄새, 무균성, 안정성, 해리 또는 방출 속도, 흡착, 또는 침투를 변형시키거나, 유지하거나, 보존하기 위해 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 당업자는 세포를 함유하는 약제학적 조성물이 단백질을 함유하는 약제학적 조성물과 상이할 수 있음을 이해한다.

[0726] 용어 "약제학적 제형"은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 그러한 형태이고, 제형이 투여될 대상체에게 허용될 수 없게 독성인 추가적 구성요소를 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0727] "약제학적으로 허용되는 담체"는 대상체에게 무독성인 활성 성분 이외의 약제학적 제형 내 성분을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제, 또는 방부제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0728] 일부 구현예에서 약제학적 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같이 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는 데 효과적인 양으로 본원에 기재된 바와 같은 1차 세포와 같은 조작된 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같은 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는 데 효과적인 양으로 본원에 기재된 바와 같은 조작된 1차 세포를 함유한다. 일부 구현예에서 치료적 또는 예방적 효능은 치료되는 대상체의 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 며칠 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우, 병태에 따라, 질환 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 치료가 반복된다. 그러나, 다른 투여량 레지멘이 유용할 수 있고

결정될 수 있다. 원하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

- [0729] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 1차 세포는 표준 투여 기술, 제형, 및/또는 장치를 사용하여 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 1차 세포는 표준 투여 기술, 제형, 및/또는 장치를 사용하여 투여된다. 조성물의 저장 및 투여를 위한 제형 및 장치, 예컨대 주사기 및 바이알이 제공된다. 조작된 1차 세포는 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥내 주사, 또는 비경구 투여를 포함한 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물(예를 들어, 조작된 1차 세포를 함유하는 약제학적 조성물)이 투여되는 경우, 일반적으로 단위 투여량 주사가능 형태(용액, 현탁액, 에멀전)로 제형화될 것이다.
- [0730] 제형은 정맥내, 복강내, 또는 피하, 투여를 위한 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질, 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 정맥내, 복강내, 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에게 투여된다.
- [0731] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 또는 분산액으로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 액체 조성물은 담체를 포함할 수 있으며, 이는 예를 들어, 물, 식염수, 포스페이트 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 멸균 주사용 용액은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 포도당, 텍스트로스 등과의 혼합과 같이 세포를 용매에 혼입함으로써 제조될 수 있다.
- [0732] 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 담체는 약제학적 투여와 양립할 수 있는 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항바이러스제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함할 수 있다(Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, 펜실베이니아주 필라델피아 소재). 이러한 담체 또는 희석제의 예는 물, 식염수 링거 용액(Ringer's solution), 텍스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 리포솜 및 고정 오일과 같은 비수성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 혼입될 수 있다. 약제학적 담체는 식염수 용액, 텍스트로스 용액 또는 인간 혈청 알부민을 포함하는 용액과 같이 조작된 1차 세포에 적합한 것이어야 한다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물을 위한 약제학적으로 허용되는 담체 또는 비히클은 조작된 1차 세포가 살아있는 세포의 투여를 허용하기에 충분한 시간 동안 유지되거나 생존가능한 채 유지될 수 있는 임의의 무독성 수용액이다. 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 비히클은 식염수 용액 또는 완충된 식염수 용액일 수 있다.
- [0733] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물을 포함하는 조성물은 멸균된다. 일부 구현예에서, 세포의 단리, 풍부화, 또는 배양은 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 예를 들어 밀폐 또는 멸균 환경에서 예를 들면 멸균 배양 백에서 수행된다. 일부 구현예에서, 멸균성은 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양은 기체 투과성 배양 용기를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 배양은 생물반응기를 사용하여 수행된다.
- [0734] 또한 제공된 조작된 1차 세포를 동결보존하기에 적합한 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 제공되는 조작된 1차 세포는 동결보존 배지에서 동결보존된다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 무혈청 동결보존 배지이다. 일부 구현예에서, 조성물은 동결보호제를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결보호제는 DMSO 및/또는 글리세롤이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 5% 내지 10% DMSO(v/v) 또는 약 5% 내지 약 10% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 5% DMSO(v/v) 또는 약 5% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 6% DMSO(v/v) 또는 약 6% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 7% DMSO(v/v) 또는 약 7% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 7.5% DMSO(v/v) 또는 약 7.5% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 8% DMSO(v/v) 또는 약 8% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 9% DMSO(v/v) 또는 약 9% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 10% DMSO(v/v) 또는 약 10% DMSO(v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 상업적으로 입수가 가능한 동결보존 용액(CryoStor™ CS10)을 함유한다. CryoStor™ CS10은 10% 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 함유하는 동결보존 배지이다. 일부 구현예에서, 동결보존을 위해 제형화된 조성물은 저온, 예컨대 초저온에서 저장될 수 있으며, 예를 들어, -40°C 내지 -150°C, 예컨대 또는 약 80°C ± 6.0°C 범위의 온도로 저장될 수 있다.
- [0735] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 조작된 1차 세포 및 31.25 %(v/v) Plasma-Lyte A, 31.25 %(v/v)의 5% 텍스트로스/0.45% 염화나트륨, 10% 텍스트란 40(LMD)/5% 텍스트로스, 20%(v/v)의 25% 인간 혈청

알부민(HSA), 및 7.5%(v/v) 디메틸설폭사이드(DMSO)를 포함하는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0736] 일부 구현예에서, 동결보존되는 조작된 1차 세포는 해동에 의해 투여를 위해 제조된다. 일부 경우에, 조작된 1차 세포는 해동 직후에 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 구현예에서, 조성물은 임의의 추가 처리 없이 사용할 준비가 된다. 다른 경우에, 조작된 1차 세포는 약제학적으로 허용되는 담체로 재현탁하거나, 인큐베이션 활성화제 또는 자극제와 함께 인큐베이션하는 것과 같이 해동 후 추가로 처리되거나, 활성화되고 세척되고 대상체에게 투여하기 전에 약제학적으로 허용되는 완충액에 재현탁된다.

[0737] **IV. 키트, 구성요소, 및 제조품**

[0738] 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법, 장치, 및 시스템의 키트 구성요소, 및 조성물(예컨대 소모품)이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 키트는 본원의 개시내용에 따른 사용 지침을 포함한다.

[0739] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 1차 세포 집단을 포함하는 키트 또는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 복수의 조작된 1차 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하는 키트 또는 조합이 본원에 제공되며, 여기서 조작된 1차 세포는 (i) CD47의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현을 감소시키는 변형을 포함하며, 여기서 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적이다. 일부 구현예에서, 키트의 구성요소는 동시에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 키트의 구성요소는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0740] 본 발명의 일부 구현예에서, 세포 요법을 포함하는 임상 이식 요법에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 일부 구현예에서, 제조품은 당뇨병(예를 들어, 제I형 당뇨병), 혈관 병태 또는 질환, 자가면역 갑상선염, 간 질환(예를 들어, 간경변), 각막 질환(예를 들어, 폭스 이영양증 또는 선천성 유전성 각막 내피 이영양증), 신장 질환, 및 암(예를 들어, B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암)과 같으나 이에 제한되지 않는 세포 결핍증의 치료에 유용한 물질을 함유한다. 제조품은 용기 및 용기 상에 또는 이와 연관된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 등(예를 들어, 유리 또는 플라스틱 용기)을 포함하며 일반적으로, 용기는 동종이계 세포 요법에 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알일 수 있음). 약제학적 조성물의 적어도 구성요소는 본원에 제공된 임의의 조작된 1차 세포와 같은 조작된 1차 세포 집단이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 특정 병태를 치료하는 데 사용된다는 것을 나타낸다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 약제학적 조성물을 환자에게 투여하기 위한 지침을 추가로 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 제조품은 조합 치료를 포함한다.

[0741] 제조품 및/또는 키트는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 삽입물은 이러한 치료 제품의 사용과 관련된 적응증, 사용량, 투여량, 투여, 금기사항 및/또는 경고에 관한 정보를 함유하는 치료 제품의 상업용 패키징에 관례적으로 포함되는 지침을 지칭한다.

[0742] **V. 치료 방법**

[0743] 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 기재된 조작된 세포 집단을 포함하는 제공된 세포 조성물에 관한 조성물 및 방법이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 조작된 세포 집단을 투여함으로써 환자를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 조작된 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 여기에 기재된 임의의 것과 같은 약제학적 조성물로 투여하기 위해 제형화된다. 이러한 방법 및 용도는 예를 들어, 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물을 질환, 병태, 또는 장애가 있는 대상체에게 투여하는 것을 수반하는 치료 방법 및 용도를 포함한다. 특정 질환 적응증에 대해 본원에 제공된 바와 같은 적절한 조작된 1차 세포를 선택하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 일부 구현예에서, 세포 또는 이의 약제학적 조성물은 질환 또는 장애의 치료에 효과적인 유효량으로 투여된다. 용도는 이러한 방법 및 치료에서, 그리고 이러한 치료 방법을 수행하기 위한 약제의 제조에서 조작된 1차 세포 또는 이의 약제학적 조성물의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 이에 의해 대상체에서 질환, 병태 또는 장애를 치료한다.

[0744] 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 예를 들어, 질환 또는 장애의 치료를 위한 세포 요법에 대한 후보를 포함하는 임의의 적합한 방법으로 투여될 수 있다. 세포 요법에 대한 후보는 대상체 본원에 제공된 조작된 1차 세포의 치료 효과로부터 잠재적으로 이익을 얻을 수 있는 질환 또는 병태가 있는 임의의 환자를 포

함한다. 일부 구현예에서, 환자는 투여된 세포의 동종이계 수용자이다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 1차 세포와 같은 조작된 세포는 동종이계 세포 요법에서 사용하기에 효과적이다. 본원에 제공된 조작된 1차 세포와 같은 대상체 조작 세포의 치료 효과로부터 이익을 얻는 후보는 질환 또는 병태의 제거, 감소 또는 개선을 나타낸다.

[0745] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 생성된 것들을 포함하여 본원에 제공된 바와 같은 조작된 1차 세포는 세포 요법에 사용될 수 있다. 본원에 요약된 치료 세포는 암, 유전적 장애, 만성 감염성 질환, 자가면역 장애, 신경 장애 등과 같으나 이에 제한되지 않는 장애를 치료하는 데 유용하다.

[0746] 일부 구현예에서, 환자는 세포 결핍증이 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "세포 결핍증"은 환자에서 세포 집단의 기능장애 또는 상실을 야기하는 임의의 질환 또는 병태를 지칭하며, 여기서 환자는 세포 집단을 자연적으로 대체하거나 재생할 수 없다. 예시적인 세포 결핍증은 자가면역 질환(예를 들어, 다발성 경화증, 중증근무력증(myasthenia gravis), 류마티스 관절염, 당뇨병, 전신 홍반성 루푸스), 신경퇴행성 질환(예를 들어, 헌팅턴병 및 파킨슨병), 심혈관 병태 및 질환, 혈관 병태 및 질환, 각막 병태 및 질환, 간 병태 및 질환, 갑상선 병태 및 질환, 및 신장 병태 및 질환을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포가 투여된 환자는 암이 있다. 본원에 제공된 조작된 1차 세포에 의해 치료될 수 있는 예시적인 암은 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 암 환자는 본원에 제공된 조작된 CAR T-세포의 투여에 의해 치료된다.

[0747] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 당뇨병과 연관되거나 세포 요법은 당뇨병의 치료를 위한 것이며, 임의적으로 여기서 당뇨병은 제I형 당뇨병이다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단은 베타 섬 세포를 포함하는 섬 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 섬 선조 세포, 미성숙 섬 세포, 및 성숙 섬 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 베타 섬 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 베타 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, 및 (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포는 CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0748] 본원에 기재된 조작된 1차 베타 섬 세포는 대상체에서 내당능을 개선할 수 있다. 내당능은 본원에 기재된 것들과 같은 임의의 적합한 방법(예를 들어, 인슐린 분비 검정)에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포는 포도당 자극 인슐린 분비(GSIS)를 나타낸다. 따라서, 일부 구현예에서, 개선된 내당능은 GSIS 관류 검정으로 측정된다. 당불내성(Glucose intolerance)은 인슐린 저항성과 관련되어 있으며, 당뇨병(예를 들어, 제I형 당뇨병 및 제II형 당뇨병)을 유발할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포, 또는 조작된 1차 베타 섬 세포 집단을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 당뇨병을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 대상체는 당뇨병 환자이다. 일부 구현예에서, 대상체는 제I형 당뇨병이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 제II형 당뇨병이 있다. 구체적으로, 일부 구현예에서, 대상체에서 내당능을 개선하는 방법이 제공되며, 방법은 조작된 1차 베타 섬 세포, 또는 조작된 1차 베타 섬 세포 집단을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 내당능은 섬 세포의 투여 전에 대상체의 내당능에 비해 개선된다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 대상체에서 외인성 인슐린 사용량을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 내당능은 HbA1c 수준에 의해 측정된 바와 같이 개선된다. 일부 구현예에서, 대상체는 공복 상태이다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 대상체에서 인슐린 분비를 개선한다. 일부 구현예에서, 인슐린 분비는 섬 세포의 투여 전에 대상체의 인슐린 분비에 비해 개선된다.

[0749] 조작된 1차 베타 섬 세포는 대상체에서 적응성 면역 반응을 유도하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 적응성 면역 반응은 ELISPOT을 사용하여 평가된다. 예를 들어, 적응성 면역 반응은 CD8+ T 세포에 의한 IFN γ 사이토카인 분비 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포는 야생형 1차 베타 섬 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 IFN γ , 예컨대 야생형 1차 베타 섬 세포에 비해 임의의 약 400-배, 300-배, 200-배, 100-배, 50-배, 25-배, 및 10-배 더 낮은 수준의 IFN γ 를 나타낸다. 일부 구현예에서, 적응성 면역 반응은 유세포 분석법을 사용하여 평가된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 적응성 면역 반응은 공여자 특이적 항체(DSA) IgG 또는 IgM 수준을 측정함으로써 평가된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 베타 섬 세포는 야생형 1차 베타 섬 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 DSA 수준, 예컨대 야생형 1차 베타 섬 세포와 비교하여 임의의 약 2-배, 1.5-배, 및 1-배 더 낮은 수준의 DSA를 나타낸다.

- [0750] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 당뇨병, 암, 혈관신생 장애, 안구 질환, 갑상선 질환, 피부 질환, 및 간 질환이다.
- [0751] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 혈관 병태 또는 질환과 연관되거나 세포 요법은 혈관 병태 또는 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 내피 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 내피 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 내피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0752] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 자가면역 갑상선염과 연관되거나 세포 요법은 자가면역 갑상선염의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 갑상선 선조 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 트리로이드(thyroid) 선조 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 갑상선 선조 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0753] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 간 질환과 연관되거나 세포 요법은 간 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 간 질환은 간경변을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 간세포 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 간 선조 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 간세포 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 간세포 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 간 선조 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 간 선조 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0754] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 각막 질환과 연관되거나 세포 요법은 각막 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 각막 질환은 폭스 이영양증 또는 선천성 유전성 각막 내피 이영양증이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 1차 각막 내피 선조 세포 또는 1차 각막 내피 세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 1차 시각 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 각막 내피 선조 세포 또는 조작된 1차 각막 내피 세포의 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 각막 내피 선조 세포 또는 조작된 1차 각막 내피 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 시각 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 시각 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0755] 일부 구현예에서, 세포 결핍증은 신장 질환과 연관되거나 세포 요법은 신장 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 1차 신장 전구체 세포 또는 1차 신세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 신장 전구체 세포 또는 조작된 1차 신세포의 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 신장 전구체 세포 또는 조작된 1차 신세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.
- [0756] 일부 구현예에서, 세포 요법은 암의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 암은 B 세포 급성 림프구성 백혈병 (B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포암종, 간세포암종, 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 1차 T 세포 또는 1차 NK 세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 1차 T 세포 또는 1차 NK 세포의 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 1차 T 세포 또는 1차 NK 세포는 (i) CD47을 암호

화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0757]

일부 구현예에서, 세포 요법은 조혈 질환 또는 장애의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 조혈 줄기 세포(HSC)이다. HSC는 모든 혈액 세포 유형을 보충하고 자기 재생하는 줄기 세포이다. 조혈 줄기 세포는 특히 조혈 시스템이 고갈된 수용자 마우스의 순환계에 주사되는 경우 골수, T 및 B 세포의 수준을 16주 동안 강력하게 검출가능한 수준(전형적으로 말초 혈액 세포의 1% 초과)으로 유지하는 세포로 정의될 수 있다 (Schroeder(2010) Cell Stem Cell 6:203-207). 일부 구현예에서, 조혈 장애는 혈액 질환, 특히 조혈 세포가 수반되는 질환으로 인해 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 조혈 장애는 단일 유전자의 돌연변이로 인한 것과 같은 단성 조혈 질환이다. 일부 구현예에서, 조혈 장애는 골수이형성증(myelodysplasia), 재생불량성 빈혈(aplastic anemia), 판코니 빈혈(Fanconi anemia), 발작성 야간 혈색뇨(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria), 겸상적혈구병(Sickle cell disease), 다이아몬드 블랙팬 빈혈(Diamond Blackfan anemia), 슈만 다이아몬드 장애(Schachman Diamond disorder), 코스트만 증후군(Kostmann's syndrome), 만성 육아종병(chronic granulomatous disease), 부신백질이영양증(adrenoleukodystrophy), 백혈구 부착 결핍증(leukocyte adhesion deficiency), 혈우병(hemophilia), 지중해빈혈(thalassemia), 베타-지중해빈혈, 백혈병 예컨대 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수형성(골수성) 백혈병(AML), 성인 림프모구성 백혈병(adult lymphoblastic leukaemia), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 연소기 만성 골수형성 백혈병(CML), 및 연소기 골수단핵구성 백혈병(JMML), 중증복합면역결핍증(SCID), X 연관 중증복합면역결핍증, 비스코트 알드리치 증후군(WAS), 아데노신-테아미나제(ADA) 결핍증, 만성 육아종병, 체디아크 히가시 증후군(Chediak-Higashi syndrome), 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(NHL) 또는 AIDS이다. 일부 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환이 있다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환은 급성파종뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 출혈성 백질뇌염(acute hemorrhagic leukoencephalitis), 애디슨병(Addison's disease), 무감마글로불린혈증(Agammaglobulinemia), 원형탈모증(Alopecia areata), 근위축성 측삭경화증, 강직성 척추염, 항인지질항체 증후군(antiphospholipid syndrome), 항합성효소항체 증후군(antisynthetase syndrome), 아토피성 알레르기(atopic allergy), 자가면역 재생불량성 빈혈, 자가면역 심근병증(autoimmune cardiomyopathy), 자가면역 창자병증(autoimmune enteropathy), 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이질환(autoimmune inner ear disease), 자가면역 림프증식성 증후군(autoimmune lymphoproliferative syndrome), 자가면역 말초 신경병증, 자가면역 췌장염(autoimmune pancreatitis), 자가면역 다내분비 증후군(autoimmune polyendocrine syndrome), 자가면역 프로게스테론 피부염(autoimmune progesterone dermatitis), 자가면역 혈소판감소성 자반병(autoimmune thrombocytopenic purpura), 자가면역 두드러기(autoimmune urticaria), 자가면역 포도막염, 발로병(Balo disease), 발로 동심성 경화증(Balo concentric sclerosis), 베체트 증후군(Bechets syndrome), 버거병(Berger's disease), 비커스태프 뇌염(Bickerstaff's encephalitis), 블라우 증후군(Blau syndrome), 수포성 유사천포창, 암, 캐슬만병(Castleman's disease), 셀리악병(ceeliac disease), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 만성 반복성 다초점 골수염(chronic recurrent multifocal osteomyelitis), 처가 스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 흉터유사천포창(cicatricial pemphigoid), 코간 증후군(Cogan syndrome), 한랭응집병, 보체 성분 2 결핍증(complement component 2 deficiency), 측두동맥염(cranial arteritis), CREST 증후군, 크론병(Crohn's disease), 쿠싱 증후군(Cushing's syndrome), 피부 백혈구파괴 혈관염(cutaneous leukocytoclastic angiitis), 디고스병(Dego's disease), 더컴병(Dercum's disease), 포진성 피부염(dermatitis herpetiformis), 피부근염, 제1형 진성 당뇨병(diabetes mellitus type 1), 광범위 피부 전신 경화증(diffuse cutaneous systemic sclerosis), 드레슬러 증후군(Dressler's syndrome), 원반모양홍반성루푸스(discoid lupus erythematosus), 습진(eczema), 부착부위염 관련 관절염(enthesis-related arthritis), 호산구성 근막염(eosinophilic fasciitis), 호산구성 위장관염(eosinophilic gastroenteritis), 후천성 표피 수포증(epidermolysis bullosa acquisita), 결절성 홍반(erythema nodosum), 본태성 혼합형 한랭글로불린혈증(essential mixed cryoglobulinemia), 에반스 증후군, 진행성 골화섬유형성이상(fibrodysplasia ossificans progressiva), 섬유성 폐포염(fibrosing aveolitis), 위염(gastritis), 위장관 유사천포창(gastrointestinal pemphigoid), 거대세포 동맥염(giant cell arteritis), 사구체신염(glomerulonephritis), 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랑 바레 증후군(GBS), 하시모토 뇌염(Hashimoto's encephalitis), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 용혈성 빈혈(hemolytic anaemia), 헤노흐 쉐넨라인 자반병(Henoch-Schonlein purpura), 임신포진(herpes gestationis), 저감마글로불린혈증(hypogammaglobulinemia), 특발성 염증성 탈수초 질환(idiopathic inflammatory demyelinating disease), 특발

성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 특발성 혈소판감소성 자반병, IgA 신장병증(nephropathy), 봉입체 근염(inclusion body myositis), 염증성 탈수초성 다발신경병증, 간질성 방광염(interstitial cystitis), 연소기 특발성 관절염(juvenile Idiopathic Arthritis), 연소기 류마티스 관절염, 가와사키병(Kawasaki's disease), 람베르트 이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton myasthenic syndrome), 백혈구과괴 혈관염(leukocytoclastic vasculitis), 편평태선(lichen planus), 경화태선(lichen sclerosus), 선형 IgA 질환(LAD), 루게릭병(Lou Gehrig's disease), 루푸스성 간염(lupoid hepatitis), 홍반성 루푸스(lupus erythematosus), 마지드 증후군(Majeed syndrome), 메니에르병(Meniere's disease), 현미경적 다발혈관염(microscopic polyangiitis), 밀러 피셔 증후군(Miller-Fisher syndrome), 혼합결합조직병(mixed connective tissue disease), 반상경피증(morphea), 무차 하베르만병(Mucha-Habermann disease), 다발성 경화증, 중증근무력증, 근육염(myositis), 시신경척수염(neuropylitis optica), 신경근긴장증(neuromyotonia), 눈 흉터 유사천포창(ocular cicatricial pemphigoid), 안구간대경련 근간대경련 증후군(opsoclonus myoclonus syndrome), 오드 갑상선염(ord thyroiditis), 재발성 류마티즘(palindromic rheumatism), 부신생물 소뇌 퇴화(paraneoplastic cerebellar degeneration), 발작성 야간 혈색뇨(PNH), 페리 롬버그 증후군(Parry Romberg syndrome), 파르소니지 터너 증후군(Parsonnage-Turner syndrome), 평면부염(pars planitis), 수포창(pemphigus), 보통천포창, 악성 빈혈(pernicious anemia), 정맥주위 뇌척수염(perivenous encephalomyelitis), POEMS 증후군, 결절성 다발동맥염(polyarteritis nodosa), 류마티스성 다발근통(polymyalgia rheumatica), 다발근염(polymyositis), 원발성 담즙성 간경변증(primary biliary cirrhosis), 원발성 경화성 담관염(primary sclerosing cholangitis), 진행성 염증성 신경병증, 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 괴저성 농피증(pyoderma gangrenosum), 순수 적혈구 무형성증(pure red cell aplasia), 라스무센 뇌염(Rasmussen's encephalitis), 레이노 현상(Raynaud phenomenon), 재발성 다발성 연골염(relapsing polychondritis), 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 하지불안 증후군(restless leg syndrome), 후복막 섬유증(retroperitoneal fibrosis), 류마티스 관절염, 류마티스 열(rheumatoid fever), 사르코이드증(sarcoidosis), 슈미트 증후군(Schmidt syndrome), 슈니츨러 증후군(Schnitzler syndrome), 공막염(scleritis), 경피증, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 척추관절병증(spondylarthropathy), 스틸병(Still's disease), 강직 인간 증후군(stiff person syndrome), 아균성 세균성 심내막염(subacute bacterial endocarditis), 스삭 증후군(Susac's syndrome), 스위트 증후군(Sweet's syndrome), 시덴남 무도병(Sydenham chorea), 교감성 안염(sympathetic ophthalmia), 타카야수 동맥염(Takayasu's arteritis), 측두 동맥염(temporal arteritis), 톨로사 헌트 증후군(Tolosa-Hunt syndrome), 횡단성 척수염(transverse myelitis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 미분화 결합 조직 질환(undifferentiated connective tissue disease), 미분화 척추관절병증, 뇌혈관염(vasculitis), 백반증(vitiligo) 또는 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis)이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 암이 있는 대상체로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 백혈병은 B-CLL, CML 또는 T 세포 기반 백혈병 예컨대 ALT이다. 일부 구현예에서, 암은 골수종이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 HSC 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 조작된 HSC는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) B2M 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 간세포 세포는 CIITA 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0758] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 예를 들어, 세포 이식, 수혈, 조직 이식, 또는 장기 이식과 같은 이전 이식에 존재하는 하나 이상의 항원으로부터 감작된 환자의 치료에 유용하다. 특정 구현예에서, 이전 이식은 동종이계 이식이고 환자는 동종이계 이식으로부터의 하나 이상의 동족항원에 대해 감작된다. 동종이계 이식은 동종이계 세포 이식, 동종이계 수혈, 동종이계 조직 이식, 또는 동종이계 장기 이식을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 환자는 임신중이거나 임신한 적이 있는(예를 들어, 임신 중에 동종면역을 받거나 받은 적이 있는) 감작된 환자이다. 특정 구현예에서, 환자는 이전 이식에 포함된 하나 이상의 항원으로부터 감작되며, 여기서 이전 이식은 변형된 인간 세포, 조직 또는 장기이다. 일부 구현예에서, 변형된 인간 세포, 조직 또는 장기는 변형된 자가조직 인간 세포, 조직 또는 장기이다. 일부 구현예에서, 이전 이식은 비인간 세포, 조직 또는 장기이다. 예시적인 구현예에서, 이전 이식은 변형된 비인간 세포, 조직, 또는 장기이다. 특정 구현예에서, 이전 이식은 인간 구성요소를 포함하는 키메라이다. 특정 구현예에서, 이전 이식은 CAR T-세포이다. 특정 구현예에서, 이전 이식은 자가조직 이식이고 환자는 자가조직 이식으로부터의 하나 이상의 자가조직 항원에 대해 감작된다. 특정 구현예에서, 이전 이식은 자가조직 세포, 조직 또는 장기이다. 특정 구현예에서, 감작된 환자는 알레르기가 있고 하나 이상의 알레르겐에 감작된다. 예시적인 구현예에서, 환자는 건초열(hay fever), 음식 알레르기, 곤충 알레르기, 약물 알레르기 또는 아토피성 피부염(atopic

dermatitis)이 있다.

- [0759] 일부 구현예에서, 제공되는 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물을 사용하여 치료 중인 환자는 이전 치료를 받았다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 치료와 동일한 병태를 치료하는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 치료와 상이한 병태를 치료하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 환자에게 투여되는 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 치료에 의해 치료된 동일한 병태 또는 질환의 치료에 대해 향상된 치료 효과를 나타낸다. 특정 구현예에서, 투여되는 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 치료와 비교하여 환자에서 병태 또는 질환의 치료에 대해 더 긴 치료 효과를 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 투여된 세포는 이전 치료와 비교하여 암 세포에 대해 향상된 잠재력, 효능 및/또는 특이성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 조작된 1차 세포는 암의 치료를 위한 CAR T-세포이다.
- [0760] 본원에 제공된 방법은 1차 치료 실패 후 특정 병태 또는 질환에 대한 2차 치료로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이전 치료는 치료적으로 비효과적인 치료이다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료적으로 비효과적인" 치료는 환자에서 원하는 임상 결과보다 낮은 결과를 생성하는 치료를 지칭한다. 예를 들어, 세포 결핍증에 대한 치료와 관련하여, 치료적으로 비효과적인 치료는 환자에서 결핍 세포를 대체하기 위해 원하는 수준의 기능적 세포 및/또는 세포 활성을 달성하지 않고/않거나, 치료 지속성이 결여된 치료를 지칭할 수 있다. 암 치료와 관련하여, 치료적으로 비효과적인 치료는 원하는 수준의 잠재력, 효능 및/또는 특이성을 달성하지 않는 치료를 지칭한다. 치료적 효과는 당업계에 알려진 임의의 적합한 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 이전 치료에 대한 면역 반응을 생성한다. 일부 구현예에서, 이전 치료는 환자에 의해 거부된 세포, 조직 또는 장기 이식편이다. 일부 구현예에서, 이전 치료에는 기계적 보조 치료가 포함된다. 일부 구현예에서, 기계적 보조 치료에는 혈액투석 또는 심실 보조 장치가 포함된다. 일부 구현예에서, 환자는 기계적 보조 치료에 대한 면역 반응을 생성하였다. 일부 구현예에서, 이전 치료에는 치료 세포가 바람직하지 않은 방식으로 성장 및 분열할 경우 이들의 사망을 유발할 수 있는 안전 스위치를 포함하는 치료 세포 집단이 포함된다. 특정 구현예에서, 환자는 치료 세포의 안전 스위치 유도 사망의 결과로서 면역 반응을 생성한다. 특정 구현예에서, 환자는 이전 치료로부터 감각된다. 예시적인 구현예에서, 환자는 본원에 제공된 바와 같은 투여되는 조작된 1차 세포에 의해 감각되지 않는다.
- [0761] 일부 구현예에서, 제공되는 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 조직, 장기 또는 부분 장기 이식을 제공하기 전에 이를 필요로 하는 환자에게 투여된다. 특정 구현예에서, 환자는 조작된 1차 세포에 대한 면역 반응을 나타내지 않는다. 특정 구현예에서, 조작된 1차 세포는 특정 조직 또는 장기에서 세포 결핍증의 치료를 위해 환자에게 투여되고 환자는 후속적으로 동일한 특정 조직 또는 장기에 대한 조직 또는 장기 이식을 받는다. 이러한 구현예에서, 조작된 1차 세포 치료는 최종 조직 또는 장기 대체에 대한 가교 요법으로 기능한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 간 질환이 있으며, 간 이식을 받기 전에, 본원에 제공된 바와 같은 조작된 간세포 치료를 받는다. 특정 구현예에서, 조작된 1차 세포는 특정 조직 또는 장기에서 세포 결핍증의 치료를 위해 환자에게 투여되고 환자는 후속적으로 상이한 조직 또는 장기에 대한 조직 또는 장기 이식을 받는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 신장 이식을 받기 전에 본원에 제공된 바와 같은 조작된 췌장 베타 섬 세포로 치료받은 당뇨병 환자이다. 일부 구현예에서, 방법은 세포 결핍증의 치료를 위한 것이다. 예시적인 구현예에서, 조직 또는 장기 이식은 심장 이식, 폐 이식, 신장 이식, 간 이식, 췌장 이식, 장 이식, 위 이식, 각막 이식, 골수 이식, 혈관 이식, 심장 판막 이식, 또는 뼈 이식이다.
- [0762] 환자를 치료하는 방법은 일반적으로 본원에 제공된 바와 같은 조작된 1차 세포, 또는 이를 함유하는 조성물의 투여를 통해 이루어진다. 이해되는 바와 같이, 세포 및/또는 요법 시기와 관련하여 본원에 기재된 모든 다중 구현예에 대해, 세포의 투여는 도입된 세포가 원하는 부위에서 적어도 부분적 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해 달성된다. 세포는 원하는 부위에 직접 이식될 수 있거나, 대안적으로 또는 이식된 세포 또는 세포의 구성요소 중 적어도 일부가 생존가능한 채로 남아있는 대상체에서 원하는 위치로 전달되는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 세포 요법에 의해 완화될 수 있는 임의의 질환, 장애, 병태, 또는 증상과 같은 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다.
- [0763] 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자가 감각된 후 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 1주, 또는 적어도 1개월 이상 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자가 감각되거나 감각화의 특성 또는 특징을 나타낸 후 적어도 1주(예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주, 또는 그 이상) 또는 그 이상 후에 투여된다. 일부 구현예에

서, 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자가 이식(예를 들어, 동종이계 이식)을 받았거나, 임신한 적이 있거나(예를 들어, 임신 중에 동종면역을 받았거나 받은 적이 있거나) 감작되거나 감작화의 특성화 또는 특징을 나타낸 후 적어도 1개월(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 또는 그 이상) 또는 그 이상 후에 투여된다.

[0764] 일부 구현예에서, 이식을 받고/받았거나, 임신한 적이 있고/있거나(예를 들어, 임신 중에 동종면역을 받았거나 받은 적이 있거나), 항원(예를 들어, 동종항원)에 대해 감작된 환자는 본원에 기재된 조작된 1차 세포 집단의 첫번째 용량 투여, 첫번째 용량 후 회복 기간, 및 기재된 조작된 1차 세포 집단의 두번째 용량 투여를 포함하는 투약 레지멘으로 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 세포 집단 및 제2 세포 집단에 존재하는 세포 유형의 복합물은 상이하다. 특정 구현예에서, 제1 조작된 1차 세포 집단 및 제2 조작된 1차 세포 집단에 존재하는 세포 유형의 복합물은 동일하거나 실질적으로 동등하다. 많은 구현예에서, 제1 조작된 1차 세포 집단 및 제2 조작된 1차 세포 집단은 동일한 세포 유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 조작된 1차 세포 집단 및 제2 조작된 1차 세포 집단은 상이한 세포 유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 조작된 1차 세포 집단 및 제2 조작된 1차 세포 집단은 동일한 백분율의 세포 유형을 포함한다. 다른 구현예에서, 제1 조작된 1차 세포 집단 및 제2 세포 집단은 상이한 백분율의 세포 유형을 포함한다.

[0765] 일부 구현예에서, 회복 기간은 조작된 1차 세포 집단 또는 이를 함유하는 조성물의 첫번째 투여 후에 시작하고, 이러한 세포가 환자에서 더 이상 존재하지 않거나 검출가능하지 않을 때 종료된다. 일부 구현예에서, 회복 기간의 지속기간은 세포의 초기 투여 후 적어도 1주(예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주, 또는 그 이상) 또는 그 이상이다. 일부 구현예에서, 회복 기간의 지속기간은 세포의 초기 투여 후 적어도 1개월(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 또는 그 이상) 또는 그 이상이다.

[0766] 일부 구현예에서, 투여되는 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 대상체에게 투여될 때 저면역원성이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 저면역성이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에 대한 면역 반응은 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 예를 들어 조작된 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생성된 면역 반응 수준과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮게 감소되거나 낮아진다. 일부 구현예에서, 투여되는 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 조작된 세포에 대한 면역 반응을 도출하지 못한다.

[0767] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 전신 TH1 활성화의 감소되거나 더 낮은 수준을 도출한다. 일부 경우에, 세포에 의해 도출된 전신 TH1 활성화의 수준은 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 조작된 1차 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생성된 전신 TH1 활성화 수준과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 전신 TH1 활성화를 도출하지 못한다.

[0768] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 면역 활성화의 감소되거나 더 낮은 수준을 도출한다. 일부 경우에, 세포에 의해 도출된 PBMC의 면역 활성화 수준은 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 조작된 1차 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생성된 PBMC의 면역 활성화 수준과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 PBMC의 면역 활성화를 도출하지 못한다.

[0769] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 공여자 특이적 IgG 항체의 감소되거나 더 낮은 수준을 도출한다. 일부 경우에, 세포에 의해 도출된 공여자 특이적 IgG 항체의 수준은 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 조작된 1차 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생성된 공여자 특이적 IgG 항체의 수준과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단은 환자에서 공여자 특이적 IgG 항체를 도출하지 못한다.

[0770] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 IgM 및 IgG 항체 생성의 감소되거나 더 낮은 수준을 도출한다. 일부 경우에, 세포에 의해 도출된 IgM 및 IgG 항체 생성 수준은 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 조작된 1차 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생성된 IgM 및 IgG 항체 생성 수준과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 IgM 및 IgG 항체 생성을 도출하지 못한다.

[0771] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 세포독성 T 세포 사멸의 감소되거나 더 낮은 수준을 도출한다. 일부 경우에, 세포에 의해 도출된 세포독성 T 세포 사멸 수준은 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 조작된 1차 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생성된 세포독성 T 세포 사멸 수준과 비교하여 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 세포독성 T 세포 사멸을 도출하지 못한다.

[0772] 위에 논의된 바와 같이, 특정 구현예에서 MHC 분자와 같은 동종항원(예를 들어, 인간 백혈구 항원)에 대해 감작된 환자에게 투여될 수 있는 세포가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 환자는 임신중이거나 임신한 적이 있으며, 예를 들어, 임신 중에 동종면역화가 있었다(예를 들어, 태아 및 신생아의 용혈성 질환(HDFN), 신생아 동종면역 호중구감소증(NAN) 또는 태아 및 신생아 동종면역 혈소판감소증(FNAIT)). 다시 말해서, 환자는 태아 및 신생아의 용혈성 질환(HDFN), 신생아 동종면역 호중구감소증(NAN), 및 태아 및 신생아 동종면역 혈소판감소증(FNAIT)과 같으나 이에 제한되지 않는 임신 중 동종면역화와 연관된 장애 또는 병태가 있었거나 있었던 적이 있다. 일부 구현예에서, 환자는 동종이계 세포 이식, 동종이계 수혈, 동종이계 조직 이식, 또는 동종이계 장기 이식과 같으나 이에 제한되지 않는 동종이계 이식을 받았다. 일부 구현예에서, 환자는 동종항원에 대한 기억 B 세포를 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 동종항원에 대한 기억 T 세포를 나타낸다. 이러한 환자는 동종항원에 대한 기억 B 및 기억 T 세포를 둘 다 나타낼 수 있다.

[0773] 기재된 세포의 투여 시, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응과 비교하여 전신 면역 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 전신 면역 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응과 비교하여 적응성 면역 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 적응성 면역 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응과 비교하여 선천성 면역 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 선천성 면역 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응과 비교하여 T 세포 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 T 세포 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응과 비교하여 B 세포 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 B 세포 반응을 나타낸다.

[0774] **A. 용량 및 투여량 레지멘**

[0775] 본원에 기재된 임의의 치료적 유효량의 세포는 치료되는 적응증에 따라 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 세포의 비제한적인 예는 기재된 바와 같은 1차 세포(예를 들어 1차 T 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 약 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 또는 5×10^{10} 개의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 약 1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 또는 5×10^{10} 개의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 약 6.0×10^8 개의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 약 8.0×10^8 개의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 약 1×10^2 - 5×10^2 , 5×10^2 - 1×10^3 , 1×10^3 - 5×10^3 , 5×10^3 - 1×10^4 , 1×10^4 - 5×10^4 , 5×10^4 - 1×10^5 , 1×10^5 - 5×10^5 , 5×10^5 - 1×10^6 , 1×10^6 - 5×10^6 , 5×10^6 - 1×10^7 , 1×10^7 - 5×10^7 , 5×10^7 - 1×10^8 , 1×10^8 - 5×10^8 , 5×10^8 - 1×10^9 , 1×10^9 - 5×10^9 , 5×10^9 - 1×10^{10} , 또는 1×10^{10} - 5×10^{10} 개의 세포를 포함한

다. 예시적인 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1.0×10^6 내지 약 2.5×10^8 개의 세포를 포함한다.

[0776] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 500 ml의 부피를 갖는다. 예시적인 구현예에서, 약제학적 조성물은 최대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 500 ml의 부피를 갖는다. 예시적인 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 500 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1-50 ml, 50-100 ml, 100-150 ml, 150-200 ml, 200-250 ml, 250-300 ml, 300-350 ml, 350-400 ml, 400-450 ml, 또는 450-500 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1-50 ml, 50-100 ml, 100-150 ml, 150-200 ml, 200-250 ml, 250-300 ml, 300-350 ml, 350-400 ml, 400-450 ml, 또는 450-500 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1-10 ml, 10-20 ml, 20-30 ml, 30-40 ml, 40-50 ml, 50-60 ml, 60-70 ml, 70-80 ml, 70-80 ml, 80-90 ml, 또는 90-100 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 5 ml 내지 약 80 ml 범위의 부피를 갖는다. 예시적인 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10 ml 내지 약 70 ml 범위의 부피를 갖는다. 많은 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 10 ml 내지 약 50 ml 범위의 부피를 갖는다.

[0777] 특이적 양/투여량 레지멘은 개체의 체중, 성별, 연령 및 건강; 제형, 생화학적 속성, 생체활성, 생체이용률 및 세포의 부작용 및 완전 치료 레지멘에서 세포의 수 및 정체성에 따라 달라질 것이다.

[0778] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물의 용량은 약 10 mL 내지 50 mL의 부피로 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8 개의 세포를 포함하고 약제학적 조성물은 단일 용량으로 투여된다.

[0779] 많은 구현예에서, 세포는 T 세포이고 약제학적 조성물은 1차 T 세포와 같으나 이에 제한되지 않는 약 2.0×10^6 내지 약 2.0×10^8 개의 세포를 포함한다. 일부 경우에, 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피로 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8 개의 본원에 기재된 1차 T 세포를 포함한다. 여러 경우에, 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피로 상기 기재된 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8 개의 1차 T 세포를 포함한다. 다른 경우에, 용량은 1차 T 세포를 포함하여 약 1.0×10^5 개 미만 내지 약 2.5×10^8 개의 T 세포 범위이다. 또 다른 경우에, 용량은 1차 T 세포를 포함하여 약 1.0×10^5 개 초과 내지 약 2.5×10^8 개의 T 세포 범위이다.

[0780] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 kg 이하의 대상체에 대해 체중 kg 당 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^7 개의 조작된 1차 세포(예컨대 1차 세포)의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 kg 이하의 대상체에 대해 체중 kg 당 약 0.5×10^5 내지 약 1.0×10^7 , 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^7 , 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^7 , 약 5.0×10^5 내지 약 1×10^7 , 약 1.0×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 5.0×10^6 내지 약 1.0×10^7 , 약 1.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^6 , 약 1.0×10^5 내지 약 5.0×10^5 , 약 1.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 2.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 3.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 4.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 5.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 6.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 7.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 약 8.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 , 또는 약 9.0×10^5 내지 약 5.0×10^6 개의 세포의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 용량은 50 kg 이하의 대상체에 대해 체중 kg 당 약 0.2×10^6 내지 약 5.0×10^6 개의 세포이다. 많은 구현예에서, 용량은 50 kg 이하의 대상체에 대해 체중 kg 당 약 0.2×10^6 개 미만 내지 약 5.0×10^6 개의 세포 범위이다. 많은 구현예에서, 용량은 50 kg 이하의 대상체에 대해 체중 kg 당 약 0.2×10^6 개 초과 내지 약 5.0×10^6 개의 세포 범위이다. 예시적인 구현예에서, 단일 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피이다. 일부 구현예에서, 용량은 정맥내로 투여된다.

[0781] 예시적인 구현예에서, 세포는 50 kg 초과인 대상체에 대해 약 1.0×10^6 내지 약 5.0×10^8 개의 세포(예컨대 1차 세포)의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 kg 이하의 대상체에 대해 체중 kg 당 약 0.5×10^6 내지 약 1.0×10^9 , 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^9 , 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^9 , 약 5.0

$x 10^6$ 내지 약 1.0×10^9 , 약 1.0×10^7 내지 약 1.0×10^9 , 약 5.0×10^7 내지 약 1.0×10^9 , 약 1.0×10^6 내지 약 5.0×10^7 , 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^7 , 약 1.0×10^6 내지 약 5.0×10^7 , 약 1.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 2.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 3.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 4.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 5.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 6.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 7.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 약 8.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 , 또는 약 9.0×10^7 내지 약 5.0×10^8 개의 세포의 단일 용량으로 투여된다. 많은 구현예에서, 세포는 50 kg 초과 대상체에 대해 약 1.0×10^7 내지 약 2.5×10^8 개의 세포의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 50 kg 초과 대상체에 대해 약 1.0×10^7 개 미만 내지 약 2.5×10^8 개의 세포 범위의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 50 kg 초과 대상체에 대해 약 1.0×10^7 개 초과 내지 약 2.5×10^8 개의 세포 범위의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 용량은 정맥내로 투여된다. 예시적인 구현예에서, 단일 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피이다. 일부 구현예에서, 용량은 정맥내로 투여된다.

[0782] 예시적인 구현예에서, 용량은 분 당 약 1 내지 50 ml, 분 당 1 내지 40 ml, 분 당 1 내지 30 ml, 분 당 1 내지 20 ml, 분 당 10 내지 20 ml, 분 당 10 내지 30 ml, 분 당 10 내지 40 ml, 분 당 10 내지 50 ml, 분 당 20 내지 50 ml, 분 당 30 내지 50 ml, 분 당 40 내지 50 ml의 속도로 정맥내로 투여된다. 다수의 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥내 투여를 위해 하나 이상의 주입 백에 저장된다. 일부 구현예에서, 용량은 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 60분, 70분, 80분, 90분, 120분, 150분, 180분, 240분, 또는 300 분 이내에 완전히 투여된다.

[0783] 일부 구현예에서 약제학적 조성물의 단일 용량은 단일 주입 백에 존재한다. 다른 구현예에서, 약제학적 조성물의 단일 용량은 2, 3, 4 또는 5개의 개별 주입 백으로 나누어진다.

[0784] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 용량과 같은 복수의 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 1 내지 24 시간 간격 범위로 대상체에게 투여된다. 일부 경우에, 후속 용량은 초기 또는 이전 용량 후 약 1시간 내지 약 24시간(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 약 24시간)에 투여된다. 일부 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 약 1일 내지 28일 간격 범위로 대상체에게 투여된다. 일부 경우에, 후속 용량은 초기 또는 이전 용량 후 약 1일 내지 약 28일(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 약 28일)에 투여된다. 많은 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 1주 내지 약 6주 간격 범위로 대상체에게 투여된다. 특정 경우에, 후속 용량은 초기 또는 이전 용량 후 약 1주 내지 약 6주(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6주)에 투여된다. 여러 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 약 1개월 내지 약 12개월 간격 범위로 대상체에게 투여된다. 여러 예에서, 후속 용량은 초기 또는 이전 용량 후 약 1개월 내지 약 12개월(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월)에 투여된다.

[0785] 일부 구현예에서, 대상체는 제1 시점에 제1 투여량 레지멘을 투여받은 다음, 후속적으로 제2 시점에 제2 투여량 레지멘을 투여받는다. 일부 구현예에서, 제1 투여량 레지멘은 제2 투여량 레지멘과 동일하다. 다른 구현예에서, 제1 투여량 레지멘은 제2 투여량 레지멘과 상이하다. 일부 경우에, 제1 투여량 레지멘 및 제2 투여량 레지멘에서 세포의 수는 동일하다. 일부 경우에, 제1 투여량 레지멘 및 제2 투여량 레지멘에서 세포의 수는 상이하다. 일부 경우에, 제1 투여량 레지멘 및 제2 투여량 레지멘의 용량의 수는 동일하다. 일부 경우에, 제1 투여량 레지멘 및 제2 투여량 레지멘의 용량의 수는 상이하다.

[0786] 일부 구현예에서, 세포는 조작된 T 세포(예를 들어 1차 T 세포)이고 제1 투여량 레지멘은 제1 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하고 제1 CAR 및 제2 CAR이 상이하도록 제2 투여량 레지멘은 제2 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함한다. 예를 들면, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상이한 표적 항원에 결합한다. 일부 경우에, 제1 CAR은 항원에 결합하는 scFv를 포함하고 제2 CAR은 상이한 항원에 결합하는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 투여량 레지멘은 제1 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하고 제2 투여량 레지멘은 제2 CAR을 발현하는 제1 CAR 및 제2 CAR이 동일하도록 조작된 T 세포 또는 1차 T 세포를 포함한다. 제1 투여량 레지멘은 제2 투여량 레지멘으로부터 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1-3개월, 1-6개월, 4-6개월, 3-9개월, 3-12개월, 또는 그 이상 개월 간격으로 대상체에게 투여될 수 있다. 일부

구현예에서, 대상체는 질환(예를 들어, 암) 과정 동안 복수의 투여량 레지멘으로 투여되고 투여량 레지멘 중 적어도 2개는 동일한 유형의 본원에 기재된 조작된 T 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 복수의 투여량 레지멘 중 적어도 2개의 상이한 유형의 본원에 기재된 조작된 T 세포를 포함한다.

[0787] B. 면역억제제

[0788] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 1차 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물의 첫번째 투여 전에 환자에게 투여되지 않는다.

[0789] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 1차 세포의 투여를 받은 환자에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 1차 세포의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 1차 세포의 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여 전에 투여된다.

[0790] 면역억제제 및/또는 면역조절제의 비제한적인 예는 사이클로스포린, 아자티오프린, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드 예컨대 프레드니손, 메토트렉세이트, 금 염, 술폰살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노미드, 미조리빈, 15-데옥시시페르구알린, 6-메르캅토피린, 사이클로포스파미드, 라파마이신, 타크롤리무스(FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로불린, 티모펜틴, 티모신- α 및 유사한 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 IL-2 수용체의 p75에 결합하는 항체, 예를 들면, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, 또는 CD58에 결합하는 항체, 및 임의의 그들의 리간드에 결합하는 항체로 이루어진 면역억제 항체의 군으로부터 선택된다. 면역억제제 및/또는 면역조절제가 세포의 첫번째 투여 전 또는 후에 환자에게 투여되는 일부 구현예에서, 투여는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현이 있고 CD47의 외인성 발현이 없는 세포에 요구되는 것보다 더 낮은 투여량으로 이루어진다.

[0791] 하나의 구현예에서, 이러한 면역억제제 및/또는 면역조절제는 가용성 IL-15R, IL-10, B7 분자(예를 들어, B7-1, B7-2, 이의 변이체, 및 이의 단편), ICOS, 및 OX40, 음성 T 세포 조절제의 억제제(예컨대 CTLA-4에 대한 항체) 및 유사한 제제로부터 선택될 수 있다.

[0792] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 1차 세포 집단의 첫번째 투여 전에 환자에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 첫번째 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 이상 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 첫번째 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 투여된다.

[0793] 특정 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 첫번째 투여한 후에 환자에게 투여되지 않거나, 또는 세포를 첫번째 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 이상 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 첫번째 투여한 지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 후에 투여된다.

[0794] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포 집단의 투여 전에 환자에게 투여되지 않는다. 많은 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 1차 세포 집단을 첫번째 및/또는 두번째 투여하기 전에 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 이상 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 첫번째 및/또는 두번째 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 투여된다. 특정 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 이상 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포를 첫번째 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 후에 투여된다.

[0795] 면역억제제 및/또는 면역조절제가 세포의 투여 전 또는 후에 환자에게 투여되는 일부 구현예에서, 투여는 면역원성 세포(예를 들어 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만 조작된 1차 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단, 예를 들어 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현이 있지만 CD47의 외인성 발현이 없는 세포에 요구되는 것보다 더 낮은 투여량으로 이루어진다.

[0796] VI. 예시적인 구현예

[0797] 다음 예시적인 구현예가 본원에 제공된다:

- [0798] 구현예 1. (i) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포로서, 상기 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적인 것인, 조작된 1차 세포.
- [0799] 구현예 2. 구현예 1에서, 상기 (ii)에서의 변형이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자(molecules)의 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0800] 구현예 3. 구현예 1에서, 상기 (ii)에서의 변형이 하나 이상의 MHC 클래스 I 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0801] 구현예 4. 구현예 1-3 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, MFG8, 및 SERPINE1, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0802] 구현예 5. 구현예 4에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FasL, SERPINE1, CD200, MFG8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0803] 구현예 6. 구현예 4에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나가 CD47인, 조작된 1차 세포.
- [0804] 구현예 7. (i) CD47의 발현을 증가시키고, (ii) 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형을 포함하는 조작된 1차 세포로서, 상기 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 상대적인 것인, 조작된 1차 세포.
- [0805] 구현예 8. 구현예 1-7 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 발현을 증가시키는 변형(들)이 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형이 감소된 표면 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0806] 구현예 9. 구현예 6-8 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 CD47의 발현을 증가시키는 변형이 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0807] 구현예 10. 구현예 9에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 암호화하고, 조작된 1차 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0808] 구현예 11. 구현예 10에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2에 제시된 서열을 암호화하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0809] 구현예 12. 구현예 7-11 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0810] 구현예 13. 구현예 12에 있어서, 상기 프로모터가 구성적 프로모터인, 조작된 1차 세포.
- [0811] 구현예 14. 구현예 12 또는 13에 있어서, 상기 프로모터가 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 폴로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0812] 구현예 15. 구현예 4-14 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0813] 구현예 16. 구현예 15에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 CD47을 암호화하는 멀티시스템로닉 벡터 및 제2 이식유전자를 암호화하는 추가의 이식유전자인, 방법.
- [0814] 구현예 17. 구현예 15에 있어서, 상기 통합이 조작된 1차 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 이루어지는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0815] 구현예 18. 구현예 15에 있어서, 상기 통합이 세포의 표적 게놈 유전자와 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지

는 것인, 조작된 1차 세포.

- [0816] 구현예 19. 구현예 18에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌가 안전한 항구 유전자좌, *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌, 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌인, 방법.
- [0817] 구현예 20. 구현예 19에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌가 *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPPIR12C(AAVS1*로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 유전자좌, *SHS231* 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, 및 *ROSA26* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0818] 구현예 21. 구현예 1-20 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0819] 구현예 22. 구현예 1-21 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키는 변형인, 조작된 1차 세포.
- [0820] 구현예 23. 구현예 22에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 mRNA 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0821] 구현예 24. 구현예 22에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0822] 구현예 25. 구현예 22-24 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 *B2M* 유전자 활성을 제거하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0823] 구현예 26. 구현예 22-25 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0824] 구현예 27. 구현예 22-26 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0825] 구현예 28. 구현예 26 또는 구현예 27에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 *B2M* 유전자에 indel을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0826] 구현예 29. 구현예 22-28 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 *B2M* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 조작된 1차 세포.
- [0827] 구현예 30. 구현예 22-29 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 *B2M* 유전자가 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0828] 구현예 31. 구현예 22-30 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0829] 구현예 32. 구현예 31에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *B2M* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 상기 Cas는 Cas9인, 조작된 1차 세포.
- [0830] 구현예 33. 구현예 32에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합이 *B2M* 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0831] 구현예 34. 구현예 33에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 조작된 1차 세포.
- [0832] 구현예 35. 구현예 21에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질의 발현을 감소시키는 변형이며, 임의적으로 상기 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자가 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0833] 구현예 36. 구현예 1-35 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0834] 구현예 37. 구현예 1-36 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 *CIITA*의 발현을 감소시키는 변형인, 조작된 1차 세포.

- [0835] 구현예 38. 구현예 37에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 감소된 mRNA 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0836] 구현예 39. 구현예 37에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 CIITA의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0837] 구현예 40. 구현예 37-39 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 *CIITA* 유전자 활성을 제거하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0838] 구현예 41. 구현예 37-40 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0839] 구현예 42. 구현예 37-41 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 세포에서 모든 *CIITA* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0840] 구현예 43. 구현예 41 또는 구현예 42에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 *CIITA* 유전자에 indel을 포함하는 것인, 조작된 1차 세포
- [0841] 구현예 44. 구현예 37-43 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 indel이 *CIITA* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 조작된 1차 세포.
- [0842] 구현예 45. 구현예 37-44 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 *CIITA* 유전자는 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0843] 구현예 46. 구현예 37-45 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0844] 구현예 47. 구현예 46에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *CIITA* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 상기 Cas가 Cas9인, 조작된 1차 세포.
- [0845] 구현예 48. 구현예 46 또는 구현예 47에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합이 *CIITA* 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0846] 구현예 49. 구현예 48에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 조작된 1차 세포.
- [0847] 구현예 50. 구현예 36에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키는 변형이며, 임의적으로 상기 HLA-DP 단백질, 및 HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자가 녹아웃되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0848] 구현예 51. 구현예 1-50 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포 또는 동물 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0849] 구현예 52. 구현예 51에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0850] 구현예 53. 구현예 1-52 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 1차 세포가 혈액에 노출되는 세포 유형인, 조작된 1차 세포.
- [0851] 구현예 54. 구현예 1-53 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 공여자 대상체로부터 단리된 1차 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0852] 구현예 55. 구현예 54에 있어서, 상기 공여자 대상체가 건강하거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 수득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0853] 구현예 56. 구현예 1-55 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포로부터 선택되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0854] 구현예 57. 구현예 1-56 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 내피 세포인, 조작된 1차 세포.

- [0855] 구현예 58. 구현예 1-56 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 상피 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0856] 구현예 59. 구현예 1-56 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 T 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0857] 구현예 60. 구현예 1-56 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 NK 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0858] 구현예 61. 구현예 59 또는 구현예 60에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 것인, 조작된 1차 세포.
- [0859] 구현예 62. 구현예 1-52 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0860] 구현예 63. 구현예 62에 있어서, 상기 섬 세포가 베타 섬 세포인, 조작된 1차 세포.
- [0861] 구현예 64. 구현예 1-52 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 간세포인, 조작된 1차 세포.
- [0862] 구현예 65. 구현예 1-64 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 ABO 혈액형 0형인, 조작된 1차 세포.
- [0863] 구현예 66. 구현예 1-65 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 레스스 인자 음성(Rh-)인, 조작된 1차 세포.
- [0864] 구현예 67. 조작된 1차 세포를 생성하는 방법으로서,
- [0865] a) 1차 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계; 및,
- [0866] b) 1차 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 단계
- [0867] 를 포함하는, 방법.
- [0868] 구현예 68. 구현예 67 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, CCL21, MFGE8, 및 SERPINB9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0869] 구현예 69. 구현예 68에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0870] 구현예 70. 구현예 69에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나가 CD47인, 방법 1차 세포.
- [0871] 구현예 71. 구현예 67-70 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0872] 구현예 72. 구현예 67-71 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0873] 구현예 73. 조작된 1차 세포를 생성하는 방법으로서,
- [0874] a. 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계; 및,
- [0875] b. 세포 내 CD47의 발현을 증가시키는 단계
- [0876] 를 포함하는 것인, 방법.
- [0877] 구현예 74. 구현예 73에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0878] 구현예 75. 구현예 73에 있어서, 상기 방법이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0879] 구현예 76. 구현예 67-75 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 발현을 증가시키는 변형(들)이 증가된 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 변형이 감소된 표면 발현을 포함하는 것인, 방법.
- [0880] 구현예 77. 구현예 70-75 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 CD47의 발현을 증가시키는 변형이 CD47 단백질질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 방법.

- [0881] 구현예 78. 구현예 77에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 암호화하고, 조작된 1차 세포의 선천성 면역 사멸을 감소시키는 것인, 방법.
- [0882] 구현예 79. 구현예 78에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 서열번호: 2에 제시된 서열을 암호화하는 것인, 방법.
- [0883] 구현예 80. 구현예 77-79 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 방법.
- [0884] 구현예 81. 구현예 77-80 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 조작된 1차 세포의 게놈 내로 통합되는 것인, 방법.
- [0885] 구현예 82. 구현예 81에 있어서, 상기 통합이 조작된 1차 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 조작된 1차 세포 내로 도입함으로써 이루어지는 것인, 방법.
- [0886] 구현예 83. 구현예 81에 있어서, 상기 통합이 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지며, 임의적으로 상기 표적화 삽입이 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0887] 구현예 84. 구현예 83에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌가 *B2M* 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자 유전자좌, *CD142* 유전자 유전자좌, *TRAC* 유전자 유전자좌, 또는 *TRBC* 유전자 유전자좌인, 방법.
- [0888] 구현예 85. 구현예 84에 있어서, 상기 표적 게놈 유전자좌가 *CCR5* 유전자 유전자좌, *CXCR4* 유전자 유전자좌, *PPP1R12C(AAVSI*로도 알려짐) 유전자, 알부민 유전자 유전자좌, *SHS231* 유전자좌, *CLYBL* 유전자 유전자좌, 및 *ROSA26* 유전자 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0889] 구현예 86. 구현예 83-85 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 표적 게놈 유전자좌를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 상기 Cas가 Cas9인, 방법.
- [0890] 구현예 87. 구현예 86에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합이 표적 게놈 유전자좌의 표적 서열에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA) 및 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상동성 지시 복구 주형을 포함하는 것인, 방법.
- [0891] 구현예 88. 구현예 87에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 방법.
- [0892] 구현예 89. 구현예 67-88에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 저면역원성 1차 세포인, 방법.
- [0893] 구현예 90. 구현예 67-89 중 어느 한 구현예에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것이 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형을 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0894] 구현예 91. 구현예 67-90 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 발현을 포함하는 것인, 방법.
- [0895] 구현예 92. 구현예 67-91 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 B2M의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 방법.
- [0896] 구현예 93. 구현예 91 또는 구현예 92에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 *B2M* 유전자 활성을 제거하는 것인, 방법.
- [0897] 구현예 94. 구현예 67-93 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 발현을 감소시키는 변형이 *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.
- [0898] 구현예 95. 구현예 67-94 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.
- [0899] 구현예 96. 구현예 87 또는 구현예 88에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 내인성 *B2M* 유전자에 indel 또는

내인성 *B2M* 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함하는 것인, 방법.

- [0900] 구현예 97. 구현예 89에 있어서, 상기 indel이 *B2M* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 방법.
- [0901] 구현예 98. 구현예 84-90 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 내인성 *B2M* 유전자가 녹아웃되는 것인, 방법.
- [0902] 구현예 99. 구현예 84-91 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0903] 구현예 100. 구현예 92에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 *B2M* 유전자를 표적하는 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지며, 임의적으로 상기 Cas가 Cas9인, 방법.
- [0904] 구현예 101. 구현예 100에 있어서, 상기 뉴클레아제-매개 유전자 편집이 CRISPR-Cas 조합에 의해 이루어지고 CRISPR-Cas 조합이 *B2M* 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 것인, 방법.
- [0905] 구현예 102. 구현예 101에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 조합이 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체인, 방법.
- [0906] 구현예 103. 구현예 66-102에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I의 발현을 감소시키는 변형이 HLA-A 단백질 발현, HLA-B 단백질 발현, 또는 HLA-C 단백질 발현을 감소시키며, 임의적으로 상기 단백질 발현이 상기 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질을 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써 감소되는 것인, 방법.
- [0907] 구현예 104. 구현예 67-103 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 것이 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형을 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0908] 구현예 105. 구현예 67-104 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 유전자 변형이 *CIITA*의 감소된 발현을 포함하는 것인, 방법.
- [0909] 구현예 106. 구현예 67-105 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 유전자 변형이 *CIITA*의 감소된 단백질 발현을 포함하는 것인, 방법.
- [0910] 구현예 107. 구현예 104 또는 구현예 105에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 *CIITA*를 제거하는 것인, 방법.
- [0911] 구현예 108. 구현예 67-107 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 단백질 발현을 감소시키는 변형이 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.
- [0912] 구현예 109. 구현예 67-108 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 세포에서 모든 *CIITA* 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 방법.
- [0913] 구현예 110. 구현예 108 또는 구현예 109에 있어서, 상기 불활성화 또는 파괴가 *CIITA* 유전자에 indel 또는 *CIITA* 유전자의 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실을 포함하는 것인, 방법.
- [0914] 구현예 111. 구현예 110에 있어서, 상기 indel이 *CIITA* 유전자의 프레임시프트 돌연변이 또는 게놈 DNA 연속 스트레치의 결실인, 방법.
- [0915] 구현예 112. 구현예 67-111 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 *CIITA* 유전자가 녹아웃되는 것인, 방법.
- [0916] 구현예 113. 구현예 67에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 유전자 변형이 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질의 발현을 감소시키며, 임의적으로 상기 HLA-DP 단백질 발현, 상기 HLA-DR 단백질 발현, 또는 상기 HLA-DQ 단백질 발현이 상기 HLA-DP 단백질, 상기 HLA-DR 단백질, 또는 상기 HLA-DQ 단백질을 암호화하는 유전자를 녹아웃시킴으로써 감소되는 것인, 방법.
- [0917] 구현예 114. 구현예 67-113 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포 또는 동물 세포인, 방법.
- [0918] 구현예 115. 구현예 67-114 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 인간 세포인, 방법.

- [0919] 구현예 116. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 혈액에 노출되는 세포 유형인, 방법.
- [0920] 구현예 117. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 공여자 대상체로부터 획득되는 것인, 방법.
- [0921] 구현예 118. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포, 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경교 전구 세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0922] 구현예 119. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 섬 세포인, 방법.
- [0923] 구현예 200. 구현예 119에 있어서, 상기 단계 a) 전에 1차 섬 세포가 1차 섬 클러스터로부터 해리된 것인, 방법.
- [0924] 구현예 201. 구현예 200에 있어서, 상기 1차 섬 클러스터가 인간 1차 사체 섬 클러스터인, 방법.
- [0925] 구현예 202. 구현예 200 또는 구현예 201에 있어서, 상기 단계 a) 후 및/또는 단계 b) 후에 1차 섬 세포를 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 방법.
- [0926] 구현예 203. 구현예 202에 있어서, 상기 인큐베이션이 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [0927] 구현예 204. 구현예 202 또는 구현예 203에 있어서, 상기 인큐베이션이 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.
- [0928] 구현예 205. 구현예 202 또는 구현예 203에 있어서, 상기 인큐베이션이 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.
- [0929] 구현예 206. 구현예 202-205 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하기 전에, 방법이 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0930] 구현예 207. 구현예 206에 있어서, 상기 선택이 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0931] 구현예 208. 구현예 119-207 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법이 다음 단계를 포함하는 것인, 방법:
- [0932] i) 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계;
- [0933] ii) 1차 베타 섬 세포 내 하나 이상의 MHC 클래스 I 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II HLA의 발현을 감소시키거나 제거하기 위해 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시키는 단계;
- [0934] iii) 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계;
- [0935] iv) 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계;
- [0936] v) 1차 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위해 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 추가로 변형시키는 단계; 및
- [0937] vi) 두번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 추가로 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계.
- [0938] 구현예 209. 구현예 66 또는 208에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I HLA가 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질인, 방법.
- [0939] 구현예 210. 구현예 66, 208, 또는 209에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II HLA가 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질인, 방법.
- [0940] 구현예 211. 구현예 208-210 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 유전자 조작에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0941] 구현예 212. 구현예 208-211 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 움직임이 진탕인, 방법.

- [0942] 구현예 213. 구현예 212에 있어서, 상기 진탕이 궤도 움직임을 포함하는 것인, 방법.
- [0943] 구현예 214. 구현예 212에 있어서, 상기 진탕이 양방향 선형 이동을 포함하는 것인, 방법.
- [0944] 구현예 215. 구현예 212 또는 구현예 213에 있어서, 상기 진탕이 궤도 진탕기를 사용하는 것인, 방법.
- [0945] 구현예 216. 구현예 202-215에 있어서, 상기 (iii)에서의 인큐베이션 및/또는 vi)에서의 인큐베이션이 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [0946] 구현예 217. 구현예 202-216 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 iii)에서의 인큐베이션 및/또는 vi)에서의 인큐베이션이 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.
- [0947] 구현예 218. 구현예 202-216 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 인큐베이션이 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.
- [0948] 구현예 219. 구현예 208-218 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 v) 전에, 방법이 iv)에서의 해리된 섬 세포로부터 변형된 베타 섬 세포를 선택하고, 임의적으로 선택된 섬 세포 상에서 단계 iii) 및 iv)를 반복하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0949] 구현예 220. 구현예 208-218 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 vi)에서의 인큐베이션 후에, 방법이 두번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키고 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0950] 구현예 221. 구현예 220에 있어서, 상기 인큐베이션이 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 선택된 변형된 1차 베타 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 방법.
- [0951] 구현예 222. 1차 섬 세포를 유전자 편집하는 방법으로서, 다음 단계를 포함하는 것인, 방법:
 - [0952] i) 1차 섬 클러스터를 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계;
 - [0953] ii) 현탁액의 1차 베타 섬 세포를 변형시키는 단계; 및
 - [0954] iii) 변형된 1차베타 섬 세포를 섬 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 변형된 1차베타 섬 세포를 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 진탕하면서 수행되는 것인, 단계.
- [0955] 구현예 223. 구현예 222에 있어서, 상기 1차 섬 클러스터가 인간 1차 사체 섬 클러스터인, 방법.
- [0956] 구현예 224. 구현예 222 또는 구현예 223에 있어서, 상기 변형이 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키거나 세포 내 하나 이상의 이종 단백질의 발현을 증가시키기 위해 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0957] 구현예 225. 구현예 222-224에 있어서, 상기 (iii)에서의 인큐베이션 및/또는 vi)에서의 인큐베이션이 정적 조건 하에 인큐베이션의 적어도 일부를 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [0958] 구현예 226. 구현예 222-225 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 인큐베이션이 정적 조건 하에 첫번째 인큐베이션 이어서 움직이면서 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.
- [0959] 구현예 227. 구현예 222-225 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 인큐베이션이 움직이면서 인큐베이션 이어서 정적 조건 하에 두번째 인큐베이션을 포함하는 것인, 방법.
- [0960] 구현예 228. 구현예 222-227 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 단계 i)-iii)이 반복되는 것인, 방법.
- [0961] 구현예 229. 구현예 228에 있어서, 상기 방법의 첫번째 반복에서의 변형이 방법의 반복된 반복에서의 변형과 상이한 것인, 방법.
- [0962] 구현예 230. 구현예 222-224 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 재클러스터링된 섬 세포가 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터이고 방법이 다음 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법:
 - [0963] iv) 첫번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 베타 섬 세포의 현탁액으로 해리시키는 단계;
 - [0964] v) 현탁액의 변형된 1차 섬 세포를 추가로 변형시키는 단계; 및
 - [0965] vi) 두번째 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 추가로 변형된 1차 베타 섬 세포를

인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 단계.

- [0966] 구현예 231. 구현예 222-230 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 iii)에서의 인큐베이션 전에, 방법이 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0967] 구현예 232. 구현예 230 또는 구현예 231에 있어서, 상기 v) 전에, iv)에서의 해리된 섬 세포로부터 변형된 베타 섬 세포를 선택하고, 임의적으로 선택된 섬 세포 상에서 단계 iii) 및 iv)를 반복하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0968] 구현예 233. 구현예 222, 226, 또는 227에 있어서, 상기 vi)에서의 인큐베이션 후에, 방법이 두번째 변형된 1차 섬 클러스터를 변형된 1차 섬 세포의 현탁액으로 해리시키고 변형된 섬 세포를 선택하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0969] 구현예 234. 구현예 208-233 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 현탁액이 단일 세포 현탁액인, 방법.
- [0970] 구현예 235. 구현예 232-234 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 선택된 변형된 1차 베타 섬 세포를 변형된 1차 섬 클러스터 내로 재클러스터링하기 위한 조건 하에 인큐베이션하되, 여기서 인큐베이션의 적어도 일부는 움직이면서 수행되는 것인, 방법.
- [0971] 구현예 236. 구현예 222-235 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 움직임이 진탕인 방법.
- [0972] 구현예 237. 구현예 236에 있어서, 상기 진탕이 궤도 움직임을 포함하는 것인 방법.
- [0973] 구현예 238. 구현예 236에 있어서, 상기 진탕이 양방향 선형 이동을 포함하는 것인, 방법.
- [0974] 구현예 239. 구현예 236 또는 구현예 237에 있어서, 상기 진탕이 궤도 진탕기를 사용하는 것인, 방법.
- [0975] 구현예 240. 구현예 231-239 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 선택이 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함하는 것인, 방법.
- [0976] 구현예 241. 구현예 230-240 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 첫번째 변형 또는 추가 변형 중 하나가 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것을 포함하고 첫번째 변형 또는 추가 변형의 다른 하나가 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0977] 구현예 242. 구현예 230-240 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 첫번째 변형이 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것을 포함하고 추가 변형이 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0978] 구현예 243. 구현예 230-242 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 첫번째 변형이 하나 이상의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0979] 구현예 244. 구현예 208-243 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 변형이 유전자 조작인, 방법.
- [0980] 구현예 245. 구현예 230-244 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I HLA가 HLA-A 단백질, HLA-B 단백질, 또는 HLA-C 단백질인, 방법.
- [0981] 구현예 246. 구현예 230-245 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II HLA가 HLA-DP 단백질, HLA-DR 단백질, 또는 HLA-DQ 단백질인, 방법.
- [0982] 구현예 247. 구현예 243-246 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 것이 B-2 마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키는 것에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0983] 구현예 248. 구현예 243-247 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현이 CIITA의 발현을 감소시키는 것에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0984] 구현예 249. 구현예 230-248 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 추가 변형이 세포 내 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [0985] 구현예 250. 구현예 249에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FasL, CCL21, MFG8, 및 SERPINB9, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

- [0986] 구현예 251. 구현예 250에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47, PD-L1, HLA-E, HLA-G, CCL21, FASL, SERPINB9, CD200, MFGE8, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0987] 구현예 252. 구현예 251에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자 중 적어도 하나가 CD47인, 방법.
- [0988] 구현예 253. 구현예 224-252 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 세포 내 내인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자의 발현을 감소시키는 것이 유전자-편집 시스템을 세포 내로 도입함으로써 이루어지는 것인, 방법.
- [0989] 구현예 254. 구현예 253에 있어서, 상기 유전자-편집 시스템이 서열 특이적 뉴클레아제를 포함하는 것인, 방법.
- [0990] 구현예 255. 구현예 254에 있어서, 상기 서열 특이적 뉴클레아제가 RNA-가이드 DNA 엔도뉴클레아제, 메가뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 및 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0991] 구현예 256. 구현예 255에 있어서, 상기 유전자-편집 시스템이 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함하는 것인, 방법.
- [0992] 구현예 257. 구현예 255에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제가 Cas 뉴클레아제 및 가이드 RNA를 포함하는 것인, 방법.
- [0993] 구현예 258. 구현예 256 또는 구현예 257에 있어서, 상기 RNA-가이드-뉴클레아제가 유형 II 또는 유형 V Cas 단백질을 포함하는 것인, 방법.
- [0994] 구현예 259. 구현예 256, 257, 또는 258에 있어서, 상기 RNA-가이드-뉴클레아제가 Cas9 동족체 또는 Cpf1 동족체를 포함하는 것인, 방법.
- [0995] 구현예 260. 구현예 224-259 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 세포 내 하나 이상의 외인성 단백질의 발현을 증가시키는 것이 외인성 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [0996] 구현예 261. 구현예 260에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인, 방법.
- [0997] 구현예 262. 구현예 261에 있어서, 상기 프로모터가 구성적 프로모터인, 방법.
- [0998] 구현예 263. 구현예 261 또는 구현예 262에 있어서, 상기 프로모터가 CAG 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(EBV) 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [0999] 구현예 264. 구현예 224-259 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 세포의 게놈 내로 통합되는 것인, 방법.
- [1000] 구현예 265. 구현예 264에 있어서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 멀티시스템로닉 벡터인, 방법.
- [1001] 구현예 266. 구현예 264에 있어서, 상기 통합이 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 이루어지는 것인, 방법.
- [1002] 구현예 267. 구현예 264에 있어서, 상기 통합이 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 이루어지는 것인, 방법.
- [1003] 구현예 268. 구현예 119-267 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 섬 세포가 베타 섬 세포인, 방법.
- [1004] 구현예 269. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 간세포인, 방법.
- [1005] 구현예 270. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 T 세포인, 방법.
- [1006] 구현예 271. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 내피 세포인, 방법.
- [1007] 구현예 272. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 갑상선 세포인, 방법.
- [1008] 구현예 273. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 피부 세포인, 방법.
- [1009] 구현예 274. 구현예 67-115 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 망막 색소 상피 세포인, 방법.

- [1010] 구현예 275. 구현예 67-274 중 어느 한 구현예의 방법에 따라 생성된 조작된 1차 세포.
- [1011] 구현예 276. 구현예 275에 있어서, 상기 1차 세포가 섬 세포인, 조작된 1차 세포.
- [1012] 구현예 277. 구현예 276에 있어서, 상기 섬 세포가 베타 섬 세포인, 조작된 1차 세포.
- [1013] 구현예 278. 구현예 1-66 및 275-277 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 수용자 환자에게 투여 시 NK 세포 매개 세포독성을 회피할 수 있는 것인, 조작된 1차 세포.
- [1014] 구현예 279. 구현예 1-66 및 275-278 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 수용자 환자에게 투여 시 성숙 NK 세포에 의한 세포 용해로부터 보호되는 것인, 조작된 1차 세포.
- [1015] 구현예 280. 구현예 1-66 및 275-279 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 면역 반응을 유도하지 않는 것인, 조작된 1차 세포.
- [1016] 구현예 281. 구현예 1-66 및 275-280 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 전신 염증성 반응을 유도하지 않는 것인, 조작된 1차 세포.
- [1017] 구현예 282. 구현예 1-66 및 275-281 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포가 수용자 환자에게 투여 시 세포에 대한 국소 염증성 반응을 유도하지 않는 것인, 조작된 1차 세포.
- [1018] 구현예 283. 구현예 1-66 및 275-282 중 어느 한 구현예의 복수의 조작된 1차 세포를 포함하는 조작된 1차 세포 집단.
- [1019] 구현예 284. 구현예 283에 있어서, 상기 복수의 조작된 1차 세포가 1명 초과와 공여자 대상체로부터의 세포 풀로부터 유래되는 것인, 조작된 1차 세포 집단.
- [1020] 구현예 285. 구현예 284에 있어서, 상기 1명 초과와 공여자 대상체 각각이 건강한 대상체이거나 공여자 샘플이 공여자 대상체로부터 취득된 당시에 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되지 않는 것인, 조작된 1차 세포 집단..
- [1021] 구현예 286. 구현예 283-285 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형을 포함하는 것인, 집단.
- [1022] 구현예 287. 구현예 283-286 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 집단.
- [1023] 구현예 288. 구현예 136 또는 구현예 137에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.
- [1024] 구현예 289. 구현예 283-288 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M 및/또는 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.
- [1025] 구현예 290. 구현예 283-289 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.
- [1026] 구현예 291. 구현예 283-290 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 변형(들)을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해 B2M 및 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 것인, 집단.
- [1027] 구현예 292. 구현예 283-291 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 내인성 B2M 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함하는 것인, 집단.
- [1028] 구현예 293. 구현예 283-292 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단 내 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%가 내인성 CIITA 유전자의 두 대립유전자를 불활성화하는

하나 이상의 변경을 포함하는 것인, 집단.

- [1029] 구현예 294. 구현예 283-293 중 어느 한 구현예의 집단을 포함하는 조성물.
- [1030] 구현예 295. 구현예 119-268 중 어느 한 구현예의 방법에 의해 생성된 조작된 1차 섬 클러스터를 포함하는 조성물.
- [1031] 구현예 296. 조작된 1차 섬 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 섬 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.
- [1032] 구현예 297. 구현예 296에 있어서, 상기 조작된 1차 섬 세포 집단이 1차 섬 세포의 클러스터인, 조성물.
- [1033] 구현예 298. 구현예 296에 있어서, 상기 조작된 1차 섬 세포 집단이 조작된 1차 베타 섬 세포 집단인, 조성물.
- [1034] 구현예 299. 조작된 1차 T 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 T 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.
- [1035] 구현예 300. 조작된 1차 갑상선 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 갑상선 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.
- [1036] 구현예 301. 조작된 1차 피부 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 피부 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.
- [1037] 구현예 302. 조작된 1차 내피 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 내피 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.
- [1038] 구현예 303. 조작된 1차 망막 색소 상피 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 1차 망막 색소 상피 세포가 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자 및 (ii) *B2M* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함하는 것인, 조성물.
- [1039] 구현예 304. 구현예 294-303 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 *B2M* 유전자의 두 대립유전자에 indel을 포함하는 것인, 조성물.
- [1040] 구현예 305. 구현예 294-304 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 추가로 포함하는 것인, 조성물.
- [1041] 구현예 306. 구현예 294-305 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 *CIITA* 유전자의 두 대립유전자에 indel을 포함하는 것인, 조성물.
- [1042] 구현예 307. 구현예 294-306 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 1차 세포 집단의 조작된 1차 세포가 표현형 $B2M^{indel/indel}$; $CIITA^{indel/indel}$; CD47 tg 를 갖는 것인, 조성물.
- [1043] 구현예 308. 구현예 294-307 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 조성물인, 조성물.
- [1044] 구현예 309. 구현예 294-308 중 어느 한 구현예에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 조성물.
- [1045] 구현예 310. 구현예 294-309 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조성물이 동결보호제를 포함하는 무혈청 동결보존 배지에 제형화되는 것인, 조성물.
- [1046] 구현예 311. 구현예 309에 있어서, 상기 동결보호제가 DMSO이고 동결보존 배지가 5% 내지 10% DMSO(v/v)인, 조성물.
- [1047] 구현예 312. 구현예 308 및 구현예 309에 있어서, 상기 동결보호제가 10% DMSO(v/v) 또는 약 10% DMSO(v/v)인, 조성물.
- [1048] 구현예 313. 구현예 294-312 중 어느 한 구현예에 있어서, 멸균된 것인, 조성물.

- [1049] 구현예 314. 구현예 294-313 중 어느 한 구현예의 조성물을 포함하는, 용기.
- [1050] 구현예 315. 구현예 314에 있어서 멸균 백인, 용기.
- [1051] 구현예 316. 구현예 315에 있어서, 상기 백이 동결보존-호환성 백인, 멸균 백.
- [1052] 구현예 317. 유효량의 구현예 283-293 중 어느 한 구현예의 집단, 구현예 294-307 중 어느 한 구현예의 조성물, 또는 구현예 308의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 질환, 병태, 또는 세포 결핍증의 치료를 필요로 하는 환자에서 질환, 병태, 또는 세포 결핍증을 치료하는 방법.
- [1053] 구현예 318. 317에 있어서, 상기 집단이 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 제형화되는 것인, 방법.
- [1054] 구현예 319. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 베타 섬 세포를 포함하는 섬 세포를 포함하는 것인, 방법.
- [1055] 구현예 320. 구현예 317-319 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 섬 세포 집단이 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.
- [1056] 구현예 321. 구현예 317-320 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 섬 세포 집단이 베타 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.
- [1057] 구현예 322. 구현예 317-320 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 세포 집단이 간세포인, 방법.
- [1058] 구현예 323. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 T 세포를 포함하는 것인, 방법.
- [1059] 구현예 324. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 갑상선 세포를 포함하는 것인, 방법.
- [1060] 구현예 325. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 피부 세포를 포함하는 것인, 방법.
- [1061] 구현예 326. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 내피 세포를 포함하는 것인, 방법.
- [1062] 구현예 327. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 망막 색소 상피 세포를 포함하는 것인, 방법.
- [1063] 구현예 328. 구현예 317-327에 있어서, 상기 병태 또는 질환이 당뇨병, 암, 혈관신생 장애, 안구 질환, 갑상선 질환, 피부 질환, 및 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1064] 구현예 329. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 결핍증이 당뇨병과 연관되거나 세포 요법이 당뇨병의 치료를 위한 것이며, 임의적으로 상기 당뇨병이 제I형 당뇨병인, 방법.
- [1065] 구현예 330. 구현예 329에 있어서, 상기 세포 집단이 베타 섬 세포를 포함하는 섬 세포 집단인, 방법.
- [1066] 구현예 331. 구현예 330에 있어서, 상기 세포 집단이 섬 세포의 클러스터로서 투여되는 것인, 방법.
- [1067] 구현예 332. 유효량의 구현예 283-293 중 어느 한 구현예의 섬 세포 집단, 구현예 294-307 중 어느 한 구현예의 조성물, 또는 구현예 308의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 당뇨병의 치료를 필요로 하는 환자에서 당뇨병을 치료하는 방법.
- [1068] 구현예 333. 구현예 330-331 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 섬 세포의 클러스터가 베타 섬 세포의 클러스터인, 방법.
- [1069] 구현예 334. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 결핍증이 혈관 병태 또는 질환과 연관되거나 세포 요법이 혈관 병태 또는 질환의 치료를 위한 것인, 방법.
- [1070] 구현예 335. 구현예 334에 있어서, 상기 세포 집단이 내피 세포 집단인, 방법.
- [1071] 구현예 336. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 결핍증이 자가면역 갑상선염과 연관되거나 세포 요법이 자가면역 갑상선염의 치료를 위한 것인, 방법.
- [1072] 구현예 337. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 결핍증이 간 질환과 연관되거나 세포 요법이 간 질환의 치료를 위한 것인, 방법.
- [1073] 구현예 338. 구현예 337에 있어서, 상기 간 질환이 간경변을 포함하는 것인, 방법.

- [1074] 구현예 339. 구현예 337 또는 구현예 338에 있어서, 상기 세포 집단이 간세포 집단인, 방법.
- [1075] 구현예 340. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 결핍증이 각막 질환과 연관되거나 세포 요법이 각막 질환의 치료를 위한 것인, 방법.
- [1076] 구현예 341. 구현예 340에 있어서, 상기 각막 질환이 폭스 이영양증 또는 선천성 유전성 각막 내피 이영양증인, 방법.
- [1077] 구현예 342. 구현예 340 또는 구현예 341에 있어서, 상기 세포 집단이 각막 내피 세포 집단인, 방법.
- [1078] 구현예 343. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 결핍증이 신장 질환과 연관되거나 세포 요법이 신장 질환의 치료를 위한 것인, 방법.
- [1079] 구현예 344. 구현예 343에 있어서, 상기 세포 집단이 신세포 집단인, 방법.
- [1080] 구현예 345. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 요법이 암의 치료를 위한 것인, 방법.
- [1081] 구현예 346. 구현예 345에 있어서, 상기 암이 B 세포 급성 림프구성 백혈병(B-ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 대장암, 폐암, 비소세포 폐암, 급성 골수성 림프성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암, 췌장선암, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평상피 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1082] 구현예 347. 구현예 317 또는 구현예 318에 있어서, 상기 세포 집단이 T 세포 또는 NK 세포의 집단인, 방법.
- [1083] 구현예 348. 구현예 317-347 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 세포가 투여 전에 확장되고 동결보존되는 것인, 방법.
- [1084] 구현예 349. 구현예 317-348 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단을 투여하는 것이 집단의 정맥내 주사, 근육내 주사, 혈관내 주사, 또는 이식을 포함하는 것인, 방법.
- [1085] 구현예 350. 구현예 349에 있어서, 상기 집단이 신장 캡슐 이식물 또는 근육내 주사를 통해 이식되는 것인, 방법.
- [1086] 구현예 351. 구현예 317-350 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단이 공여자 대상체로부터 유래되되, 상기 공여자의 HLA 유형이 환자의 HLA 유형과 일치하지 않는 것인, 방법.
- [1087] 구현예 352. 구현예 317-351 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 집단이 인간 세포 집단이고 환자가 인간 환자인, 방법.
- [1088] 구현예 353. 구현예 330-333 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 베타 섬 세포가 대상체의 내당능을 개선시키는 것인, 방법.
- [1089] 구현예 354. 구현예 353에 있어서, 상기 대상체가 당뇨병 환자인, 방법.
- [1090] 구현예 355. 구현예 354에 있어서, 상기 당뇨병 환자가 제I형 당뇨병 또는 제II형 당뇨병을 갖는 것인, 방법.
- [1091] 구현예 356. 구현예 330-332 및 353-55 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 내당능이 섬 세포의 투여 전에 대상체의 내당능에 비해 개선되는 것인, 방법.
- [1092] 구현예 357. 구현예 330-332 및 353-356 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 베타 섬 세포가 대상체의 외인성 인슐린 사용량을 감소시키는 것인, 방법.
- [1093] 구현예 358. 구현예 353-357 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 내당능이 HbA1c 수준에 의해 측정된 바와 같이 개선되는 것인, 방법.
- [1094] 구현예 359. 구현예 353-358 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 대상체가 공복 상태인, 방법.
- [1095] 구현예 360. 구현예 330-332 및 351-360 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 섬 세포가 대상체의 인슐린 분비를 개선시키는 것인, 방법.
- [1096] 구현예 361. 구현예 360에 있어서, 상기 인슐린 분비가 섬 세포의 투여 전에 대상체의 인슐린 분비에 비해 개선되는 것인, 방법.
- [1097] 구현예 362. 구현예 317-361 중 어느 한 구현예에 있어서, 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 것을

추가로 포함하는 것인, 방법.

- [1098] 구현예 363. 구현예 317-361 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 환자에게 하나 이상의 면역억제제가 투여되었던 것인, 방법.
- [1099] 구현예 364. 구현예 362 또는 363에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 소분자 또는 항체인, 방법.
- [1100] 구현예 365. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 사이클로스포린, 아자티오프린, 마이코페놀산, 마이코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드, 프레드니손, 메토타렉세이트, 금염, 술파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노미드, 미조리빈, 15-데옥시시페르구알린, 6-메르캅토피린, 사이클로포스파미드, 라파마이신, 타크롤리무스(FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로불린, 티모펜틴(티모신- α), 및 면역억제 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1101] 구현예 366. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 사이클로스포린을 포함하는 것인, 방법.
- [1102] 구현예 367. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 마이코페놀레이트 모페틸을 포함하는 것인, 방법.
- [1103] 구현예 368. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 코르티코스테로이드를 포함하는 것인, 방법.
- [1104] 구현예 369. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 사이클로포스파미드를 포함하는 것인, 방법.
- [1105] 구현예 370. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 라파마이신을 포함하는 것인, 방법.
- [1106] 구현예 371. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 타크롤리무스(FK-506)를 포함하는 것인, 방법.
- [1107] 구현예 372. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 항-흉선세포 글로불린을 포함하는 것인, 방법.
- [1108] 구현예 373. 구현예 362-364 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 하나 이상의 면역조절제인, 방법.
- [1109] 구현예 374. 구현예 373에 있어서, 상기 하나 이상의 면역조절제가 소분자 또는 항체인, 방법.
- [1110] 구현예 375. 구현예 364 또는 구현예 374에 있어서, 상기 항체가 IL-2 수용체의 p75, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGF1R, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58, 및 그들의 리간드 중 임의의 것에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체 또는 리간드 중 하나 이상에 결합하는 것인, 방법.
- [1111] 구현예 376. 구현예 362-375 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여하기 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1112] 구현예 377. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1113] 구현예 378. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1114] 구현예 379. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1115] 구현예 380. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 이상 후에 환자에게 투여되거나 투

여되었던 것인, 방법.

- [1116] 구현예 381. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포의 첫번째 투여와 동일한 날에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1117] 구현예 382. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 투여한 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1118] 구현예 383. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1119] 구현예 384. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1120] 구현예 385. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1121] 구현예 386. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 또는 그 이상 전에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1122] 구현예 387. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1123] 구현예 388. 구현예 362-376 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포를 첫번째 투여 및/또는 두번째 투여한 지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 이상 후에 환자에게 투여되거나 투여되었던 것인, 방법.
- [1124] 구현예 389. 구현예 362-388 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 면역억제제가 조작된 세포의 변형을 포함하지 않는 면역원성 세포의 면역 거부를 감소시키기 위해 투여된 하나 이상의 면역억제제의 투여량과 비교하여 더 낮은 투여량으로 투여되는 것인, 방법.
- [1125] 구현예 390. 구현예 361-389 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 세포가 조작된 세포의 사멸을 제어할 수 있는 것인, 방법.
- [1126] 구현예 391. 구현예 361-390 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 포함하는 것인, 방법.
- [1127] 구현예 392. 구현예 391에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 약물 또는 전구약물의 존재 하에, 또는 선택적 외인성 화합물에 의한 활성화 시 제어된 세포 사멸을 유도하는 것인, 방법.
- [1128] 구현예 393. 구현예 391 또는 구현예 392에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 조작된 세포의 세포 사멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질인, 방법.
- [1129] 구현예 394. 구현예 393에 있어서, 상기 조작된 세포의 세포사멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질이 카스파제 단백질인, 방법.
- [1130] 구현예 395. 구현예 394에 있어서, 상기 카스파제 단백질이 카스파제 9인, 방법.
- [1131] 구현예 396. 구현예 393 또는 구현예 394에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 사이토신 데아미나제 (Cyd), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제 (HSV-Tk), 유도성 카스파제 9 (iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9 (rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1132] 구현예 397. 구현예 391-396 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.
- [1133] 구현예 398. 구현예 391-396 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 환자에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하기 전에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.
- [1134] 구현예 399. 구현예 391-398 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 환자에게 조작

된 세포를 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.

- [1135] 구현예 400. 구현예 391-399 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 세포독성 또는 환자에 대한 다른 부정적인 결과가 생길 경우 제어된 세포 사멸을 유도하도록 활성화되는 것인, 방법.
- [1136] 구현예 401. 구현예 361-391 중 어느 한 구현예에 있어서, 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 고갈을 허용하는 제제를 투여하는 것을 포함하는, 방법.
- [1137] 구현예 402. 구현예 401에 있어서, 상기 조작된 세포의 고갈을 허용하는 제제가 조작된 세포의 표면 상에서 발현되는 단백질을 인식하는 항체인, 방법.
- [1138] 구현예 403. 구현예 402에 있어서, 상기 항체가 CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, 및 RQR8을 인식하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1139] 구현예 404. 구현예 401 또는 구현예 402에 있어서, 상기 항체가 모가물리주맵, AFM13, MOR208, 오비누투주맵, 유블리톡시맵, 오카라투주맵, 리톡시맵, 리톡시맵-R11b, 토무조톡시맵, RO5083945(GA201), 세톡시맵, Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 디니톡시맵, c.60C3-R11c, 및 이의 바이오시밀러로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1140] 구현예 405. 구현예 317-361 및 401-404 중 어느 한 구현예에 있어서, 조작된 세포의 표면 상에서 하나 이상의 관용원성 인자를 인식하는 제제를 투여하는 것을 포함하는 것인, 방법.
- [1141] 구현예 406. 구현예 405에 있어서, 상기 조작된 세포가 하나 이상의 관용원성 인자를 발현하도록 조작되는 것인, 방법.
- [1142] 구현예 407. 구현예 405 또는 구현예 406에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 방법.
- [1143] 구현예 408. 구현예 317-407 중 어느 한 구현예에 있어서, 환자에게 하나 이상의 관용원성 인자를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.
- [1144] 구현예 409. 구현예 317-408 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 환자에게 하나 이상의 추가의 치료제가 투여되었던 것인, 방법.
- [1145] 구현예 410. 구현예 317-409 중 어느 한 구현예에 있어서, 방법의 치료적 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는, 방법.
- [1146] 구현예 411. 구현예 317-410 중 어느 한 구현예에 있어서, 방법의 예방적 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는, 방법.
- [1147] 구현예 412. 구현예 410 또는 구현예 411에 있어서, 상기 하나 이상의 질환 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 방법이 반복되는 것인, 방법.
- [1148] 구현예 413. 구현예 1-66 및 275-282 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조작된 세포.
- [1149] 구현예 414. 구현예 413에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스 바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp 9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포.
- [1150] 구현예 415. 구현예 413 또는 구현예 414에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조작된 세포.
- [1151] 구현예 416. 구현예 413-415 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 하나 이상의 관용원성 인자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조작된 세포.
- [1152] 구현예 417. 구현예 415 또는 구현예 416에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포의 게놈 내로의 비 표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입시킴으로써 통합되는 것인, 조작된 세포.
- [1153] 구현예 418. 구현예 417에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되며, 임의적으로 상기 표적화 삽입이 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의

해 이루어지는 것인, 조작된 세포.

- [1154] 구현예 419. 구현예 412-418 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 조작된 세포.
- [1155] 구현예 420. 구현예 67-274 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 방법.
- [1156] 구현예 421. 구현예 420에 있어서, 상기 자살 유전자가 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.
- [1157] 구현예 422. 구현예 420 또는 구현예 421에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 방법.
- [1158] 구현예 423. 구현예 420-422 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 하나 이상의 관용원성 인자가 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 방법.
- [1159] 구현예 424. 구현예 422 또는 구현예 423에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포의 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해 통합되는 것인, 방법.
- [1160] 구현예 425. 구현예 424에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되는 것인, 방법.
- [1161] 구현예 426. 구현예 420-425 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자가 CD47인, 방법.
- [1162] 구현예 427. 구현예 294-313 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 조작된 세포 집단의 조작된 세포가 자살 유전자 또는 자살 스위치를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조성물.
- [1163] 구현예 428. 구현예 427에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치가 사이토신 데아미나제(CyD), 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(HSV-Tk), 유도성 카스파제 9(iCaspase9), 및 라파마이신-활성화 카스파제 9(rapaCasp9)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 조성물.
- [1164] 구현예 429. 구현예 427 또는 구현예 428에 있어서, 상기 자살 유전자 및 자살 유전자 또는 안전 스위치와 연관된 유전자가 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조성물.
- [1165] 구현예 430. 구현예 427-429 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 자살 유전자 또는 자살 스위치 및 외인성 CD47 이 조작된 세포의 게놈 내로 통합된 비시스트로닉 카세트로부터 발현되는 것인, 조성물.
- [1166] 구현예 431. 구현예 429 또는 구현예 430에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 게놈 내로의 비표적화 삽입에 의해, 임의적으로 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 폴리뉴클레오티드를 조작된 세포 집단의 조작된 세포 내로 도입함으로써 통합되는 것인, 조성물.
- [1167] 구현예 432. 구현예 429 또는 구현예 430에 있어서, 상기 비시스트로닉 카세트가 조작된 세포 집단의 조작된 세포의 표적 게놈 유전자좌 내로의 표적화 삽입에 의해 통합되며, 임의적으로 상기 표적화 삽입이 상동성 지시 복구에 따른 뉴클레아제-매개 유전자 편집에 의해 이루어지는 것인, 조성물.

VII. 실시예

다음 실시예는 예시 목적을 위해서만 포함되며 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

실시예 1: 이식 연구에서 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포의 생존 및 기능

[1171] 동종이계 수용자에서 1차 베타 섬 세포의 이식을 위해 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 발현을 감소시키고 CD47 발현을 증가시키는 효과를 연구하기 위해, B2M-녹아웃 C57BL/6(B6) 마우스(MHC 일배체형 H2^b)로부터의 1차 베타 섬 세포를 CD47을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하여 마우스 B2M^{-/-}; CD47^{tg} 1차 베타 섬 세포를 생성하였다. C57BL/6(B6) 마우스로부터 단리된 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포는 MHC-II 분자를 자연적으로 발현하지 않

거나(도 1), 자극 후 MHC-II 분자가 상향조절되지 않는다. 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 조작된 1차 베타 섬 세포를 BALB/c 당뇨병 질환 마우스 모델 수용자(MHC 일배체형 H2^d) 내로 이식하였다. 이식된 마우스 야생형 B6 섬 세포와 비교하여 이식된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포의 생존 및 기능을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.

[1172] **A. 방법**

[1173] **당뇨병 마우스 모델.** 25 마리의 BALB/c(MHC 일배체형 H2^d) 마우스에게 저용량 스트렙토조토신(STZ)(60 mg/kg i.p.)을 5일 동안 매일(-5일차 내지 0일차) 주사하였다. STZ를 시트레이트 완충액(10mg/ml 스톡 용액)에 용해시키고 복강내(i.p.) 주사를 위해 150 μL의 주사 부피로 희석하였다. 신장을 건강하게 유지하기 위해 다음날 아침 마우스에게 포스페이트 완충 식염수(PBS)(1 mL) i.p. 주사를 투여하였다.

[1174] **혈당 측정.** 혈당 측정은 표준 프로토콜에 따라 음식 섭취 중단 4시간 후에 수행하였다.

[1175] **마우스 1차 베타 섬 세포의 생성.** B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포를 B2M-녹아웃 C57BL/6(B6) 마우스(MHC 일배체형 H2^b)로부터 단리하였다. 단리된 마우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포를 마우스 CD47 이식유전자를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 야생형 B6 마우스로부터 단리된 1차 베타 섬 세포를 대조군(야생형 섬)으로서 사용하였다. 마우스 야생형 및 마우스 B2M^{-/-} CD47tg 1차 베타 섬 세포를 모두 생물발광 이미징(BLI)을 통해 세포 생존을 모니터링하기 위해 루시페라제 발현 작제물로 형질도입하였다.

[1176] **유세포 분석법.** 1차 베타 섬 세포 상에서 MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, 및 CD47의 표면 발현을 항체 특이적 시약을 사용하여 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 이소형 항체를 대조군으로서 사용하였다.

[1177] **이식 연구 설계 및 투여.** 25 마리의 BALB/c MHC 일배체형 H2^d 마우스(마우스 체중 18-20 g)를 당뇨병을 유도하기 위한 STZ 투여 후 5개 연구 그룹(연구 그룹 당 n=5)으로 무작위 배정하였으며, 이 그룹은 투여된 세포(마우스 야생형 대 마우스 B2M^{-/-} CD47tg B6 1차 베타 섬 세포) 및/또는 투여 경로(신장 캡슐에 직접 주사 대 근육내, i.m. 투여)에 기반하여 상이하였다. 연구 그룹은 다음과 같았다: 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬(luc+) 신장 캡슐 이식물; 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬(luc+) i.m. 이식; 이식 당뇨병 없음 대조군; 마우스 B2M^{-/-} CD47tg B6 1차 베타 섬(luc+) 신장 캡슐 이식물; 및 마우스 B2M^{-/-} CD47tg B6 1차 베타 섬(luc+) i.m. 이식.

[1178] 클러스터 당 약 1500개 세포의 섬 클러스터를 신장 캡슐 주사 또는 i.m. 주사에 의해 마우스에 이식하였다. 신장 캡슐 주사의 경우, 마우스 당 300개의 클러스터(약 450,000개의 세포)를 이식하였다. i.m 주사의 경우, 마우스 당 600개의 클러스터(약 900,000개의 세포)를 주사하였다. 0일차(d0)는 이식일로 정의되었다.

[1179] 세포 생존을 마우스 B2M^{-/-} CD47tg B6 1차 베타 섬에 대해 d0, d3, d5, d7, d9, d11, d13, d17, d21, d25 및 d29에 생물발광 이미징(BLI)에 의해 측정하였다(야생형 B6 1차 베타 섬에 대해, BLI 이미징은 5일차 후에 중단되었는데, 5일차 후에 신호가 검출되지 않았기 때문임). 포도당을 섬 이식 전(STZ전, d-3, d-2, 및 d-1) 및 d0, d3, d14, d21, d28, d30, d31, d32, d36에 4시간 공복 후 측정하였다. d29에, 신장을 신장 캡슐 이식된 코호트로부터 조직병리학적 분석을 위해 제거하였다. 1차 베타 섬 세포 단리는 Li, 등 "A protocol for islet isolation from mousepancreas." *Nat Protoc.* Vol. 4,11(2009):1649-52에 기재된 바와 같이 수행하였으며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 신장 단리는 Mathews 등 "New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus." *Transplantation.* Vol. 73,8(2006):1333-6에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[1180] **B. 결과**

[1181] **마우스 B2M^{-/-} CD47tg B6 1차 베타 섬 세포는 MHC-I 또는 MHC-II를 발현하지 않고, CD47 발현이 증가된다.** 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포에서 MHC-I 및 MHC-II 및 CD47의 발현을 평가하기 위해, 유세포 분석법을 수행하였다. 단리된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포는 이식 전후에 MHC-I 및 MHC-II에 대해 음성이었다(도 1). CD47을 과발현하도록 조작되지 않은 마우스 B2M^{-/-} 1차 베타 섬 세포는 CD47의 낮은 수준 표면 발현을

나타내었다(도 2a에 제시된 바와 같이 이소형 대조군에 비해 3.3-배). 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포는 CD47의 증가된 발현을 나타내었다(도 2b에 제시된 바와 같이 이소형 대조군에 비해 48-배).

[1182] 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포는 동종이계 이식 후에 생존한다. i.m. 주사 후 마우스 1차 베타 섬 세포의 BLI 이미징 결과의 정량화는 도 3a(마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포) 및 도 3c(마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포)에 제시되어 있고 신장 캡슐 주사 후 정량화는 도 4a(마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포) 및 도 4c(마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포)에 제시되어 있다. i.m. 주사 후 마우스 1차 베타 섬 세포의 상응하는 BLI 이미지는 도 3b(마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포) 및 도 3d(마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포)에 제시되어 있고 신장 캡슐 주사 후 이미지는 도 4b(마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포) 및 도 4d(마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포)에 제시되어 있다. 생물발광은 처음에 마우스 1차 베타 섬 세포의 투여 후 모든 그룹에 대한 i.m. 주사 부위에서 관찰되었다. 그러나, 이식된 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포에 대해 검출된 광자 수는 이식 후 처음 5일 동안 급격하게 감소하였으며(도 3a 및 도 4a), 이는 면역 반응으로 인한 것과 마찬가지로 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포의 사망을 나타낸다. 대조적으로, 이식된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포로부터 검출된 광자 수는 이식 후 29일 동안 증가하였으며, 이는 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포의 생존 및 성장을 나타낸다(도 3c 및 도 4c).

[1183] 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포는 동종이계 이식 후 기능한다. 이식된 마우스 1차 베타 섬 세포의 기능을 분석하기 위해, 이식 후 지시된 시점에서 혈당 수준을 측정하였다. 혈당 수준은 미처리(처리되지 않은) 마우스에서 80 내지 120 mg/dL였고 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 >200 mg/dL였다. 야생형 B6 섬의 i.m. 주사 또는 신장 캡슐 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스의 포도당 수준은 각각 도 3e 및 도 4e에 제시된 바와 같이 전체 연구 기간에 걸쳐 높게(>400 mg/dL) 유지되었다. 대조적으로, 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포의 i.m. 주사 또는 신장 캡슐 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 혈당 수준은 각각 도 3f 및 도 4f에 제시된 바와 같이 이식 직후 비당뇨병 수준(80 내지 120 mg/dL)으로 떨어졌다. 신장 캡슐 주사 모델에서, 포도당 수준은 d29에 신장 제거 후에 오르기 시작하였다(도 4f).

[1184] 종합하면, 이들 데이터는 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포가 당뇨병 질환 모델에서 동종이계 이식 후 생존 및 기능(예를 들어, 인해 손실된 포도당 제어 회복)할 수 있었음을 나타낸다.

[1185] **실시예 2 : 이식 연구에서 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포의 면역 기능**

[1186] 마우스 1차 베타 섬 세포에서 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 발현을 감소시키고 CD47 발현을 증가시키는 면역 회피 효과를 연구하기 위해, BALB/c 당뇨병 질환 마우스 모델 수용자(MHC 일배체형 H2^d) 내로 이식된 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포에서 면역 기능 검정을 수행하였다. 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포, 및 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포와 비교하여, 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포의 이식에 의해 도출된 생존 및 면역 반응을 평가하였다.

[1187] **A. 방법**

[1188] **이식 연구 설계 및 투여.** 15 마리의 BALB/c MHC 일배체형 H2^d 마우스(마우스 체중 18-20 g)를 당뇨병을 유도하기 위한 STZ 근육내(i.m.) 투여 후 5개의 연구 그룹(연구 그룹 당 n=5)로 무작위 배정하였으며, 이 그룹은 투여된 세포에 기반하여 상이하였다(야생형 대 B2M^{-/-} CD47tg B6 섬 세포). 연구 그룹은 다음과 같았다: 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포(luc+) i.m. 이식; 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포(luc+) i.m. 이식 및 이식 당뇨병 없음 대조군.

[1189] 클러스터 당 약 600개 세포의 섬 클러스터를 i.m. 주사에 의해 마우스에 이식하였다. i.m. 주사의 경우, 마우스 당 600개의 클러스터(약 900,000개의 세포)를 주사하였다. 0일차(d0)는 이식일로 정의되었다. 포도당을 섬 이식 전 4시간의 공복(STZ전, d-3, d-2, 및 d-1) 및 d6에 측정하였다. d6에, 면역 검정 분석을 위해 마우스를 희생시켰다.

- [1190] T 세포 효소 결합 면역 흡착 SPOT(ELISPOT) 검정. 마우스 1차 베타 섬 세포에서 인터페론 감마(IFN γ)-분비 CD8(+) T 세포를 ELISPOT에 의해 검출하였다.
- [1191] 유세포 분석법. 1차 베타 섬 세포에서 공여자 특이적 항체(DSA)의 발현을 유세포 분석법에 의해 평가하였다.
- [1192] **B. 결과**
- [1193] 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포는 동종이계 이식 후 기능한다. 이식된 베타 섬 세포의 기능을 분석하기 위해, 이식한 지 6일 후에 혈당 수준을 측정하였다. 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 포도당 수준은 도 5a에 제시된 바와 같이 전체 연구 기간에 걸쳐 높게(>400 mg/dL) 유지되었다. 대조적으로, 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 혈당 수준은 도 5a에 제시된 바와 같이 이식 직후 떨어졌다. 이들 데이터는 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포가 동종이계 이식 후에 기능(예를 들어, 당뇨병으로 인해 손실된 포도당 제어 회복)할 수 있었음을 나타낸다.
- [1194] 동종이계 이식 후 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포 면역 반응. 이식된 베타 섬 세포에 대한 면역 반응을 분석하기 위해, ELISPOT 검정을 사용하여 CD8+ T 세포에 의한 IFN γ 사이토카인 분비 수준을 평가하였다. 도 5b에 제시된 바와 같이, 이식된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포는 이식된 마우스 야생형 1차 베타 섬 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 IFN γ 를 나타내었다. 또한 유세포 분석법에 의해 측정된 DSA IgG 수준은 이식된 마우스 야생형 1차 베타 섬 세포와 비교하여 이식된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포에서 더 낮았다(도 5c).
- [1195] 이들 데이터는 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포가 이식 시 세포에 대한 면역 반응을 유도하지 않고, 투여 시 NK 세포 매개 세포독성을 회피할 수 있고, 항체 매개 거부로부터 보호된다는 것을 나타낸다.
- [1196] **실시예 3 : 시험관 내에서 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg 1차 베타 섬 세포의 면역 회피**
- [1197] 1차 베타 섬 세포에서 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 발현을 감소시키고 CD47 발현을 증가시키는 면역 회피 효과를 연구하기 위해, 자연 살해(NK) 및 대식세포 사멸 검정을 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성된 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포에서 수행하였다. 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포 및 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포와 비교하여, NK 및 대식세포에 의한 시험관 내 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포의 사멸을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.
- [1198] **A. 방법**
- [1199] NK 세포 배양. 검정을 수행하기 전에 인간 1차 NK 세포(StemCell Technologies)를 RPMI-1640 + 10% 혈청 페니실린-스트렙토마이신(pen/strep)에서 배양하였다.
- [1200] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 대식세포 분화. PBMC를 Ficol1 분리에 의해 신선한 혈액으로부터 분리하고 10% 혈청 pen/strep를 함유하는 RPMI-1640에 재현탁하였다. 세포를 10 ng/mL 인간 대식세포-콜로니 자극 인자(M-CSF)의 존재 하에 플레이팅하였다. 6일차 되는 날로부터, 인간 IL-2를 검정을 수행하기 24시간 전에 배지에 첨가하였다.
- [1201] NK 세포 및 대식세포 사멸 검정. NK 세포 사멸 검정 및 대식세포 사멸 검정을 XCelligence SP 플랫폼 및 MP 플랫폼(ACEA Biosciences)에서 수행하여 세포 증식 및 세포 생존력의 무라벨(label-free) 모니터링을 제공하였다. 4 x 10⁵개의 마우스 야생형 B6 1차 베타 섬 세포, 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포, 또는 마우스 B2M^{-/-}, CD47tg B6 1차 베타 섬 세포(풀링 및 단일 클론)를 96-웰 콜라겐 코팅된 E-플레이트에 플레이팅하였다. XCelligence 소프트웨어를 사용하여 부착 및 그에 따른 세포 사멸의 척도로서 세포 지수(CI)를 측정하였다(세포 지수의 감소는 세포 사멸의 증가를 나타냄). CI 값이 0.7에 도달한 후, 인간 NK 세포 또는 인간 대식세포를 1 ng/mL 인간 IL-2 또는 인간 IL-15가 있거나 없이 0.5:1, 0.8:1, 또는 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 비로 첨가하였다. 일부 경우에, 표적 세포를 첨가하기 전에 NK 세포를 인간 Fc 수용체(FcR) 블록(농도 1:5)으로 전처리하였다. 일부 웰을 항-MIAP410 차단 항체(10 μ g/mL, 클론 B6.H12, 마우스 IgG1, κ)로 전처리하였다.

[1202] 유세포 분석법. 1차 베타 섬 세포 상에서 CD47의 표면 발현을 항체 특이적 시약을 사용하여 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 이소형 항체를 대조군으로서 사용하였다.

[1203] **B. 결과**

[1204] *마우스 B2M^{-/-};CD47tg 1차 베타 섬 세포는 NK 세포 및 대식세포 사멸을 회피한다.* 야생형 B6 마우스로부터 단리된 1차 베타 섬 세포(마우스 WT B6 1차 베타 섬 세포)의 NK- 및 대식세포-매개 세포 사멸은 항- MIAP410 항체의 존재 또는 부재 하에 관찰되지 않았다(도 6a 및 6d, NK 세포; 및 도 7a 및 7d, 대식세포). 대조적으로, 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포는 NK 세포(도 6b) 및 대식세포(도 7b)에 의해 사멸되었으며, 이는 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포가 NK 세포 및 대식세포에 의해 외래 세포로서 인식되어, 세포 사멸을 초래하였음을 나타낸다. 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포와 NK 세포 또는 대식세포의 공배물에 항-MIAP410 항체를 첨가하면 세포 사멸에 추가로 영향을 미치지 않았다(도 6e 및 7e).

[1205] 대조적으로, 마우스 B2M^{-/-}CD47tg B6 1차 베타 섬 세포는 NK-매개 세포 사멸(도 6c) 또는 대식세포-매개 세포 사멸(도 7c)을 나타내지 않았다. 그러나, 항- MIAP410 항체의 존재 하에, CD47 보호 효과가 감소되었고 NK 세포(도 6f) 및 대식세포(도 7f) 둘 다에 의한 세포 사멸이 관찰되었으며, CD47 이식유전자로 조작되지 않은 마우스 B2M^{-/-} B6 1차 베타 섬 세포로 관찰된 결과와 유사하였다(도 6b 및 6e, NK 세포; 및 도 7b 및 7e, 대식세포). 이들 데이터는 마우스 B2M^{-/-}; CD47tg B6 1차 베타 섬 세포가 NK 세포 및 대식세포에 의해 면역 반응을 효과적으로 회피한다는 것을 나타낸다.

[1206] *NK 세포 사멸의 마우스 B2M^{-/-};CD47tg 1차 베타 섬 세포 회피에 대한 CD47 발현.* 야생형 B6 마우스로부터 단리된 다양한 B2M^{-/-};CD47tg 1차 베타 섬 세포(마우스 WT B6 1차 베타 섬 세포)의 NK-매개 세포 사멸은 달라지는 CD47 이식유전자 발현과의 상관적 요소로서 관찰되었다. CD47 이식유전자의 과발현이 더 낮은 마우스 B2M^{-/-};CD47tg B6 1차 베타 섬 세포는 NK-매개 세포 사멸을 나타내었다(도 8a-8h). 대조적으로, CD47 이식유전자의 과발현이 더 높은 마우스 B2M^{-/-};CD47tg B6 1차 베타 섬 세포는 NK-매개 세포 사멸을 나타내지 않았다(도 8i-8n). 이들 결과는 1차 베타 섬 세포에서 CD47 과발현이 NK 세포에 의한 면역 반응을 회피하는 데 효과적이라는 것을 확인시켜 준다.

[1207] **실시예 4 : B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 시험관 내 특성화**

[1208] 이 실시예는 (1) B2M(B2M^{-/-})을 녹아웃시켜 HLA 클래스 I 발현을 감소시키고 (2) 외인성 CD47(CD47tg)을 과발현하도록 조작된 저면역 1차 인간 베타 섬 세포를 특징으로 하는 연구를 기재한다. 야생형(WT) 1차 인간 베타 섬 세포 또는 B2M^{-/-} 1차 인간 베타 섬 세포와 비교하여, 저면역(B2M^{-/-}; CD47tg) 1차 베타 섬 세포를 인슐린 분비에 대해 그리고 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포에 의한 세포 사멸로부터의 보호에 대해 모니터링하였다. WT 인간 1차 섬 세포는 HLA 클래스 II를 발현하지 않으므로(도 9c) HLA 클래스 II 분자의 발현을 변경하도록 조작되지 않았다. 저면역 세포 및 B2M^{-/-} 세포는 WT 세포로부터 조작되었으므로 동일한 공여자로부터 유래된다.

[1209] **A. 방법**

[1210] *인간 1차 섬 세포의 생성 및 세포 조작.* 1차 베타 섬 세포는 표준 기술을 사용하여 2명의 사체 공여자(공여자 1 및 공여자 2)로부터 단리하였다. 이러한 기술은 J. Kerr-Conte 등, *Transplantation*, 89, 2010에 기재된 바와 같은 것을 포함하여 당업계에 알려져 있다. 저면역 세포를 생성하기 위해, 단리된 세포를 표준 CRISPR/Cas9 유전자 편집 기술을 사용하여 B2M을 녹아웃하도록 조작하고, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 CD47 단백질을 암호화하는 이식유전자(tg)로 형질도입하였다. 저면역 섬을 HLA 클래스 I/II 및 CD47 과발현에 대해 음성인 세포에 대해 유세포 분석법으로 분류하였다.

[1211] *인슐린 분비.* 표준 포도당 자극 인슐린 분비(GSIS) 검정을 사용하여 시험관 내 인슐린 분비를 측정하였다. U-PLEX® Meso Scale Discovery(MSD) 검정을 사용하여 인슐린 분비를 검출하였다. 간단히 말해서, 100,000개의 세포를 2 mL의 배지에 사용하였고, 24시간에 걸쳐 총 인슐린 분비를 측정하였다.

[1212] *유세포 분석법.* 인간 1차 섬 세포 상에서 HLA 클래스 I, HLA 클래스 II, 및 CD47의 표면 발현을 항체 특이적 시

약을 사용하여 유세포 측정법에 의해 평가하였다. 이소형 항체를 대조군으로서 사용하였다.

[1213] *NK 세포 및 대식세포 사멸 검정*. NK 세포 사멸 검정 및 대식세포 사멸 검정을 XCelligence SP 플랫폼 및 MP 플랫폼(ACEA Biosciences)에서 수행하여 세포 증식 및 세포 생존력의 무라벨 모니터링을 제공하였다. 4×10^5 개의 야생형 인간 1차 섬 세포, $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포, 또는 $B2M^{-/-}$, $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포(폴링 또는 단일 클론)를 96-웰 콜라겐 코팅된 E-플레이트에 플레이팅하였다. XCelligence 소프트웨어를 사용하여 부착 및 그에 따른 세포 사멸의 척도로서 세포 지수(CI)를 측정하였다(세포 지수의 감소는 세포 사멸의 증가를 나타냄). CI 값이 0.7에 도달한 후, 인간 1차 NK 세포 또는 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF)를 갖는 말초 혈액 단핵 세포로부터 분화된 인간 대식세포를 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 비로 첨가하였다.

[1214] **B. 결과**

[1215] 연구 결과는 아래에 요약되어 있다. 1명의 공여자에 대한 대표적인 결과가 제시되지만 적어도 2명의 추가 공여자에 대해 유사한 결과가 관찰되었다.

[1216] $B2M^{-/-}$ $CD47tg$ 편집은 인간 1차 섬 세포의 세포 형태 또는 구성에 영향을 미치지 않는다. 세포 형태를 회피하기 위해, 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI), 인슐린, 및 글루카곤에 대한 면역조직화학(IHC) 염색을 WT 인간 1차 섬 세포 및 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 수행하였다. 결과는 형태의 차이가 없음을 입증하였으며 이는 인간 1차 섬에 대한 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 편집이 인간 1차 섬 형태에 영향을 미치는 것으로 보이지 않는다는 것을 나타낸다. 더욱이, $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 편집은 WT 인간 1차 섬 세포 조성물과 비교하여 인간 1차 섬 세포 조성물에 영향을 미치지 않는다(도 9a).

[1217] $B2M^{-/-}$ $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 HLA-I 또는 HLA-II를 발현하지 않고, $CD47$ 발현이 증가된다. $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 HLA-I 및 HLA-II 및 $CD47$ 의 발현을 평가하기 위해, 유세포 분석법을 수행하였다. $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 HLA-I(도 9c) 및 HLA-II(도 9e)에 대해 음성이었던 반면, WT 인간 1차 섬 세포는 HLA 클래스 I을 높은 수준으로 발현하고(도 9b) HLA 클래스 II를 발현하지 않았다(도 9d). $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 WT 인간 1차 섬 세포(도 9f)와 비교하여 $CD47$ 의 증가된 발현(도 9g에 제시된 바와 같이, 이소형 대조군에 비해 48-배 및 51-배)을 나타내었다.

[1218] $B2M^{-/-}$ $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 인슐린 분비 능력을 유지한다. $B2M^{-/-}$ $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 대표적인 공여자에 대해 도 9h에 제시된 바와 같이 시험관 내에서 WT 인간 1차 섬 세포에 대한 유사한 인슐린 분비 능력을 유지하였다. 이들 데이터는 베타 섬 세포에 대한 저면역 변형이 인슐린 분비에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다.

[1219] $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬은 NK 세포 및 대식세포 사멸을 회피한다. WT 인간 1차 섬 세포는 NK 세포(도 9i) 또는 대식세포(도 9l)에 의해 사멸되지 않았다. 대조적으로, HLA 클래스 I 및 HLA 클래스 II의 감소된 발현을 갖는 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포는 NK 세포(도 9j) 및 대식세포(도 9m)에 의해 사멸되었으며, 이는 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포가 NK 세포 및 대식세포에 의해 외래 세포로서 인식되었으므로, 세포 사멸을 초래한다는 것을 나타낸다.

[1220] 대조적으로, $B2M^{-/-}$ $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 NK-매개 세포 사멸(도 9k) 또는 대식세포-매개 세포 사멸(도 9n)을 나타내지 않았다. 이들 데이터는 저면역($B2M^{-/-}$; $CD47tg$) 인간 1차 섬 세포가 $CD47$ 과발현에 의해 보호되고 NK 세포 및 대식세포에 의해 면역 반응을 효과적으로 회피할 수 있다는 것을 나타낸다.

[1221] **실시예 5 : 당뇨병 인간화 마우스 이식 연구에서 $B2M^{-/-}$ 및 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 생존 및 기능**

[1222] 저면역($B2M^{-/-}$; $CD47tg$) 및 이중 녹아웃($B2M^{-/-}$) 인간 1차 섬 세포를 실시예 4에 기재된 바와 같이 생성하고, 동종이계 당뇨병 인간화 NSG-SGM3 수용자 마우스에 이식하였다. 마우스에서 당뇨병의 유병률, 및 이식된 야생형 인간 1차 섬 세포와 비교하여 이식된 $B2M^{-/-}$ 및 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 생존 및 기능을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.

[1223] **A. 방법**

- [1224] 이식 연구 설계 및 투여. 25 마리의 인간화 NSG-SGM3 마우스(마우스 체중 18-20 g)를 당뇨병을 유도하기 위해 STZ 투여 후 연구 그룹으로 무작위 배정하였으며, 이 그룹은 투여되는 세포(야생형, B2M^{-/-} CD47tg, 및 B2M^{-/-} 인간 베타 섬 세포)에 기반하여 상이하였다. 연구 그룹은 다음과 같았다: 야생형 인간 섬(luc+) i.m. 이식; 이식 당뇨병 없음 대조군; B2M^{-/-} 인간 섬(luc+) i.m. 이식; 및 B2M^{-/-} CD47tg 인간 섬(luc+) i.m. 이식.
- [1225] 클러스터 당 약 1,500개 세포의 300개 인간 섬 클러스터를 i.m. 주사에 의해 마우스에 이식하였다. 0일차(d0)는 이식일로 정의되었다. 마우스를 베타 섬 세포 생존의 지표로서 생물발광(BLI)에 대해 그리고 당뇨병을 모니터링 하기 위해 4시간 공복 후 포도당 수준에 대해 모니터링하였다. 포도당 유발은 연구 29일차에 수행하였다.
- [1226] T 세포 효소 결합 면역 흡착 SPOT(ELISPOT) 검정. 인간 1차 섬 세포에서 인터페론 감마(IFNg)-분비 CD8(+) T 세포를 ELISPOT에 의해 검출하였다.
- [1227] C-펩티드 검정. C 인간 1차 섬 세포에서 C-펩티드 수준은 표준 검정을 사용하여 측정하였다.
- [1228] 비장세포 사멸 검정. 비장세포 사멸 검정을 XCelligence SP 플랫폼 및 MP 플랫폼(ACEA Biosciences)에서 수행 하여 세포 증식 및 세포 생존력의 무라벨 모니터링을 제공하였다. 4×10^5 개의 야생형 인간 1차 섬 세포, B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포, 또는 B2M^{-/-}, CD47tg 인간 1차 섬 세포(플링 또는 단일 클론)를 96-웰 콜라겐 코팅된 E-플레이트에 플레이팅하였다. XCelligence 소프트웨어를 사용하여 부착 및 그에 따른 세포 사멸의 척도로서 세포 지수(CI)를 측정하였다(세포 지수의 감소는 세포 사멸의 증가를 나타냄). CI 값이 0.7에 도달한 후, 인간 비장세포를 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 비로 첨가하였다.
- [1229] 보체 의존적 세포독성(CDC) 검정. B2M^{-/-}, CD47tg 인간 1차 섬 세포를 혈청과 함께 인큐베이션하고 XCelligence MP 플랫폼(ACEA Biosciences)에서 인큐베이션 시간에 따른 세포 용해를 측정함으로써 CDC를 분석하여 세포 증식 및 세포 생존력의 무라벨 모니터링을 제공하였다. 임피던스의 변화는 세포 지수(CI)로 보고하였다(세포 지수의 감소는 세포 용해 또는 사멸의 증가를 나타냄).
- [1230] **B. 결과**
- [1231] 연구 결과는 아래에 요약되어 있다. 대표적인 공여자 결과가 제시되지만 다양한 공여자에 대해 유사한 결과가 관찰되었다.
- [1232] B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포는 동종이계 이식 후 생존한다. i.m. 주사 후 인간 1차 섬 세포의 BLI 이미징 결과의 정량화는 도 10a(B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포) 및 도 10c(WT 인간 1차 섬 세포)에 제시되어 있다. i.m. 주사 후 인간 1차 섬 세포의 상응하는 BLI 이미지는 도 10b(WT 인간 1차 섬 세포) 및 도 10d(B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포)에 제시되어 있고, B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포의 BLI 이미지는 도 20a에 제시되어 있다. 생물발광은 처음에 세포의 투여 후 모든 그룹에 대해 i.m. 주사 부위에서 관찰되었다. 그러나, 이식된 WT 인간 1차 섬 세포에 대해 검출된 광자 수는 이식 후 처음 5일에 걸쳐 급격하게 감소되었으며(도 10c 및 10d), 이는 면역 반응으로 인한 것과 마찬가지로 WT 인간 1차 섬 세포의 사망을 나타낸다. WT 인간 1차 섬 세포와 유사하게, B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포의 수는 이식 후 처음 5일에 걸쳐 급격하게 감소되었다(도 10g). 대조적으로, 이식된 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포로부터 검출된 광자 수는 이식 후 29일에 걸쳐 증가하였으며, 이는 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 생존 및 성장을 나타낸다(도 10a 및 10b). B2M^{-/-}CD47tg 인간 1차 섬 세포는 국 소 면역 반응을 유도하지 않으면서 1개월 동안 생존할 수 있다(데이터는 제시되지 않음).
- [1233] B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포는 동종이계 이식 후 기능한다. 이식된 인간 1차 섬 세포의 특정 기능을 분석하 기 위해, 이식한지 6일 후에 혈장 수준을 측정하였다. WT 인간 1차 섬 세포 및 B2M^{-/-} 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 공복 약 4시간 후에 포도당 수준을 측정하였으며 각각 도 10f 및 도 10h에 제시된 바와 같이 전체 연구 기간에 걸쳐 높게(>400 mg/dL) 유지되었다. 대조적으로, B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 공복 혈당 수준은 도 10e에 제시된 바와 같이 이식 직후 떨어졌다. 추가로, B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 마우스는 29일 차에 포 도당 유발을 성공적으로 견뎌내었다(도 10e).

- [1234] 이식된 인간 1차 섬 세포의 기능을 추가로 분석하기 위해, 이식 후에 C-펩티드 수준을 측정하였다. WT 인간 1차 섬 세포 및 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 C-펩티드 수준은 각각 **도 11b** 및 **11c**에 제시된 바와 같이 낮았다. 대조적으로, $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 마우스는 높은 수준의 C-단백질을 가졌다(**도 11a**).
- [1235] 이들 데이터는 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포가 동종이계 이식 후에 기능(예를 들어, 당뇨병으로 인해 손실된 포도당 제어 복구)할 수 있었음을 나타낸다.
- [1236] 동종이계 이식 후 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포 면역 반응. 이식된 인간 1차 섬 세포에 대한 면역 반응을 분석하기 위해, ELISPOT 검정을 사용하여 CD8+ T 세포에 의한 IFN γ 사이토카인 분비 수준을 평가하였다. **도 10i**에 제시된 바와 같이 이식된 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포 및 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 이식된 야생형 인간 1차 섬 세포와 비교하여 더 낮은 수준의 IFN γ 를 나타내었다. 이들 결과는 ELISPOT에 의해 결정된 바와 같이 이식 후 야생형 베타 섬이 TH1 활성화를 나타낸다는 관찰과 일치한다. 유세포 분석법에 의해 측정된 DSA IgM 수준은 또한 이식된 야생형 1차 베타 섬 세포와 비교하여 이식된 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포 및 이식된 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 더 낮았으며, 이는 야생형 베타 섬이 공여자 특이적 항체 결합(IgM)을 보여준다는 것을 나타낸다(**도 10j**).
- [1237] 이 데이터는 이식된 야생형 인간 1차 섬 세포가 적응성 면역 반응을 나타내는 반면, 이식된 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포 및 이식된 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포가 적응성 면역 반응을 나타내지 않는다는 것을 나타낸다.
- [1238] $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 및 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포는 동종이계 이식 후 비장세포 사멸을 회피한다. 이식된 WT 인간 1차 섬 세포는 **도 12a**의 상단 패널에 제시된 바와 같이 비장 세포에 의해 사멸되었으며, 이는 이식된 WT 인간 1차 섬 세포가 비장세포에 의해 외래 세포로 인식되었으므로, 세포 사멸을 초래한다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 이식된 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포 및 이식된 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포는 비장세포-매개 세포 사멸을 나타내지 않았다(**도 12a**, 중간 및 상단 패널). 이들 데이터는 이식된 저면역($B2M^{-/-}$; $CD47tg$) 및 이식된 이중 녹아웃($B2M^{-/-}$) 인간 1차 섬 세포가 비장세포에 의해 면역 반응을 효과적으로 회피할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [1239] $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 및 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포는 동종이계 이식 후 CDC를 겪지 않는다. 이식된 인간 1차 섬 세포에 대한 면역 반응을 추가로 분석하기 위해, CDC 검정을 사용하였다. WT 인간 1차 섬 세포는 **도 12b**의 상단 패널에 제시된 바와 같이 CDC 검정에서 사멸되었으며, 이는 WT 인간 1차 섬 세포가 인식되어 세포 사멸을 초래하였다는 것을 나타낸다. 대조적으로, $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 및 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포는 CDC 세포 사멸을 나타내지 않았다(**도 12b**, 중간 및 상단 패널). 이들 데이터는 저면역($B2M^{-/-}$; $CD47tg$) 및 이중 녹아웃($B2M^{-/-}$) 인간 1차 섬 세포가 CDC를 효과적으로 회피할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [1240] **실시예 6: 시험관 내에서 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 면역 회피**
- [1241] 인간 1차 섬 세포에서 HLA 클래스 I 및 HLA 클래스 II 발현을 감소시키고 CD47 발현을 증가시키는 면역 회피 효과를 연구하기 위해, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 사멸 검정을 실시예 4에 기재된 바와 같이 생성된 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 수행하였다. 제I형 당뇨병 환자로부터의 PBMC 또는 건강한 공여자로부터의 PBMC를 시험관 내에서 WT 인간 1차 섬 세포 또는 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포와 함께 인큐베이션하고 시간 경과에 따라 사멸을 모니터링하였다.
- [1242] **A. 방법**
- [1243] **PBMC 단리 및 배양.** PBMC를 신선한 혈액으로부터 Ficoll 분리에 의해 5명(5)의 제I형 당뇨병 인간 환자 또는 3명(3)의 건강한 공여자로부터 단리하고, 10% 혈청 pen/strep를 함유하는 RPMI-1640에 재현탁하였다.
- [1244] **PBMC 사멸 검정.** PBMC 세포 사멸 검정을 XCelligence SP 플랫폼 및 MP 플랫폼(ACEA Biosciences)에서 수행하여 세포 증식 및 세포 생존력의 무라벨 모니터링을 제공하였다. 4×10^5 개의 WT 인간 1차 섬 세포 또는 $B2M^{-/-}$,

CD47 tg 인간 1차 섬 세포를 96-웰 콜라겐 코팅된 E-플레이트에 플레이팅하였다. XCelligence 소프트웨어를 사용하여 부착 및 그에 따른 세포 사멸의 척도로서 세포 지수(CI)를 측정하였다(세포 지수의 감소는 세포 사멸의 증가를 나타냄). CI 값이 0.7에 도달한 후, 인간 PBMC 세포를 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 비로 첨가하였다.

[1245] 유세포 분석법. 인간 1차 섬 세포의 PBMC 사멸을 유세포 분석법에 의해 평가하여 PerCP-Cy5를 사용하여 죽은 세포의 백분율을 정량화하였다.

[1246] **B. 결과**

[1247] 연구 결과는 아래에 요약되어 있다. 대표적인 결과는 1명의 공여자에 대해 제시되지만 두 공여자에 대해 유사한 결과가 관찰되었다.

[1248] B2M $^{-/-}$;CD47 tg 인간 1차 섬 세포는 당뇨병 PBMC 사멸을 회피한다. 당뇨병 PBMC를 WT 인간 1차 섬 세포의 제I형 당뇨병 매개 세포 사멸을 갖는 각 환자로부터 단리하였으며; 1명의 제I형 당뇨병 환자로부터 단리된 PBMC로부터의 대표적인 결과가 도 13a에 제시되어 있다. 건강한 공여자로부터의 PBMC는 도 13e에서 대표적인 건강한 공여자 PBMC에 대해 제시된 바와 같이 WT 인간 1차 섬 세포를 사멸하지 않았다. PBMC와의 인큐베이션 없이 WT 인간 1차 섬 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(도 13b 및 도 13f). 사멸이 죽은 세포에 대해 유세포 분석법에 의해 평가되었을 때 유사한 결과가 관찰되었다(도 13i). 이들 결과는 WT 인간 1차 섬 세포가 당뇨병 PBMC에 의해 외래 세포로서 인식되었으므로, 세포 사멸을 초래한다는 것을 나타낸다.

[1249] 대조적으로, B2M $^{-/-}$ CD47 tg 인간 1차 섬 세포는 당뇨병 PBMC(도 13c, 1명의 환자로부터의 당뇨병 PBMC에 대한 대표적인 결과) 또는 건강한 PBMC(도 13g, 1명의 건강한 공여자로부터의 PBMC에 대한 대표적인 결과)에 의해 사멸되지 않았다. PBMC와의 인큐베이션 없이 B2M $^{-/-}$ CD47 tg 인간 1차 섬 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(도 13d 및 도 13h). 사멸이 죽은 세포에 대해 유세포 분석법에 의해 평가되었을 때 유사한 결과가 관찰되었다(도 13j). 이들 데이터는 B2M $^{-/-}$; CD47 tg 인간 1차 섬 세포가 당뇨병 PBMC에 의한 면역 반응을 효과적으로 회피한다는 것을 나타낸다.

[1250] **실시예 7 : 시험관 내에서 항-CD47 용합 단백질을 사용한 B2M $^{-/-}$; CD47 tg 인간 1차 섬 세포에서의 CD47 신호전달 평가**

[1251] 이 실시예는 (1) B2M(B2M $^{-/-}$)을 녹아웃시켜 HLA 클래스 I 발현을 감소시키고 (2) 외인성 CD47(CD47 tg)을 과발현하도록 조작된 저면역 1차 인간 베타 섬 세포에 의한 CD47 차단을 특징으로 하는 연구를 기재한다. 저면역(B2M $^{-/-}$; CD47 tg) 인간 1차 섬 세포는 실시예 4에 기재된 바와 같이 생성되었다. 항-CD47 Fc 용합 단백질(즉, 항-CD47 IgG1Fc 및 항-CD47 IgG4Fc)의 존재 하에 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포에 의한 세포 사멸을 B2M $^{-/-}$; CD47 tg 인간 1차 섬 세포와 비교하여 B2M $^{-/-}$; CD47 tg 인간 1차 섬 세포에 대해 평가하였다. CD47 결합으로 인해 세포독성 생성물의 생성 및 대식세포의 식세포작용을 또한 평가하였다.

[1252] **A. 방법**

[1253] NK 세포 및 대식세포 사멸 검정. NK 세포 사멸 검정 및 대식세포 사멸 검정을 상기 실시예에 기재된 바와 같이 실질적으로 수행하였다.

[1254] 세포독성 생성물의 검출. 그랜자임, 퍼포린, 및 반응성 산소 종(ROS)을 제조업체의 지침에 따라 Invitrogen(인간 그랜자임 B ELISA 키트 및 인간 퍼포린 ELISA 키트) 및 Biosource(인간 반응성 산소 종 ELISA 키트)의 상업적으로 입수가능한 키트를 사용하여 ELISA에 의해 검출하였다.

[1255] 식세포작용 검정. 항-CD47 항체(100 μ g/ml)를 B2M $^{-/-}$, CD47 tg 인간 1차 섬 세포 및 대식세포와 함께 인큐베이션 하였다. 일부 조건의 경우 항-CD47 IgG1Fc 또는 항-CD47 IgG4Fc를 또한 첨가하였다. 1시간 인큐베이션 후 유세포 분석법에 의해 pHrodoTM 식세포작용 검정을 사용하여 베타 섬 세포의 식세포작용을 평가하였다.

[1256] **B. 결과**

[1257] 연구 결과는 아래에 요약되어 있다. 대표적인 결과는 1명의 공여자에 대해 제시되지만 두 공여자에 대해 유사한 결과가 관찰되었다.

- [1258] 항-CD47 Fc 융합 단백질을 발현하는 $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 NK 세포 및 대식세포에 의해 사멸된다. $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 NK-매개 세포 사멸(도 14a) 또는 대식세포-매개 세포 사멸(도 14d)을 나타내지 않았으며, 이는 저면역($B2M^{-/-}; CD47tg$) 인간 1차 섬 세포가 CD47 과발현에 의해 보호되고 NK 세포 및 대식세포에 의해 면역 반응을 효과적으로 회피할 수 있다는 것을 나타낸다. 세포 사멸로부터의 보호는 NK-매개 세포 사멸(각각 도 14b 및 14c) 또는 대식세포-매개 세포 사멸(각각 도 14e 및 14f)에 대해 제시된 바와 같이 항-CD47 IgG1Fc 또는 항-CD47 IgG4Fc 융합 단백질에 의해 차단되었다. 이들 데이터는 $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 CD47-SIRP 신호전달의 차단이 NK 세포 및 대식세포에 의해 외래 세포로서 인식되므로, 세포 사멸을 유발한다는 것을 나타내고, CD47의 과발현이 변형된 세포에 의한 면역 회피에 기여한다는 것을 추가로 확인시켜 준다.
- [1259] $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 항-CD47 Fc 융합 단백질이 첨가될 때 세포독성 생성물을 생성한다. 도 15a-15c,에 제시된 바와 같이, $B2M^{-/-}; CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 더 낮은 수준의 그랜자임 B(도 15a), 퍼포린(도 15b), 및 ROS(도 15c)를 나타내었지만, 이들 세포독성 생성물의 수준은 항-CD47 IgG1Fc 또는 항-CD47 IgG4Fc 융합 단백질의 존재 하에 실질적으로 더 높았다. 사멸은 이들 세포독성 생성물의 방출에 의해 매개되므로, 이들 데이터는 두 융합 단백질, IgG1 및 IgG4에 의한 CD47-SIRP 신호전달의 차단이 변형된 1차 베타 섬 세포의 사멸을 유도한다는 것을 나타낸다.
- [1260] **실시예 8 : 하나의 예시적인 공여자로부터의 시험관 내 $B2M^{-/-}; CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 적응성 면역 반응**
- [1261] $B2M^{-/-}; CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 대식세포 세포 사멸 메커니즘을 조사하고, CD47의 과발현이 어떻게 사멸에 영향을 미치는지를 이해하기 위해, 식세포작용 검정을 수행하였다. 구체적으로, HLA-I/II KO 세포는 "자기 상실"로 인해 대식세포에 의한 사멸을 유도하므로, 세포-사멸의 관찰된 메커니즘이 세포독성 생성물의 방출에 비해 식세포작용에 의한 것이었는지를 밝히기 위해 연구를 수행하였다. 추가로, CD47의 과발현이 대식세포에 의한 죽어가는/죽은 세포의 제거율 메커니즘에 영향을 미치는지를 평가하기 위해 전체, 세포사멸성, 및 괴사성 세포로 또한 수행하였다.
- [1262] **A. 방법**
- [1263] 유세포 분석법. 인간 1차 섬 세포 내 CD47의 발현을 유세포 분석법에 의해 평가하였다.
- [1264] 식세포작용 검정. 야생형 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성), $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성), $B2M^{-/-}; CD47tg$ 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성)를 대식세포와 함께 인큐베이션하였다. 일부 경우에, FcR에 결합하여 식세포작용을 매개하는 항-CD47 IgG1 항체를 첨가하였다. 1시간 인큐베이션 후 유세포 분석법에 의한 pHrodo™ 식세포작용 검정을 사용하여 베타 섬 세포 세포의 식세포작용을 평가하였다.
- [1265] **B. 결과**
- [1266] 연구 결과는 아래에 요약되어 있다. 대표적인 공여자 결과가 제시되어 있다.
- [1267] 이전 결과와 일치하게, 유세포 분석법은 CD47을 과발현하도록 조작되지 않은 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포가 CD47의 더 낮은 수준 표면 발현(도 16, 왼쪽 패널에 제시된 바와 같이 이소형 대조군에 비해 2-배)을 나타낸 반면, $B2M^{-/-}; CD47tg$ 1차 베타 섬 세포가 CD47의 증가된 발현(도 16, 오른쪽 패널에 제시된 바와 같이 이소형 대조군에 비해 28-배)을 보였다는 것을 확인시켜 준다.
- [1268] 도 17에 제시된 바와 같이, 전체 야생형 인간 1차 섬 세포, 전체 $B2M^{-/-}$ 인간 1차 섬 세포, 및 전체 $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 대식세포에 의한 식세포작용을 회피한다. 대조적으로, 각 세포 유형의 괴사성 및 세포사멸성 인간 1차 섬 세포는 대식세포에 의해 식세포작용되었다. 따라서, CD47 과발현은 세포사멸성 또는 괴사성 $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 식세포작용을 방지하지 않으며, 이는 섬 거부 후 중요할 수 있다. 더욱이, 항-CD47 IgG1 융합 단백질은 $B2M^{-/-};CD47tg$ 인간 1차 섬 세포(전체, 세포사멸성, 및 괴사성)의 식세포작용을 유도한다.

- [1269] **실시예 9 : B2M^{-/-}, CD47tg 인간 1차 섬 세포의 Ig 매개 식세포작용 평가**
- [1270] IgG1 Fc 또는 IgG4 Fc인 항-CD47 항체(100 µg/ml)를 B2M^{-/-}, CD47tg 인간 1차 섬 세포 및 비인간 영장류(NHP) 대식세포와 함께 인큐베이션하였다. 1시간 인큐베이션 후 유세포 분석법에 의한 pHrodo™ 식세포작용 검정을 사용하여 베타 섬 세포의 식세포작용을 평가하였다.
- [1271] 도 18에 제시된 바와 같이, B2M^{-/-};CD47tg 인간 1차 섬 세포 및 대식세포(Mac) 단독 대조군은 대식세포에 의해 식세포작용되지 않았다. 대조적으로, 항-CD47 IgG1 Fc와 함께 인큐베이션하였지만, 항-CD47-IgG4 Fc와 인큐베이션하지 않은 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포는 식세포작용되었다. 관찰된 식세포작용은 항체-의존적 세포 식세포작용(ADCP)을 통한 IgG1 Fc 결합으로 인한 것이었다. IgG4 결합은 IgG1만큼 강한 FcR 결합을 초래하지 않았으며, IgG4 Fc의 더 낮은 수준의 식세포작용과 일치한다.
- [1272] **실시예 10 : 면역 무능 당뇨병 마우스 이식 연구에서 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 생존 및 기능**
- [1273] 저면역(B2M^{-/-}; CD47tg) 인간 1차 섬 세포를 실시예 4에 기재된 바와 같이 생성하고, 면역 무능 당뇨병 NSG 수용자 마우스에 이식하였다. 마우스에서 당뇨병의 유병률, 및 이식된 야생형 인간 1차 섬 세포와 비교하여 이식된 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 생존 및 기능을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.
- [1274] **A. 방법**
- [1275] *이식 연구 설계 및 투여.* 25 마리의 NSG 마우스(마우스 체중 18-20 g)를 당뇨병을 유도하기 위해 STZ 투여 후 연구 그룹으로 무작위 배정하였으며, 이 그룹은 투여된 세포(야생형, B2M^{-/-} CD47tg, 및 B2M^{-/-} 인간 섬 세포)에 기반하여 상이하였다. 연구 그룹은 다음과 같았다: 야생형 인간 섬(luc+) i.m. 이식; 이식 당뇨병 없음 대조군; 및 B2M^{-/-} CD47tg 인간 섬(luc+) i.m. 이식.
- [1276] 클러스터 당 약 1,500개 세포의 300개 인간 섬 클러스터를 i.m. 주사에 의해 마우스에 이식하였다. 0일차(d0)는 이식일로 정의되었다. 마우스를 섬 세포 생존의 지표로서 생물발광(BLI)에 대해 그리고 당뇨병의 지표로서 4시간 공복 후 포도당 수준에 대해 모니터링하였다. 포도당 유발을 연구 29일차에 수행하였다.
- [1277] *C-펩티드 검정.* 인간 1차 섬 세포에서 C-펩티드 수준을 검출하였다.
- [1278] **B. 결과**
- [1279] 연구 결과는 아래에 요약되어 있다. 대표적인 공여자 결과가 제시되어 있지만 다양한 공여자에 대해 유사한 결과가 관찰되었다.
- [1280] *이식 후 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포 생존.* i.m. 주사 후 인간 1차 섬 세포의 BLI 이미지는 도 19a(B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포) 및 도 19d(WT 인간 1차 섬 세포)에 제시되어 있다. 생물발광은 처음에 세포 투여 후 두 그룹에 대해 i.m. 주사 부위에서 관찰되었다. 이식된 WT 인간 1차 섬 세포에 대해 검출된 생물발광은 연구 기간에 걸쳐 지속되었으며 이는 WT 섬이 면역 무능 당뇨병 마우스에서 생존하고 기능한다는 것을 나타낸다(도 19d). 유사하게, 이식된 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포로부터 검출된 생물발광이 또한 이식 후 29일 동안 지속되었으며, 이는 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 생존 및 성장을 나타낸다(도 19a). 이들 결과는 HIP 편집이 섬 세포 생존 및 기능을 손상시키지 않는다는 것을 추가로 입증한다.
- [1281] *동종이체 이식 후 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포 기능.* 이식된 인간 1차 섬 세포의 특정 기능을 분석하기 위해, 이식한 지 6일 후에 혈당 수준을 측정하였다. 이 연구에서, 두 그룹의 마우스에 대해 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 공복 혈당 수준은 도 19b(B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포) 및 도 19e(WT 인간 1차 섬 세포)에 제시된 바와 같이 이식 직후 떨어졌다. 추가로, 마우스는 포도당 유발을 성공적으로 견뎌내었다(도 19b 및 도 19e).
- [1282] 이식된 인간 1차 섬 세포의 기능을 추가로 분석하기 위해, 이식 후 C-펩티드 수준을 측정하였다. WT 인간 1차 섬 세포 또는 B2M^{-/-}; CD47tg 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 C-펩티드 수

준은 각각 도 19f.(도 19c)에 제시된 바와 같이 높은 마우스였다.

[1283] 이들 테이터는 $B2M^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에 대한 편집이 면역계가 없는 당뇨병 NSG 마우스에서 섬 생존 또는 기능에 영향을 미치지 않았다는 것을 나타낸다.

[1284] **실시예 11 : 이식 연구에서 항-CD47 및 이소형 대조군을 사용하여 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 CD47 신호전달 평가**

[1285] 저면역($B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$) 인간 1차 섬 세포를 실시예 4에 기재된 기술을 사용하는 $CIITA^{-/-}$ 의 추가적인 녹아웃과 함께 실시예 4에 기재된 바와 같이 생성하고, 항-CD47 및 이소형 대조군과 함께 동종이계 당뇨병 인간화 NSG-SGM3 수용자 마우스에 이식하였다. 마우스에서 당뇨병의 유병률, 및 이식된 야생형 인간 1차 섬 세포와 비교하여 이식된 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 생존 및 기능을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.

[1286] **A. 방법**

[1287] *이식 연구 설계 및 투여.* 25 마리의 인간화 NSG-SGM3 마우스(마우스 체중 18-20 g)를 당뇨병을 유도하기 위해 STZ 투여 후 연구 그룹으로 무작위 배정하고 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 섬 세포를 투여하였다. 연구 그룹은 다음과 같았다: $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 섬 세포(luc+) i.m. 이식 + 항-CD47 i.m. 이식, 국소 투여; $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 섬 세포(luc+) i.m. 이식 + 항-CD47 i.m. 이식, 전신 투여; $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 섬 세포(luc+) i.m. 이식 + 이소형 대조군 i.m. 이식, 국소 투여; 및 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 섬 세포(luc+) i.m. 이식 + 이소형 대조군 i.m. 이식, 전신 투여.

[1288] 클러스터 당 약 1,500개 세포의 300개 인간 섬 클러스터를 i.m. 주사에 의해 마우스에 이식하였다. 0일차(d0)는 이식일로 정의되었다. 항-CD47 또는 이소형 대조군을 국소 투여 또는 전신 투여에 의해 8일차(d8)에 i.m. 주사에 의해 마우스에 이식하였다.

[1289] 마우스를 섬 세포 생존의 지표로서 생물발광(BLI)에 대해 그리고 당뇨병을 모니터링하기 위해 4시간 공복 후 포도당 수준에 대해 모니터링하였다. 포도당 유발을 연구 29일차에 수행하였다.

[1290] **B. 결과**

[1291] $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 항-CD47이 첨가된 경우 동종이계 이식 후 생존하지 않는다. 이소형 대조군을 국소 및 전신 i.m. 주사한 후 i.m. 이식된 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 BLI 이미지는 각각 도 20a 및 21a에 제시되어 있고, 항-CD47을 국소 및 전신 i.m. 주사한 후 i.m. 이식된 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 BLI 이미지는 각각 도 20c 및 21c에 제시되어 있다. 이식된 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 항-CD47의 부재 하에(즉, 이소형 대조군의 국소 또는 전신 첨가 후) 계속 생존하고 성장한다(도 20a 및 21a). 대조적으로, 이식된 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 이식 후 8일차에 투여된 항-CD47의 국소 또는 전신 투여 시작 후 급격히 감소하며(도 20c 및 21c), 이는 CD47을 차단함으로써 선천성 면역 세포에 의한 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 사망을 나타낸다.

[1292] 이들 테이터는 $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포에서 CD47-SIRP 신호전달의 차단이 면역계에 의해 외래 세포로 인식되어, 세포 사멸을 유발한다는 것을 나타내고, CD47의 과발현이 변형된 세포에 의해 면역 회피에 기여한다는 것을 추가로 확인시켜 준다.

[1293] $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포는 항-CD47이 첨가된 경우 동종이계 이식 후 기능하지 않는다. 이식된 인간 1차 섬 세포의 특정 기능을 분석하기 위해, 이식한 지 6일 후에 혈당 수준을 측정하였다. $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사를 받은 당뇨병(STZ 처리된) 마우스에서 4시간 공복 후 측정된 포도당 수준은 도 20b, 20d, 21b, 및 21d에 제시된 바와 같이 이식 직후 떨어졌고 이소형 대조군의 국소 및 전신 투여 후 낮게 유지되었다(각각 도 20b 및 21b). 그러나, $B2M^{-/-}$; $CIITA^{-/-}$; $CD47tg$ 인간 1차 섬 세포의 i.m. 주사 이어서 항-CD47의 국소 또는 전신 투여를 받은 마우스는 포도당 수준의 상승을 나타내었다(각각 도 20d 및 21d).

- [1294] **실시예 12 : 이식 연구에서 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 비인간 영장류 1차 베타 섬 세포 평가**
- [1295] 저면역(B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg) 비인간 영장류(NHP) 1차 베타 섬 세포를 생성하고 동종이계 수용자 NHP에 함께 이식하였다. 이식된 야생형 인간 1차 베타 섬 세포와 비교하여 이식된 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg NHP 1차 섬 세포의 생존 및 기능을 시간 경과에 따라 모니터링하였다.
- [1296] **A. 방법**
- [1297] *NHP 1차 베타 섬 세포의 생성 및 세포 조작.* 1차 베타 섬 세포를 표준 기술을 사용하여 NHP 배양으로부터 분리하였다. 이러한 기술은 당업계에 알려져 있고, 단리된 세포를 표준 CRISPR/Cas9 유전자 편집 기술을 사용하여 B2M 및 CIITA를 녹아웃하도록 조작하고, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 CD47 단백질을 암호화하는 이식유전자(tg)로 형질도입하였다. 저면역 섬을 HLA 클래스 I/II 및 CD47 과발현에 대해 음성인 세포에 대해 유세포 분석법으로 분류하였다.
- [1298] *이식 연구 설계 및 투여.* 클러스터 당 약 1,500개 세포의 300개 NHP 섬 클러스터를 i.m. 주사에 의해 NHP에 이식하였다. 0일차(d0)는 이식일로 정의되었다.
- [1299] *T 세포 효소 결합 면역 흡착 SPOT(ELISPOT) 검정.* NHP 1차 베타 섬 세포에서 인터페론 감마(IFNg)-분비 CD8(+) T 세포를 ELISPOT에 의해 검출하였다
- [1300] *유세포 분석법.* 1차 베타 섬 세포에서 공여자 특이적 항체(DSA)의 발현을 유세포 분석법에 의해 평가하였다.
- [1301] *NK 세포 사멸 검정.* NK 세포 사멸 검정을 상기 실시예에 기재된 바와 같이 실질적으로 수행하였다.
- [1302] **B. 결과**
- [1303] *이식 후 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg NHP 섬 세포 생존.* i.m. 주사 후 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포의 BLI 이미징 결과의 정량화는 도 22a에 제시되어 있다. i.m. 주사 후 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포의 상응하는 BLI 이미지는 도 22b에 제시되어 있다. 생물발광은 처음에 NHP 1차 섬 세포의 투여 후 모든 그룹에 대해 i.m. 주사 부위에서 관찰되었다. 이식된 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포로부터 검출된 광자 수는 처음에 이식 후 약간 감소하였지만, 그런 다음 이식 후 42일 동안 일관되게 유지되었으며, 이는 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포의 생존을 나타낸다(도 22a).
- [1304] *동종이계 이식 후 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포 면역 반응.* 이식된 NHP 1차 베타 섬 세포에 대한 면역 반응을 분석하기 위해, ELISPOT 검정을 사용하여 CD8+ T 세포에 의한 IFNg 사이토카인 분비 수준을 평가하였다. 도 23a에 제시된 바와 같이, 이식된 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포는 낮은 수준의 IFNg를 나타내었다. 유세포 분석법에 의해 측정된 DSA IgM 및 IgG의 수준이 또한 이식된 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포에서 낮았다(각각 도 23b 및 23c). 더욱이, NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포로 이식하기 전에 높은 IgG 항체 농도를 갖는 감염된 NHP 수용자에서, DSA IgG 수준은 이식 후 42일 동안 감소하였다(도 23d).
- [1305] 이들 데이터는 NHP B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg 1차 섬 세포가 이식 시 세포에 대한 면역 반응을 유도하지 않고 항체 매개 거부로부터 보호된다는 것을 나타낸다.
- [1306] B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg NHP 1차 섬 세포는 NK 세포에 의한 사멸을 회피한다. B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg NHP 1차 섬 세포는 NK-매개 세포 사멸을 나타내지 않았으며(도 24), 이는 저면역(B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg) NHP 1차 섬 세포가 NK 세포에 의해 면역 반응을 효과적으로 회피할 수 있다는 것을 나타낸다. 이들 데이터는 이식된 B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg NHP 1차 섬 세포가 외래로서 인식되지 않는다는 것을 나타낸다.
- [1307] **실시예 13 : 인간 1차 섬 세포의 유전자 편집**
- [1308] 1차 섬 세포를 표준 기술을 사용하여 인간 사체 공여자로부터 단리하고 세포를 37°C에서 10분 동안 ACCUMAX™ (StemCell Technologies) 세포 해리 용액을 사용하여 단일 세포를 함유하는 현탁액으로 해리하였다. 해리된 세포 현탁액을 Cas9 효소 및 인간 B2M 유전자 및 인간 CIITA 유전자를 표적화하는 단일 gRNA를 함유하는 리보핵단

백질 복합체로 전기천공하였다.

- [1309] 인간 B2M 유전자를 서열번호: 33 가이드 RNA(gRNA) 서열을 사용하여 파괴하고, 인간 CIITA 유전자를 서열번호: 34 gRNA 서열을 사용하여 파괴하였다. 인간 1차 섬 세포를 PIM(S) 배지(Prodo)에 웰 당 50,000개 세포를 함유하는 U-바닥 96-웰 플레이트로 옮기고 37 °C 및 5% CO₂에서 1시간 동안 방치한 후 인간 1차 섬 세포 재클러스터링을 위해 플레이트를 Belly Dancer 케도 진탕기(ABI Scientific, 아이오와주 더뷰크 소재)로 이동시켰다. 48시간 후 완전 배지 교체를 수행하고, 인간 1차 섬 세포 클러스터를 Belly Dancer 케도 진탕기에서 추가 24시간 동안 인큐베이션하였다.
- [1310] 편집된 섬을 풍부화하기 위해, 재클러스터링된 인간 1차 섬 클러스터를 항-HLA-A,B,C 항체(클론 G46_2.6, BD Biosciences) 또는 IgG1 이소형 일차 대조군 항체(클론 MOPC-21, BD Biosciences), 및 항-HLA-DR,DP,DQ 항체(클론 Tu3a, BD Biosciences) 또는 IgG2a 이소형 일차 대조군 항체(클론 G155-178, BD Biosciences)와 함께 ACCUMAX™을 사용하여 단일 세포로의 세포 분류를 위해 해리하였다. 이중 음성 인간 1차 섬 세포를 BD FACSAria™ II에서 분류하고 Belly Dancer 케도 진탕기에서 재클러스터링하기 위해 위에 기재된 바와 같이 U-바닥 96-웰 플레이트에 재플레이팅하였다.
- [1311] 24시간 후, 인간 1차 섬 세포를 단일 세포로 해리하고 CD47을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 형질도입된 인간 1차 섬 세포를 Belly Dancer 케도 진탕기에서 재클러스터링하기 위해 위에 기재된 바와 같이 U-바닥 96-웰 플레이트에 재플레이팅하였다. 48시간 후, 인간 1차 섬 세포를 ACCUMAX™을 사용하여 단일 세포로 해리하고 항-CD47 항체(클론 B6H12, BD Biosciences) 또는 IgG1 이소형 일차 대조군 항체(클론 MOPC-21, BD Biosciences)와 함께 인간 CD47에 대한 세포 분류를 거쳐 CD47이 과발현된 형질도입된 세포를 선택하였다. 인간 1차 섬 세포를 Belly Dancer 케도 진탕기에서 재클러스터링하기 위해 위에 기재된 바와 같은 U-바닥 96-웰 플레이트에 재플레이팅하였다.
- [1312] 세포를 움직이면서 인큐베이션하는 것 대신 섬 세포를 37 °C 및 5% CO₂(움직임 없음)에서 정적 조건 하에 인큐베이션하는 것을 제외하고 유사한 과정을 수행하였다. 이 과정에서, 정적 조건은 손상된 재클러스터링 및 약 35%에 불과한 낮은 생존력을 초래하였다. 이론에 얽매이지 않고, 제공된 결과는 유전자 편집 과정 동안 세포를 움직이게 하는 것이 생존력 및 유전자 편집 효율을 개선시킨다는 것을 뒷받침한다.
- [1313] **실시예 14 : B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg} 인간 1차 망막 색소 상피 세포 평가**
- [1314] 이 실시예는 (1) B2M(B2M^{-/-})을 녹아웃시켜 HLA 클래스 I 발현을 감소시키고, (2) CIITA(CIITA^{-/-})를 녹아웃시켜 HLA 클래스 II 발현을 감소시키고, (3) 외인성 CD47(CD47^{tg})을 과발현하도록 조작된 저면역 인간 1차 망막 색소 상피(RPE) 세포를 특징으로 하는 연구를 기재한다. 저면역(B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47^{tg}) 인간 1차 RPE 세포를 야생형(WT) 인간 1차 RPE 세포 또는 이중 녹아웃(B2M^{-/-} CIITA^{-/-}) 인간 1차 RPE 세포와 비교하여, 자연 살해(NK) 세포 및 대식세포에 의한 세포 사멸로부터 보호에 대해 모니터링하였다.
- [1315] **A. 방법**
- [1316] **인간 1차 RPE의 생성 및 세포 조작.** 1차 RPE 세포를 인간 사체 안구(globe)로부터 단리하고 동결보존하였다. 단리된 RPE 세포를 해동시킨 다음 Synthemax(3535 Corning, Corning NY)로 코팅된 플레이트에 플레이팅하였다. 저면역 세포를 생성하기 위해, 플레이팅된 세포를 표준 CRISPR/Cas9 유전자 편집 기술을 사용하여 B2M 및 CIITA를 녹아웃시키도록 조작하고, 약 2일 후 배지를 플레이팅된 세포에서 교체한 다음, 세포를 그대로 두거나 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 외인성 CD47 단백질을 암호화하는 이식유전자(tg)로의 형질도입에 의해 추가로 조작하였다. 2일 후 배지를 다시 교체한 다음 조작된 형태가 형성된 경우(예를 들어 6일차) 세포를 수집하고 HLA 클래스 I/II(B2M^{-/-}, CIITA^{-/-} 이중 녹아웃, dKO) 및, 일부 경우에, 또한 CD47 과발현(B2M^{-/-}, CIITA^{-/-}, CD47^{tg})에 대해 음성인 세포에 대해 유세포 분석법에 의해 분류하였다
- [1317] **NK 세포 및 대식세포 사멸 검정.** NK 세포 사멸 검정 및 대식세포 사멸 검정을 XCelligence MP 플랫폼(ACEA Biosciences)에서 수행하여 세포 증식 및 세포 생존력의 무라벨 모니터링을 제공하였다. 비변형된(야생형) 인간 1차 RPE, B2M^{-/-}, CIITA^{-/-} 조작된 인간 1차 RPE, 또는 B2M^{-/-}, CIITA^{-/-}, CD47^{tg} 조작된 인간 1차 RPE를 라미닌, 콜라겐 및 피브로넥틴으로 코팅된 96-웰 E-플레이트에 플레이팅하였다. XCelligence 소프트웨어를 사용하여 부착 및 그에 따른 세포 사멸의 척도로서 세포 지수(CI)를 측정하였다(세포 지수의 감소는 세포 사멸의 증가를 나타

타냄). CI 값이 0.7에 도달한 후, 인간 1차 NK 세포 또는 분화된 인간 대식세포(둘 다 Stemcell Technologies)를 1:1의 효과기 대 표적(E:T) 비로 첨가하였다

[1318] **B. 결과**

[1319] 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ 1차 RPE 세포는 MHC-I 또는 MHC-II를 발현하지 않고, CD47 발현이 증가하였다. MHC-I 및 MHC-II 및 CD47의 발현을 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 단리된 인간 1차 RPE 세포는 MHC-I에 대해 양성하였고, MHC-II를 발현하지 않았고, CD47의 발현이 낮았다(도 25, 상단 패널). 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; dKO1$ 차 RPE 세포 및 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ 1차 RPE 세포는 MHC-I 및 MHC-II 둘 다에 대해 음성이었다(도 25, 중간 및 하단 패널). $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ 1차 RPE 세포만이 CD47의 증가된 발현을 보였다(도 25, 하단 패널)에 제시된 바와 같이, 이소형 대조군에 비해 20-배).

[1320] 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ 1차 RPE 세포는 NK 세포 및 대식세포 사멸을 회피한다. 비변형된(야생형) 1차 RPE 세포는 NK 세포(도 26a) 또는 대식세포(도 26d)에 의해 사멸되지 않았으며, 이는 선천성 면역 사멸로부터 야생형 세포의 저항성과 일치한다. 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}$ 1차 RPE 세포는 NK 세포(도 26b) 및 대식세포(도 26e)에 의해 사멸되었으며, 이는 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}$ 1차 RPE 세포가 세포 표면 상에서 HLA 분자가 결여되어 있고 NK 세포 및 대식세포에 의한 자기 상실을 촉발하였다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 표면 분자 CD47을 추가로 과발현하는 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ 1차 RPE 세포는 NK-매개 세포 사멸(도 26c) 또는 대식세포-매개 세포 사멸(도 26f)을 나타내지 않았다. 선천성 NK 세포 또는 대식세포(표적 세포 단독)의 부재 하에, 임의의 RPE 세포의 사멸은 관찰되지 않았다(도 26g-i).

[1321] 이들 데이터는 인간 $B2M^{-/-}; CIITA^{-/-}; CD47tg$ 1차 RPE 세포가 저면역성이고 NK 세포 및 대식세포에 의한 면역 반응을 효과적으로 회피한다는 것을 나타낸다.

[1322] 본 발명은 예를 들어, 본 발명의 다양한 측면을 예시하기 위해 제공되는 특정 개시된 구현예로 범위가 제한되도록 의도되지 않는다. 기재된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본원의 설명 및 교시로부터 명백해질 것이다. 이러한 변형은 개시내용의 진정한 범위 및 사상으로부터 벗어나지 않고 실시될 수 있고 본 개시내용의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

[1323] 서열

#	서열	주석
1	QLLFNFKTKSVEFTFCNDTVVIPCFTVNMEAQNTTEVYVKW KFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLK MDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETHIELKYRVVSWFSPN ENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGL VITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILLHYYVF STAIGLTSFVIAILVIQVIAYLAVVGLSLCIAACIPMHGPLLIS GLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFK ESKGMNDE	인간 CD47(신호 서열 없음); aa 19-323
2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNFKTKSVEFTFCNDTVVIPC FVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFD GALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TRE GETHIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKY RSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATG LGLIVTSTGILLHYYVFSSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYLAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQ KTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMNDE	인간 CD47(신호 서열 있음); aa 1-323
3	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNLTPYTFGGGKLEITGSGSGKPGSGEGSTKGE VKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNS LQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	항-CD19 scFv(FMC63)
4	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDIA TYFCQQGNLTPYTFGGGKLEITGGGGSGGGGGSEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EVLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	항-CD19 scFv(FMC63)
5	ESKYGPPCPPCP	IgG4 힌지
6	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	CD8 힌지
7	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP	CD28
8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYC	CD8
9	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28
10	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28
11	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB

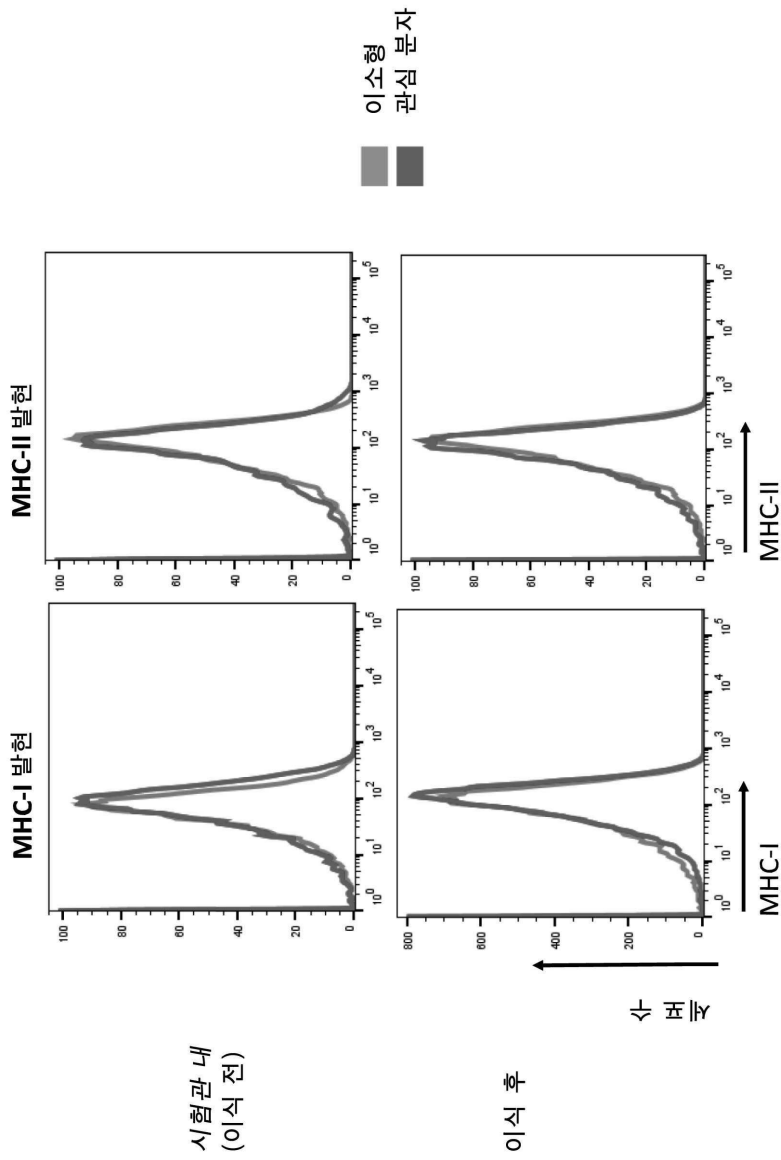
[1324]

13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3제타
14	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3제타
15	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
16	LEGGGEGRSLLTCGDVEENPGPR	T2A
17	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
18	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
20	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
21	GSGEGRSLLTCGDVEENPGP	T2A
22	AAGSGEGRSLLTCGDVEENPGP	T2A
23	GUUUUAGAGCUA	crRNA 반복
24	UAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU	tracrRNA
25	GAAA	테트라루포
26	acccacagtgggccacta	GET000046 가이드
27	tgttgaaggatgaggaaat	GET000047 가이드
28	tcactatgctgcccccagt	GET000048 가이드
29	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	ABO gRNA
30	CUGGAUGUCGAGGAGUACG	FUT1 gRNA
31	GUCUCCGAAACUCGAGGUG	RHD gRNA
32	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	F3(CD142) gRNA
33	CGUGAGUAAACCUGAAUCUU	B2M gRNA
34	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	CIITA gRNA
35	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	TRAC gRNA

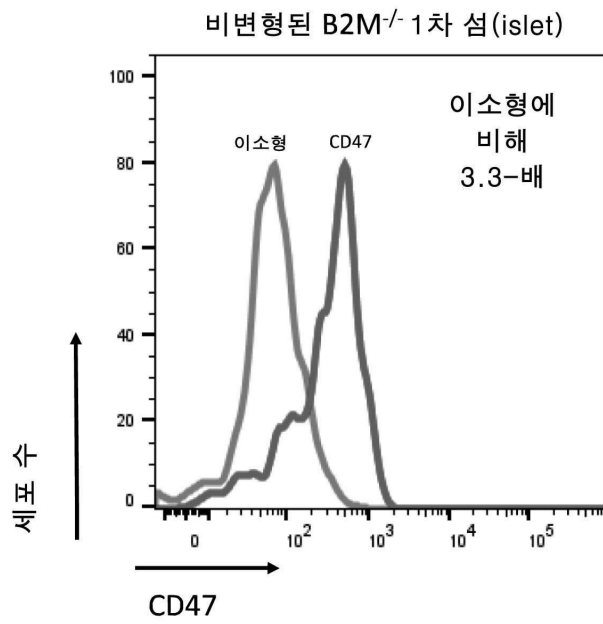
[1325]

도면

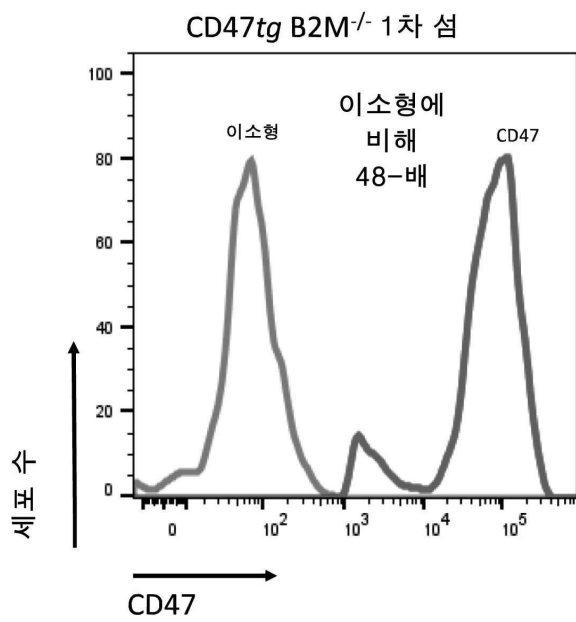
도면1



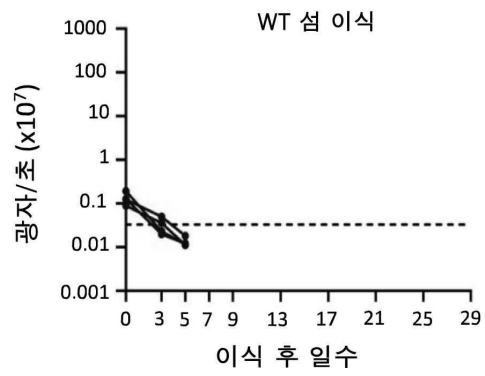
도면2a



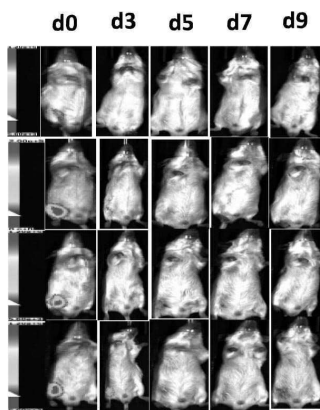
도면2b



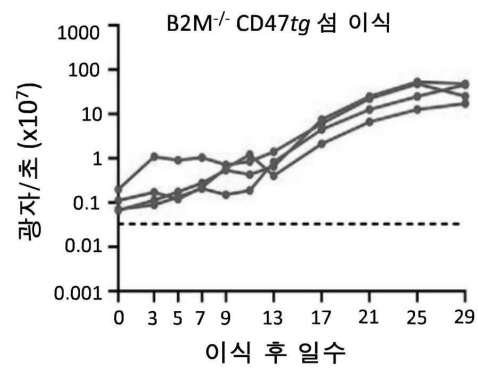
도면3a



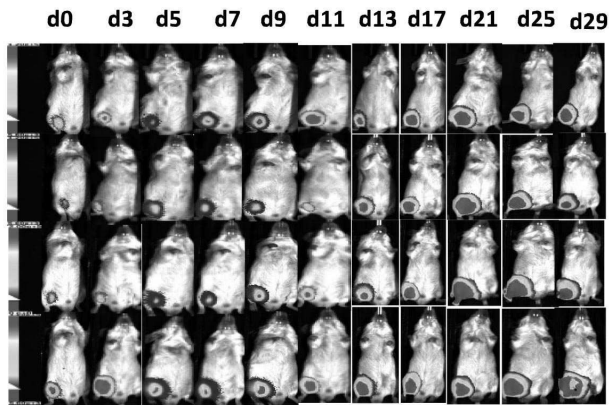
도면3b



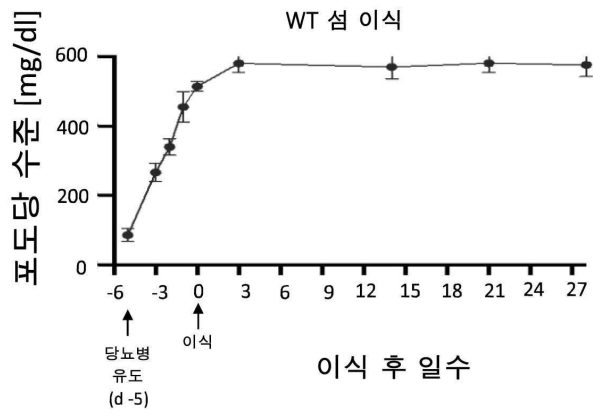
도면3c



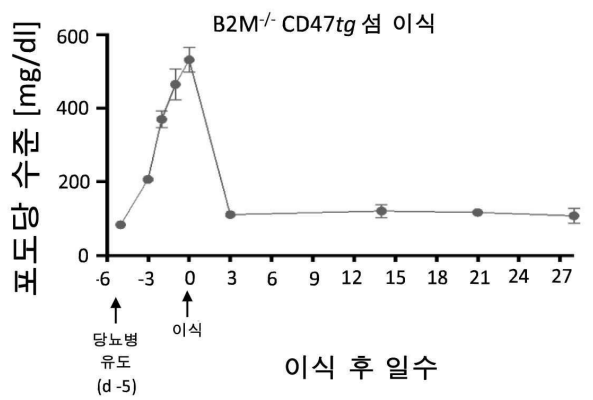
도면3d



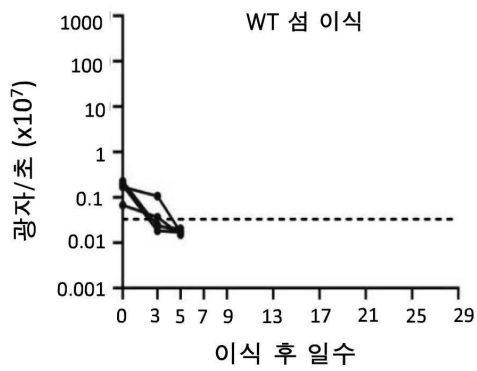
도면3e



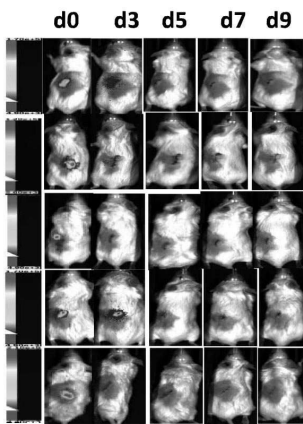
도면3f



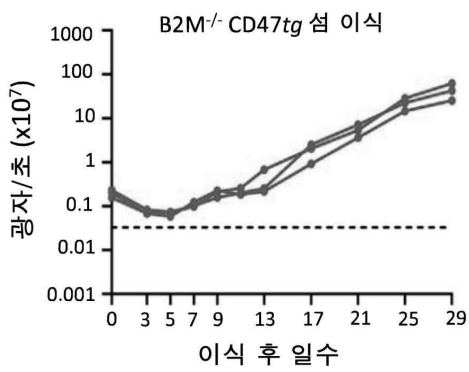
도면4a



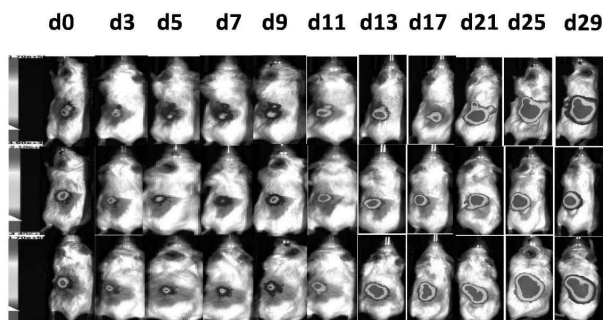
도면4b



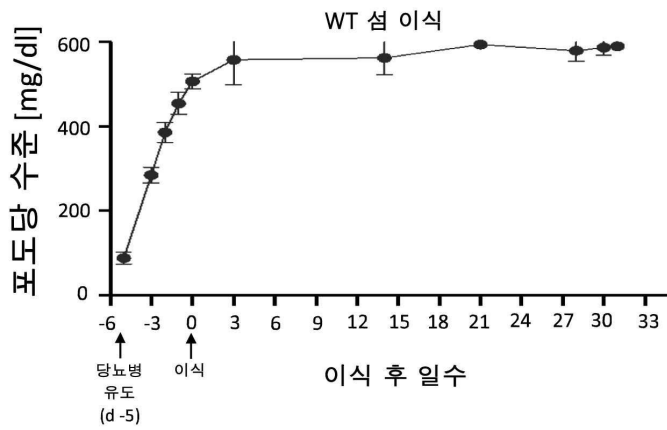
도면4c



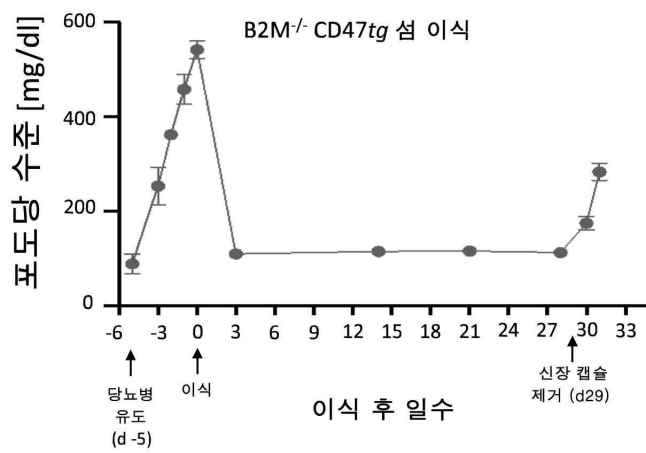
도면4d



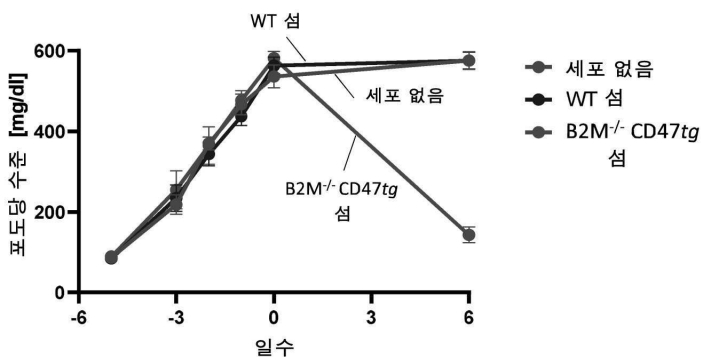
도면4e



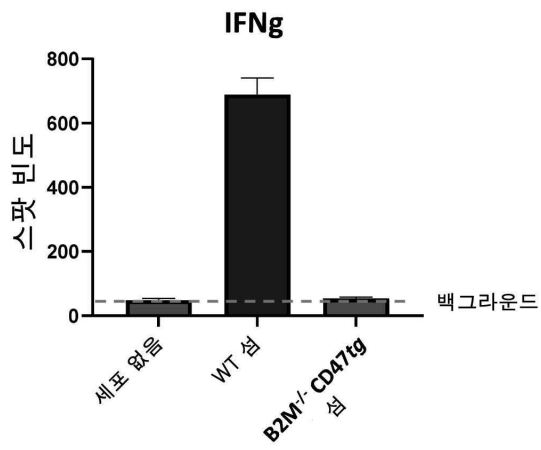
도면4f



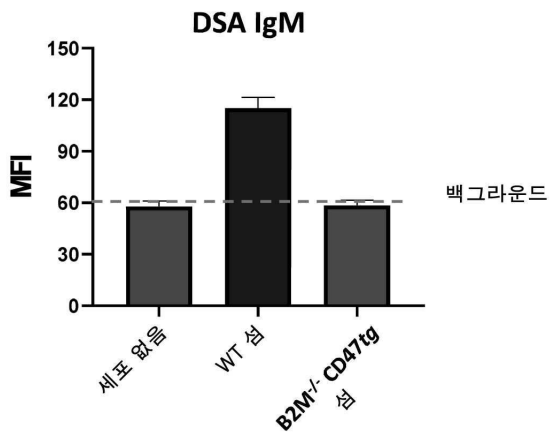
도면5a



도면5b

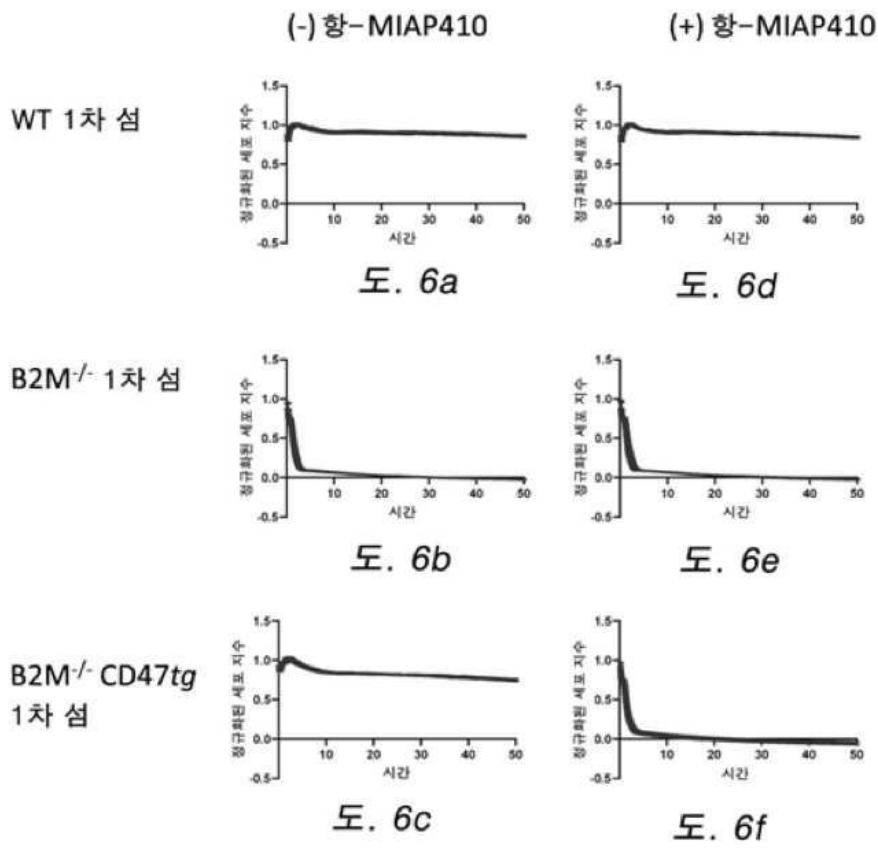


도면5c



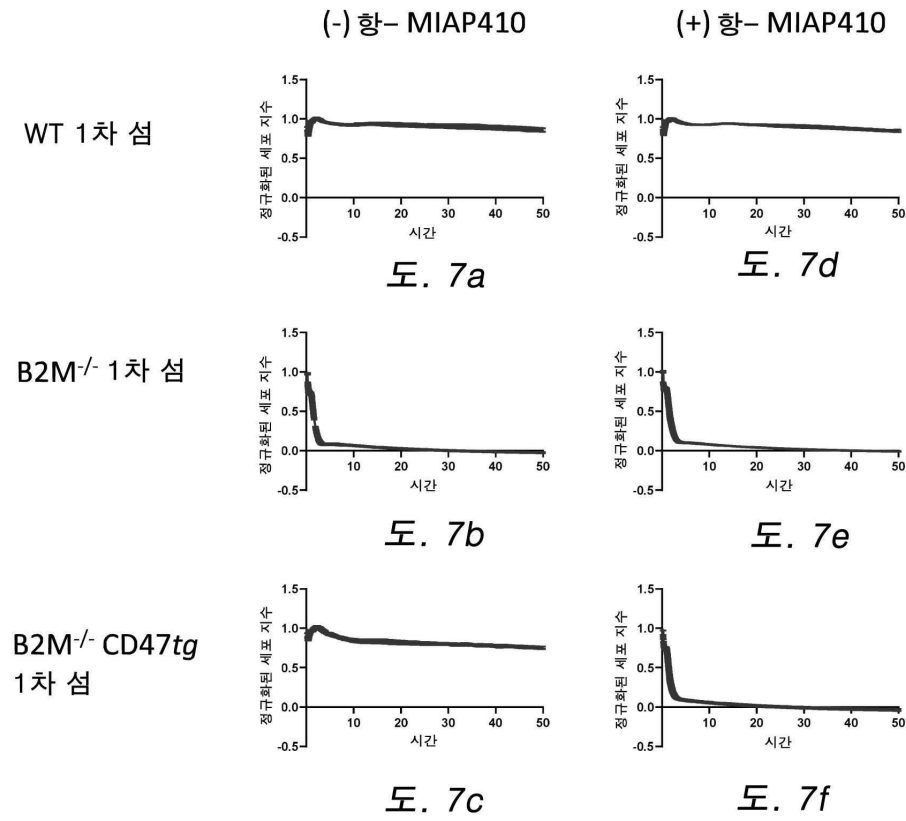
도면6

NK 세포

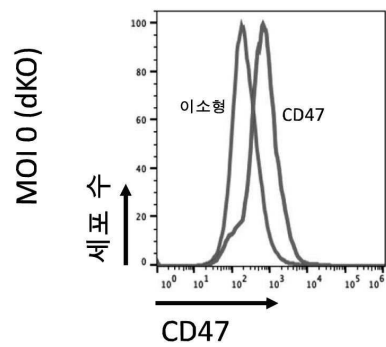


도면7

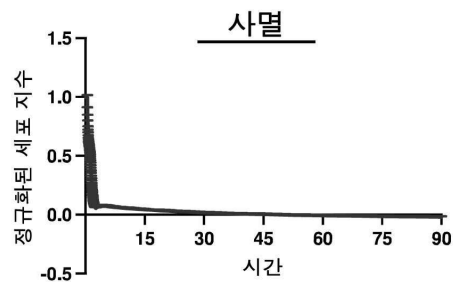
대식세포



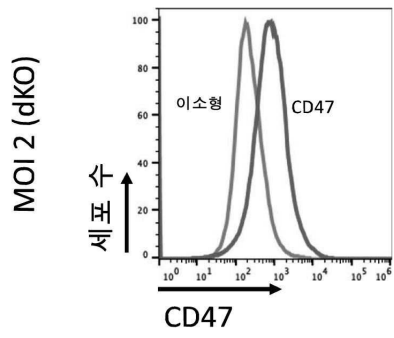
도면8a



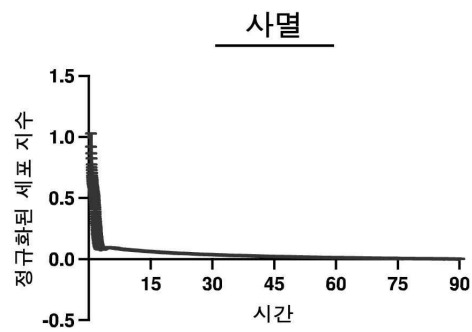
도면8b



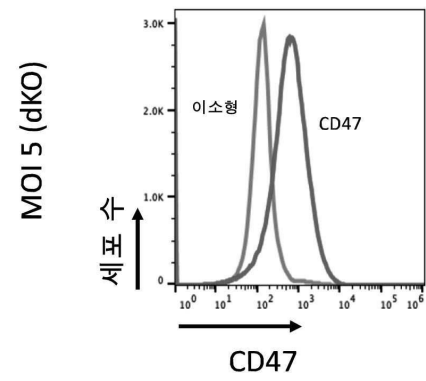
도면8c



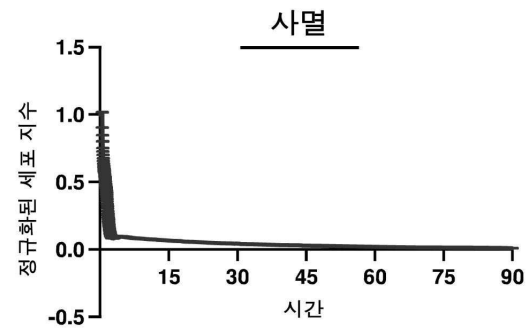
도면8d



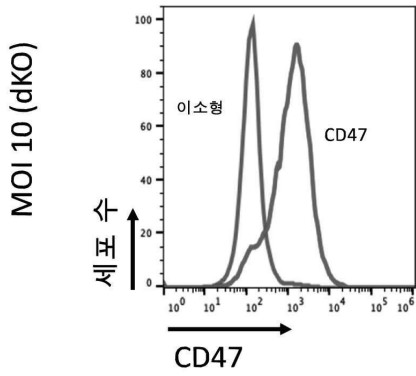
도면8e



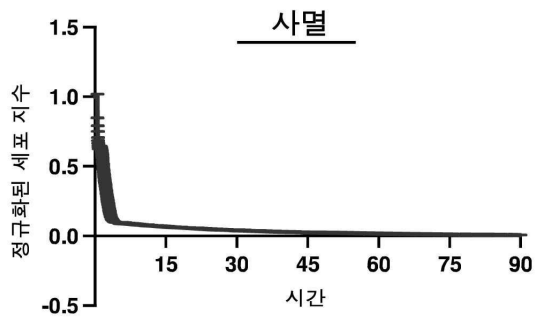
도면8f



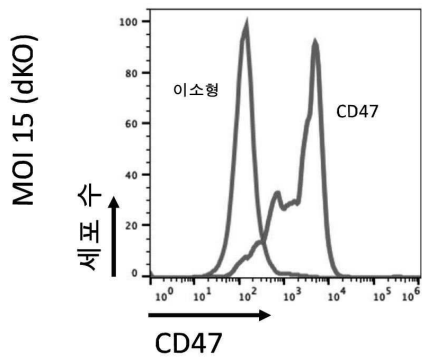
도면8g



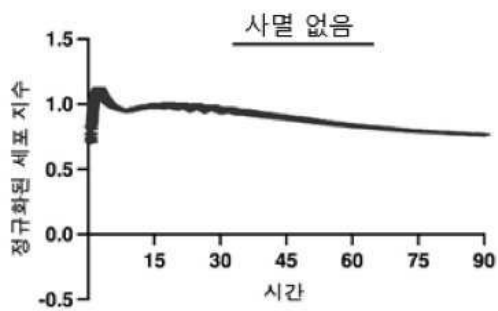
도면8h



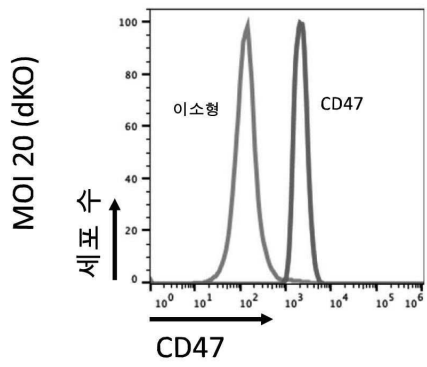
도면8i



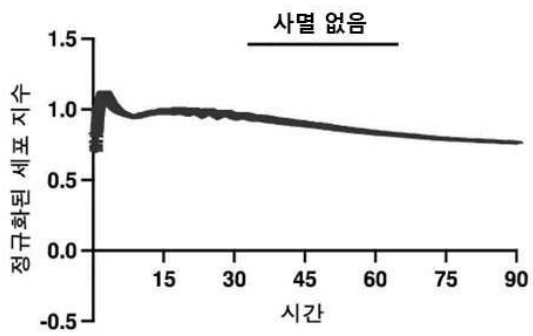
도면8j



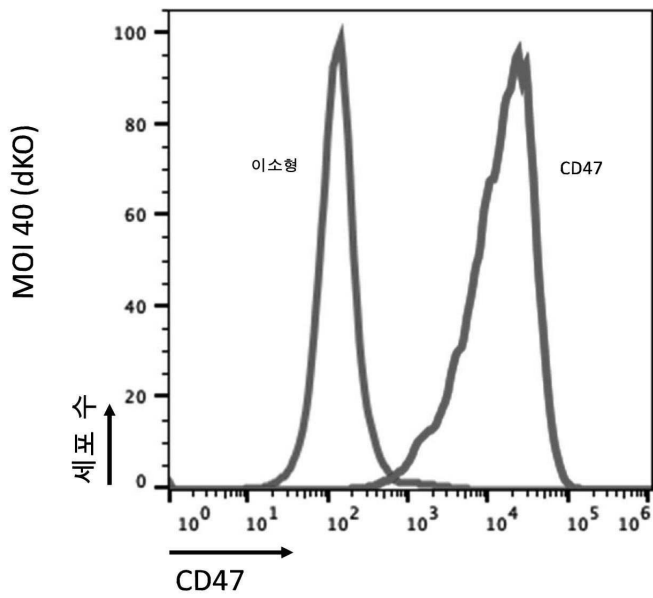
도면8k



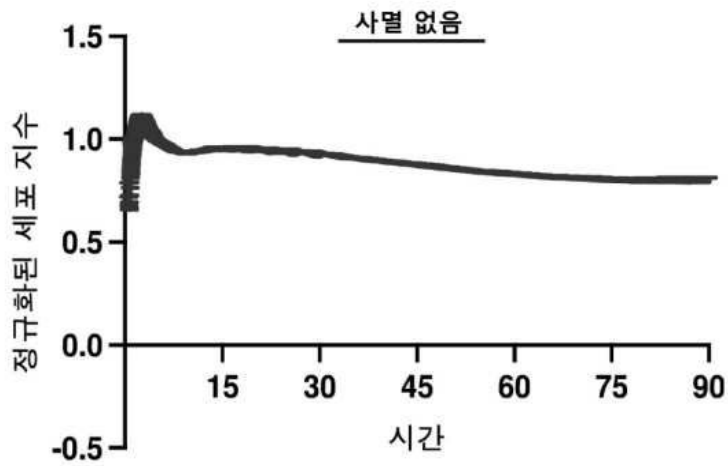
도면8l



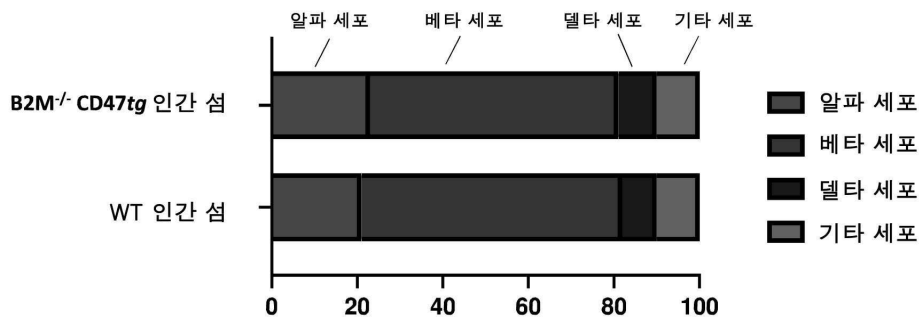
도면8m



도면8n



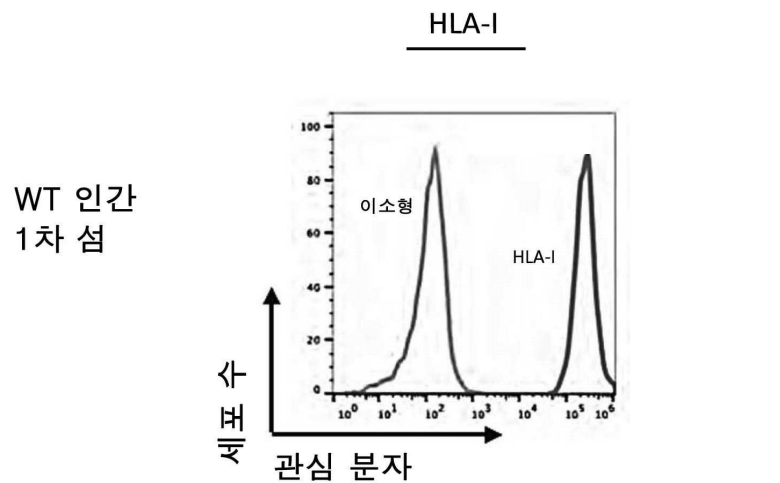
도면9a



	알파 세포	베타 세포	델타 세포	기타 세포
WT 인간 섬	21	61	8	10
B2M ^{-/-} CD47tg 인간 섬	23	58	9	10

살아있는 세포의 백분율[%] 중

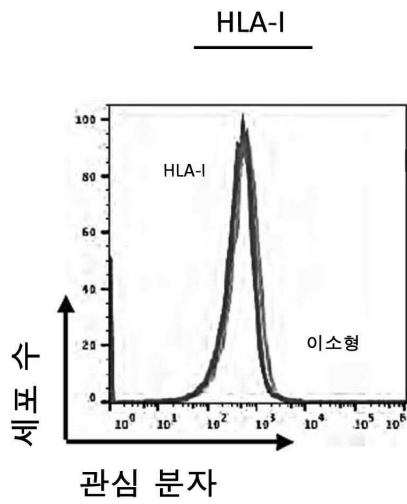
도면9b



WT 인간
1차 섬

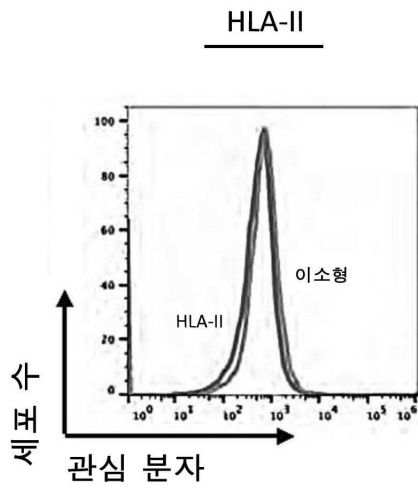
도면9c

**B2M^{-/-}
CD47^{tg}**
인간
1차 섬



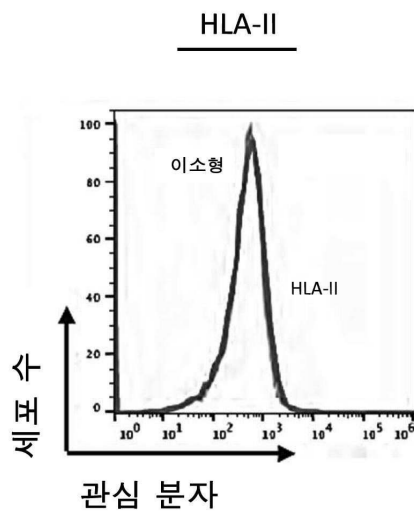
도면9d

WT 인간
1차 섬

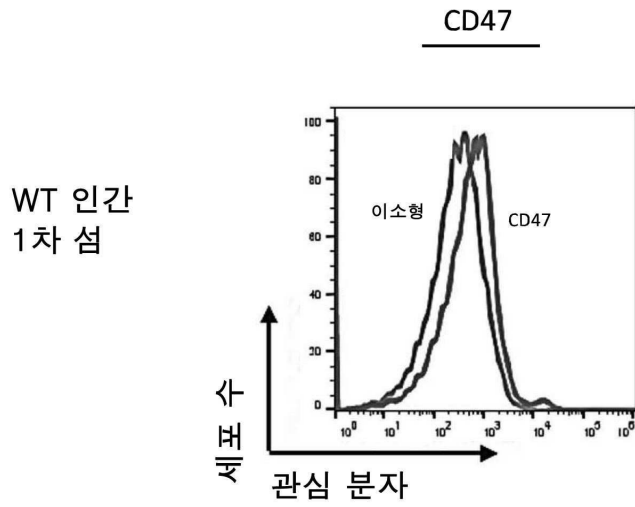


도면9e

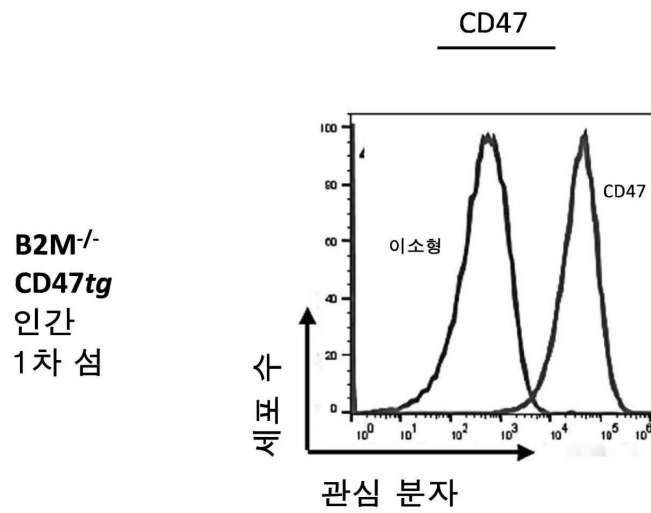
**B2M^{-/-}
CD47^{tg}**
인간
1차 섬



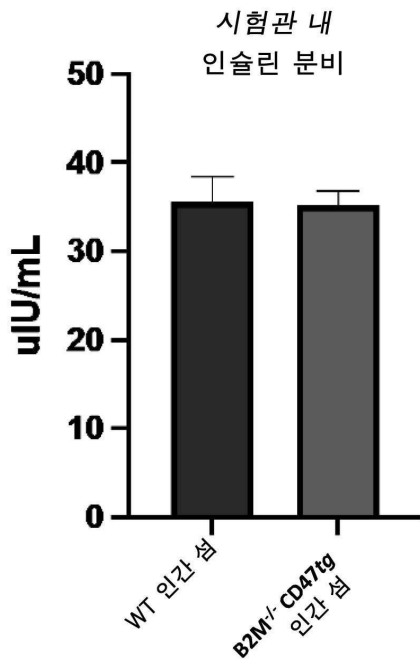
도면9f



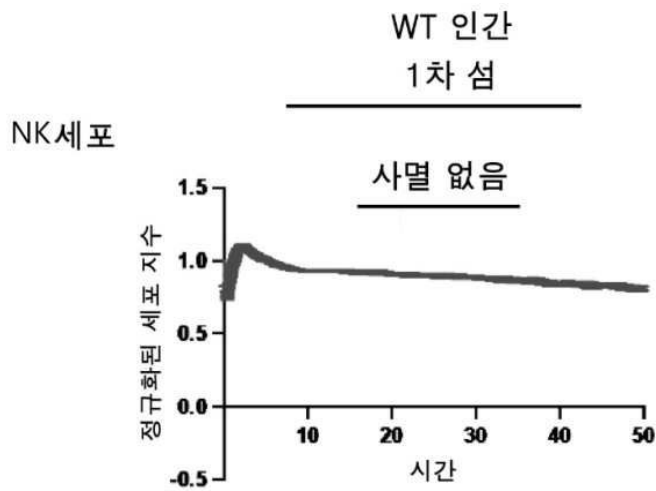
도면9g



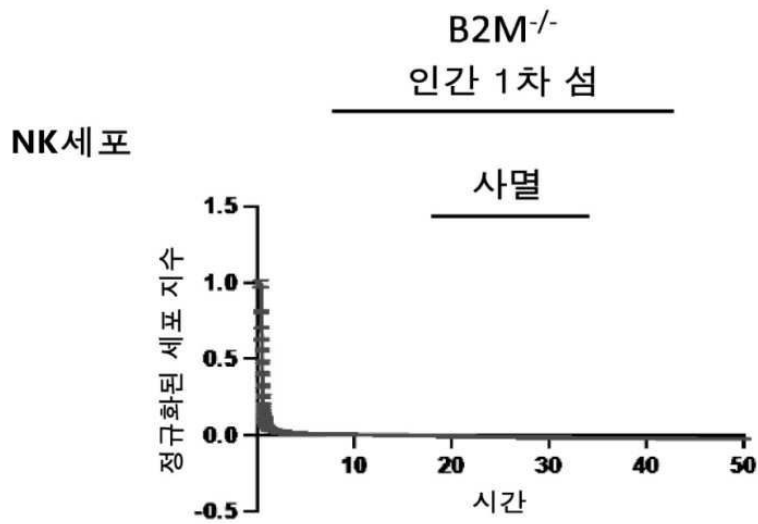
도면9h



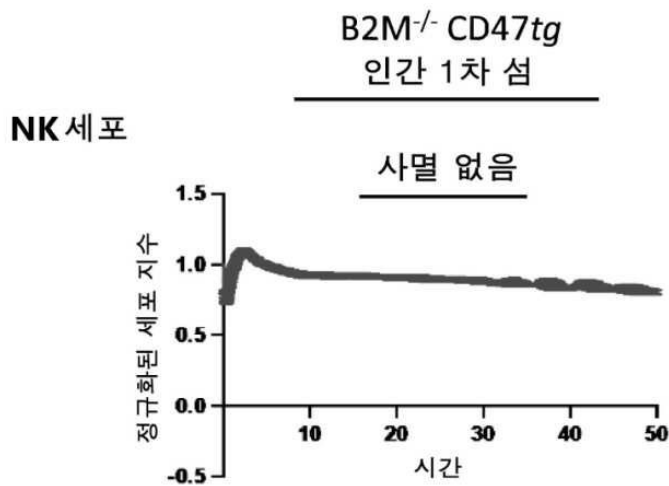
도면9i



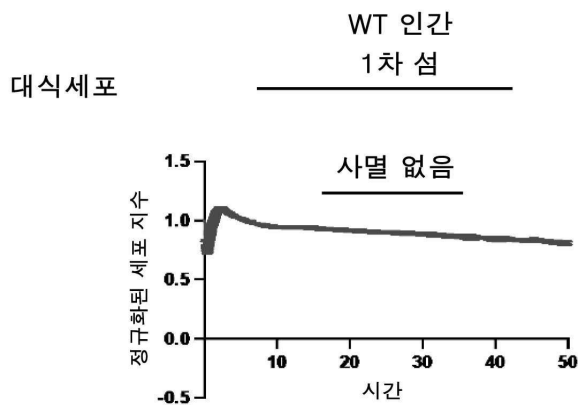
도면9j



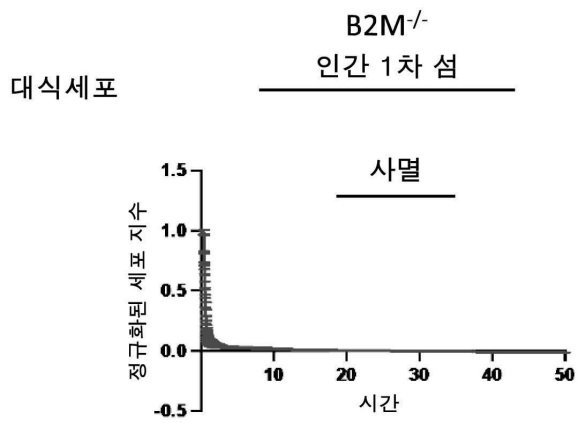
도면9k



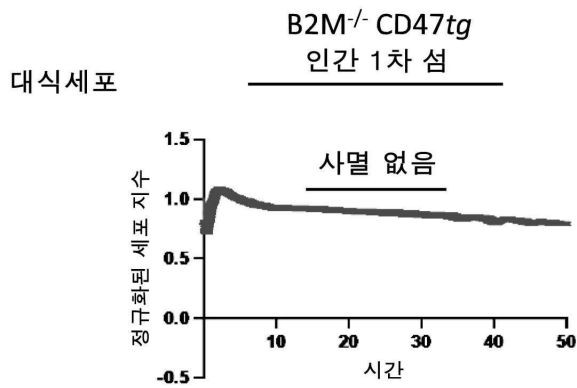
도면9l



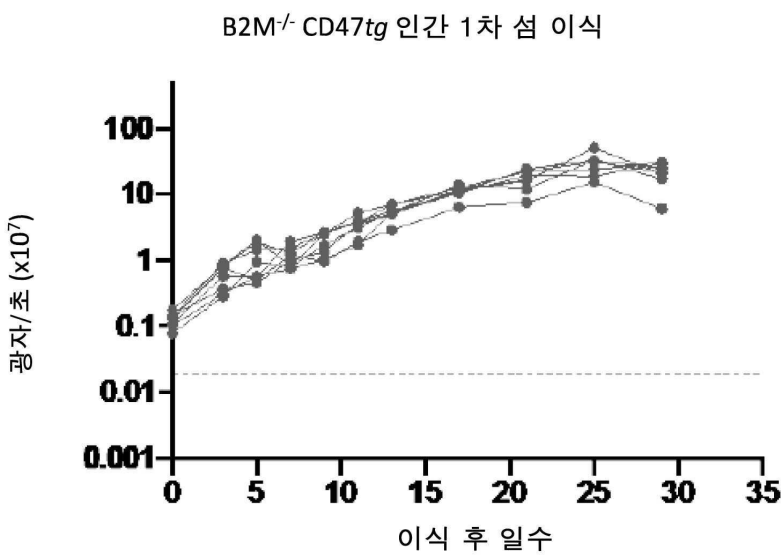
도면9m



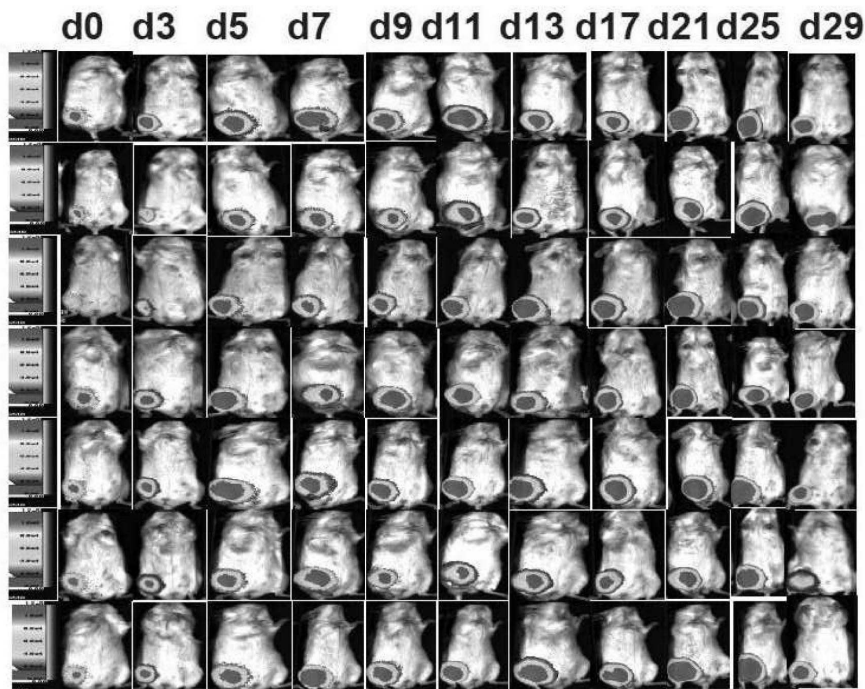
도면9n



도면10a

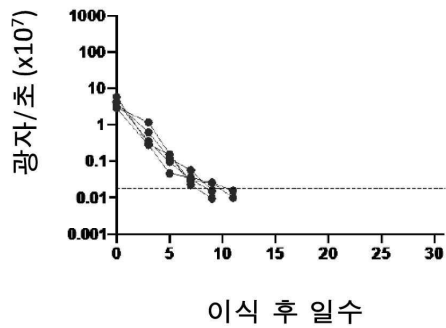


도면10b



도면10c

비변형된 WT 인간 1차 섬 이식

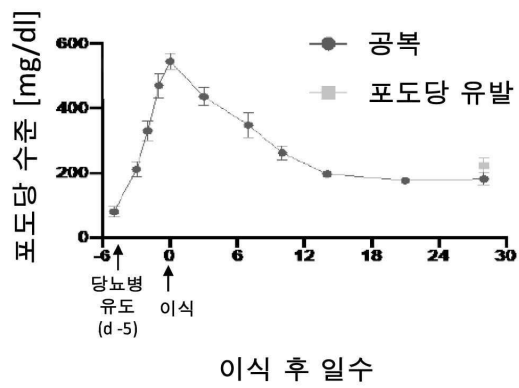


도면10d



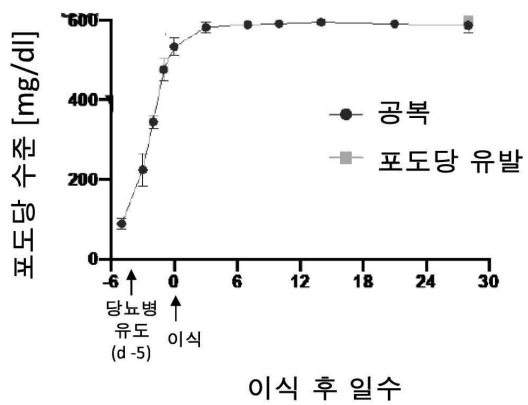
도면10e

B2M^{-/-} CD47tg 인간 1차 섬 이식

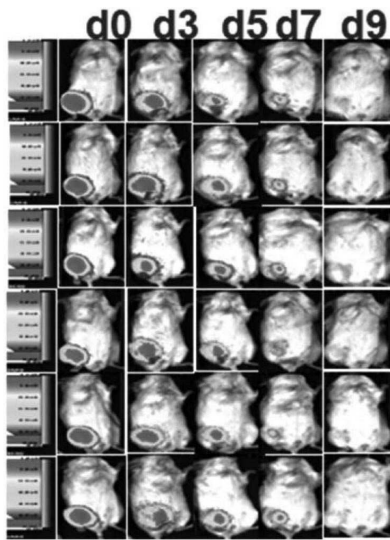


도면10f

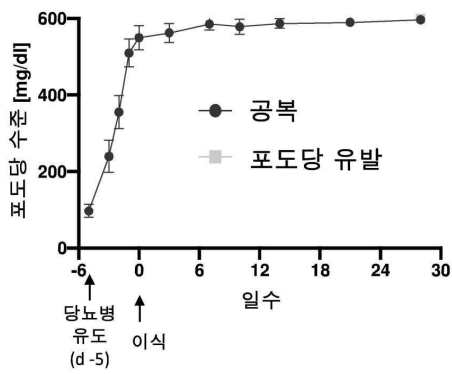
비변형된 WT 인간 1차 섬 이식



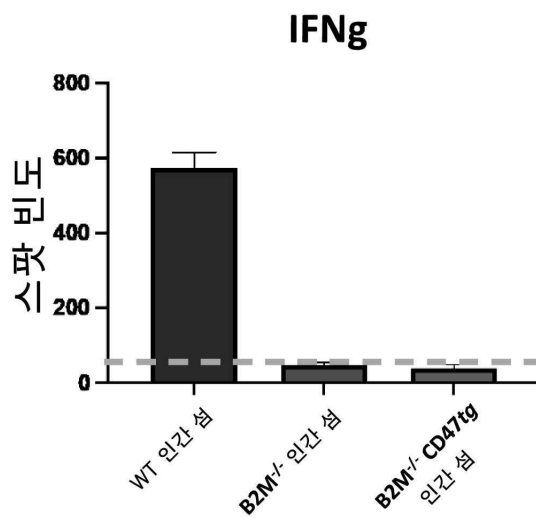
도면10g



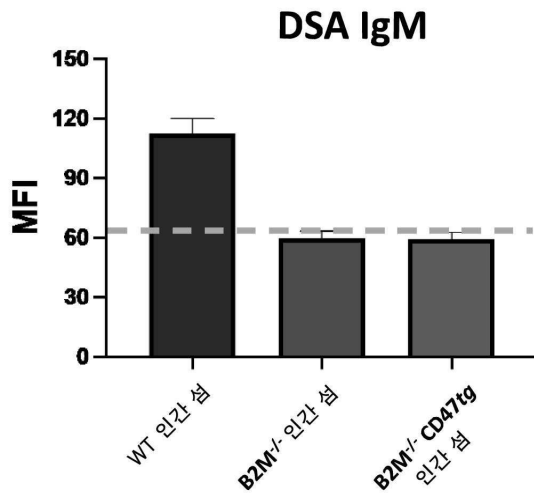
도면10h



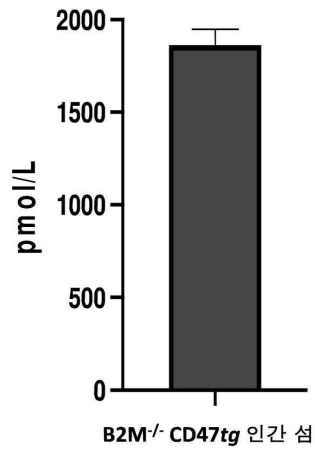
도면10i



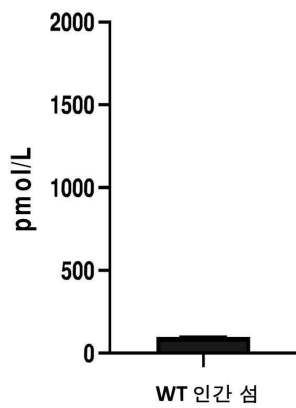
도면10j



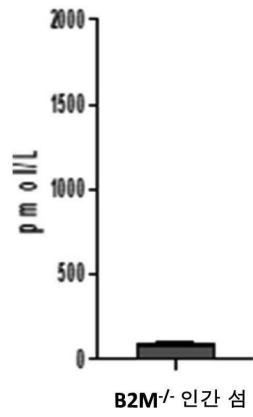
도면11a



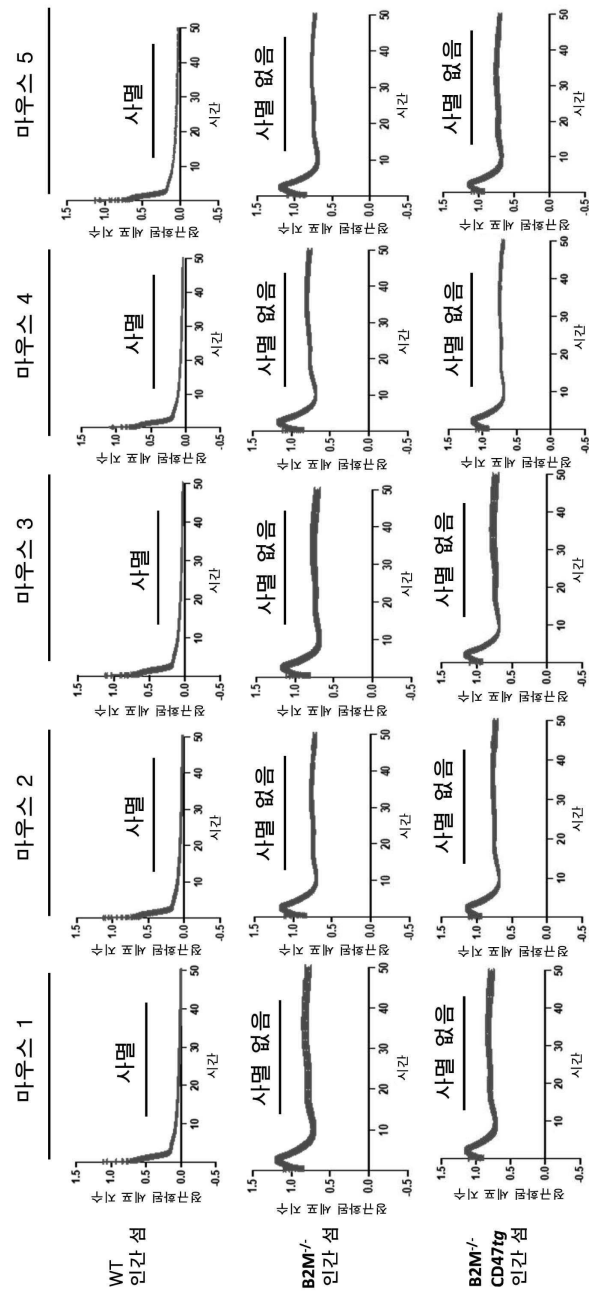
도면11b



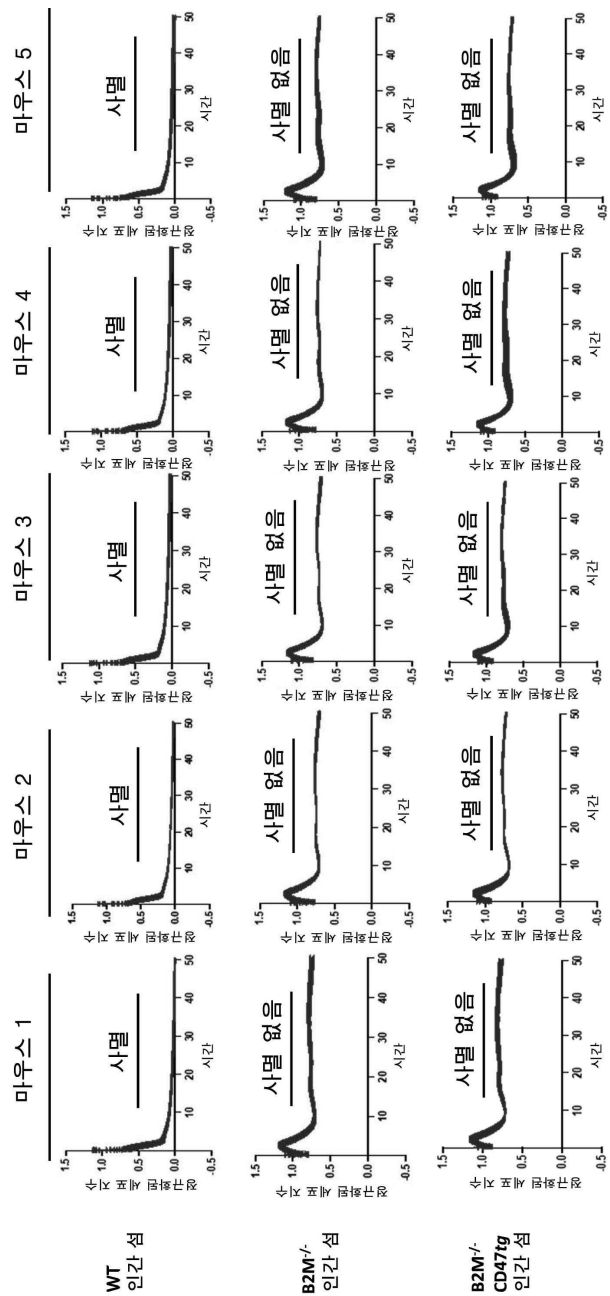
도면11c



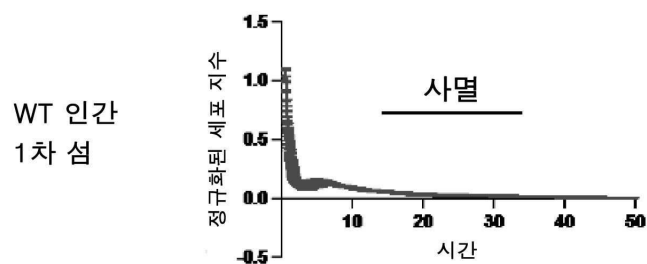
도면12a



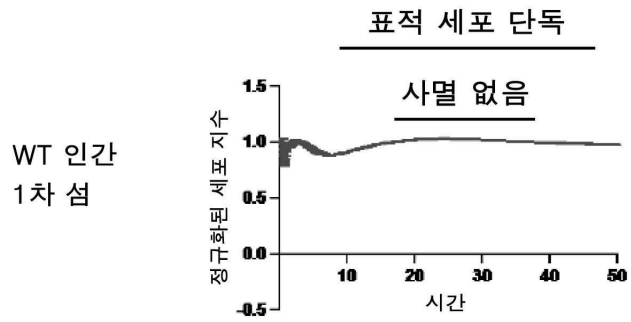
도면12b



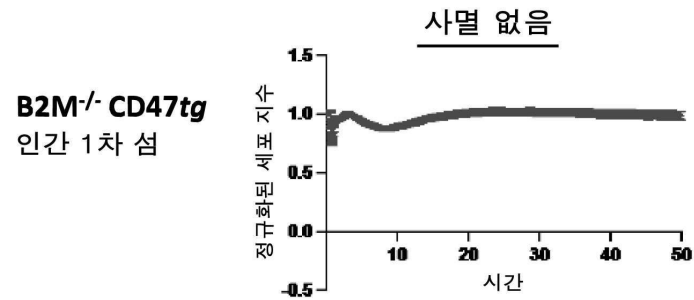
도면13a



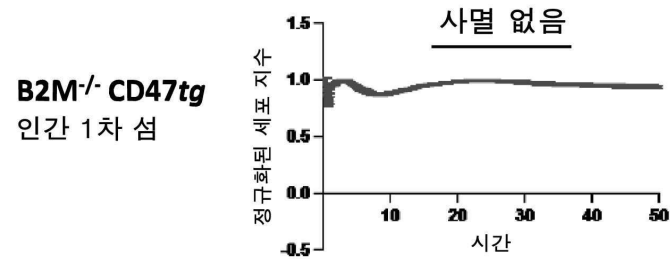
도면13b



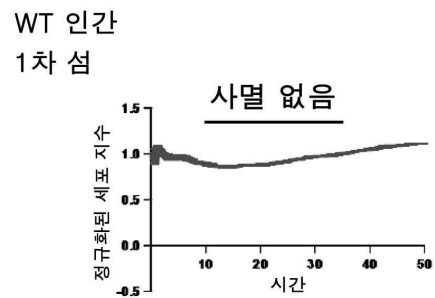
도면13c



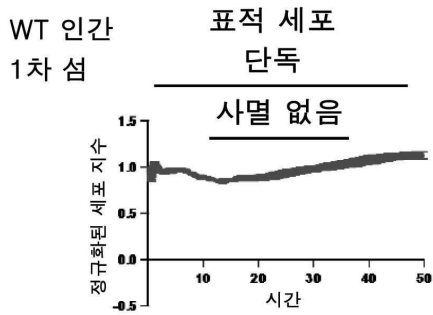
도면13d



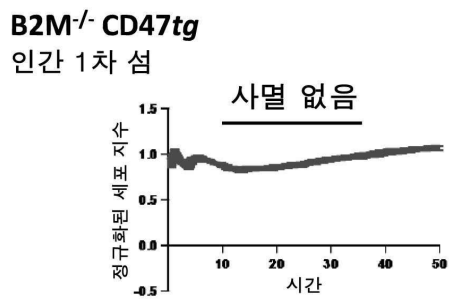
도면13e



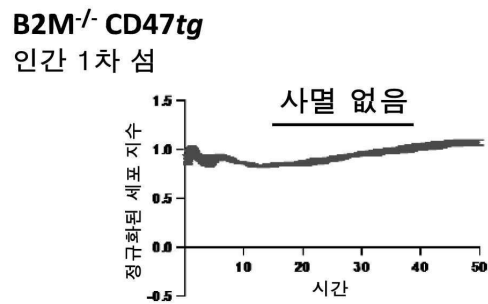
도면13f



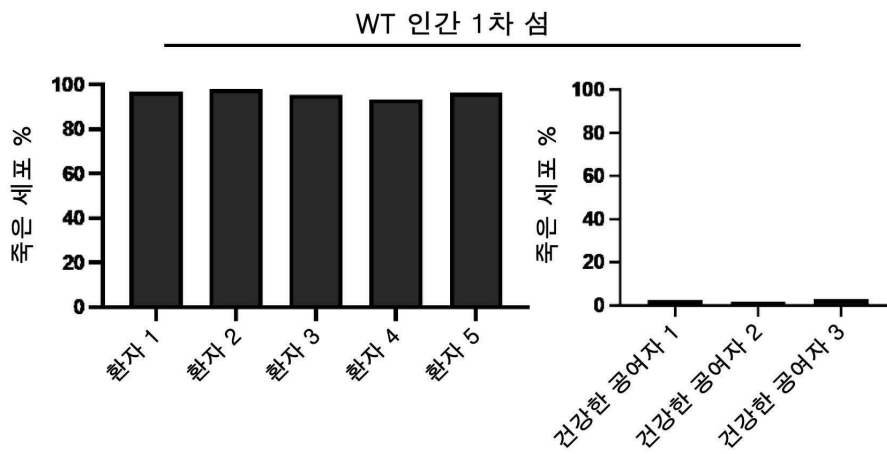
도면13g



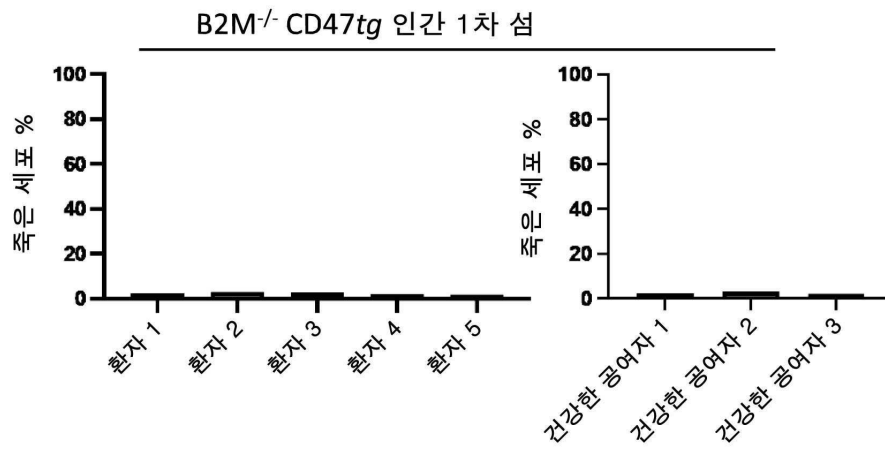
도면13h



도면13i

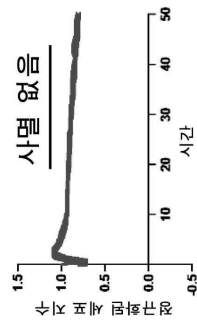


도면13j



도면14

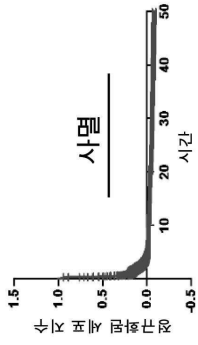
B2M^{-/-} CD47tg
인간 1차 섬



NK 세포

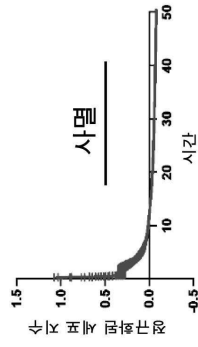
도. 14a

B2M^{-/-} CD47tg
인간 1차 섬 + 항-CD47 IgG1Fc

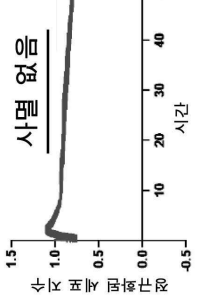


도. 14b

B2M^{-/-} CD47tg
인간 1차 섬 + 항-CD47 IgG4Fc



도. 14c

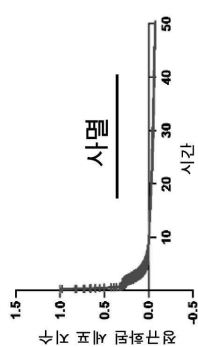


대식세포

도. 14d

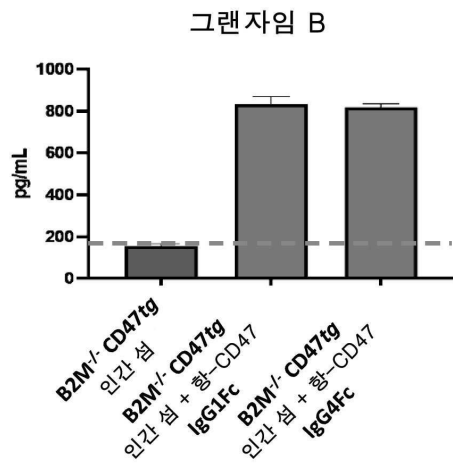


도. 14e

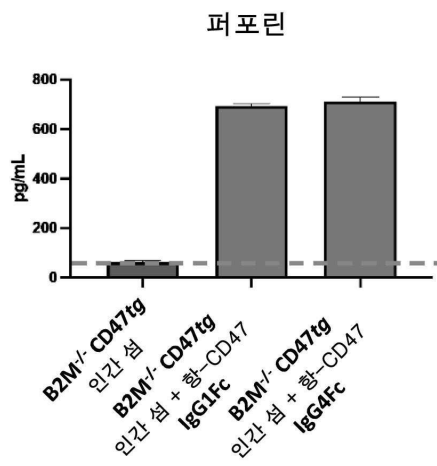


도. 14f

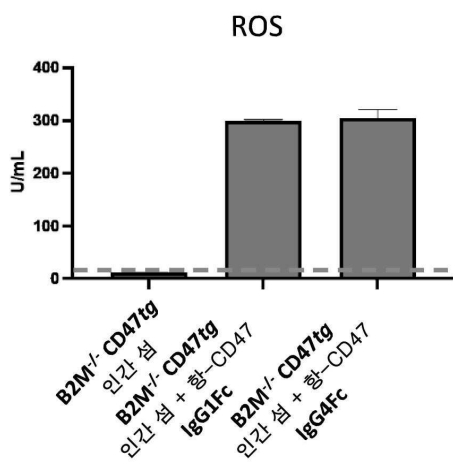
도면15a



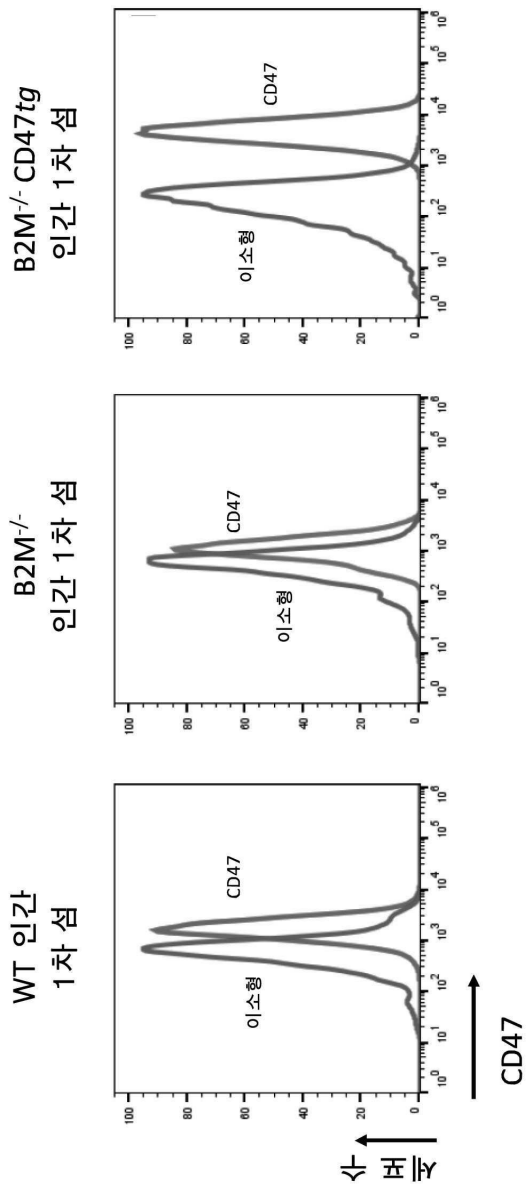
도면15b



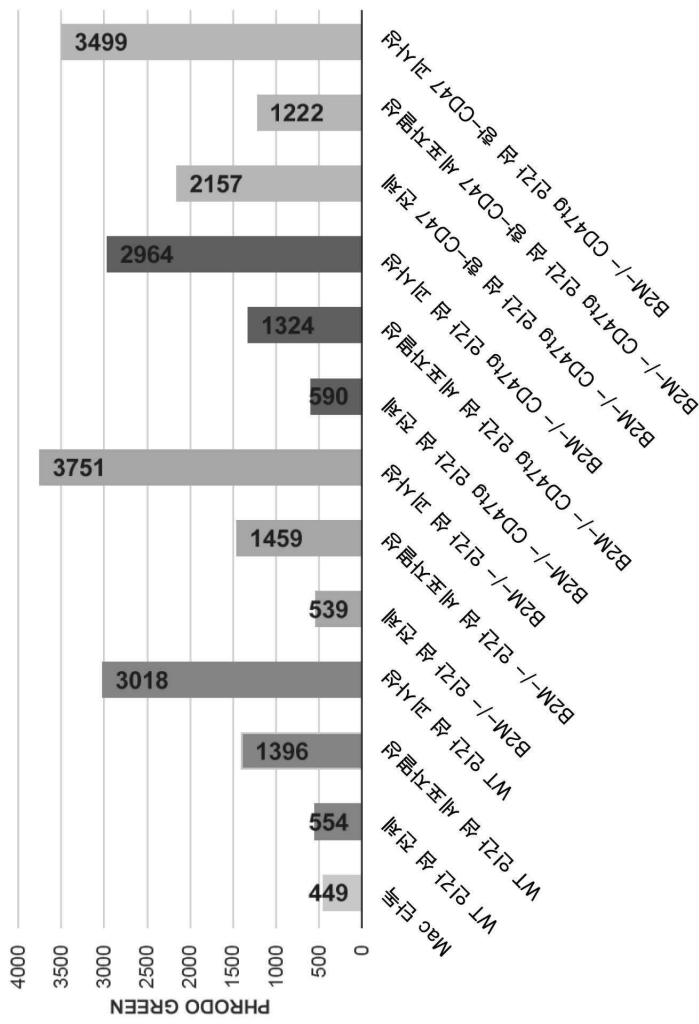
도면15c



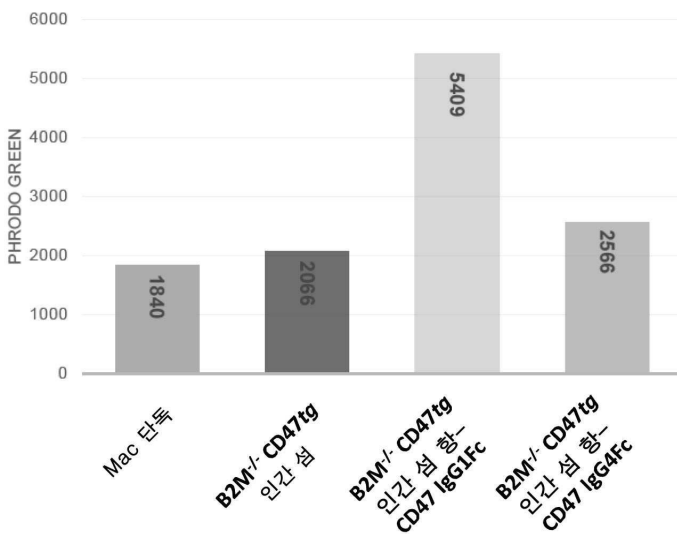
도면16



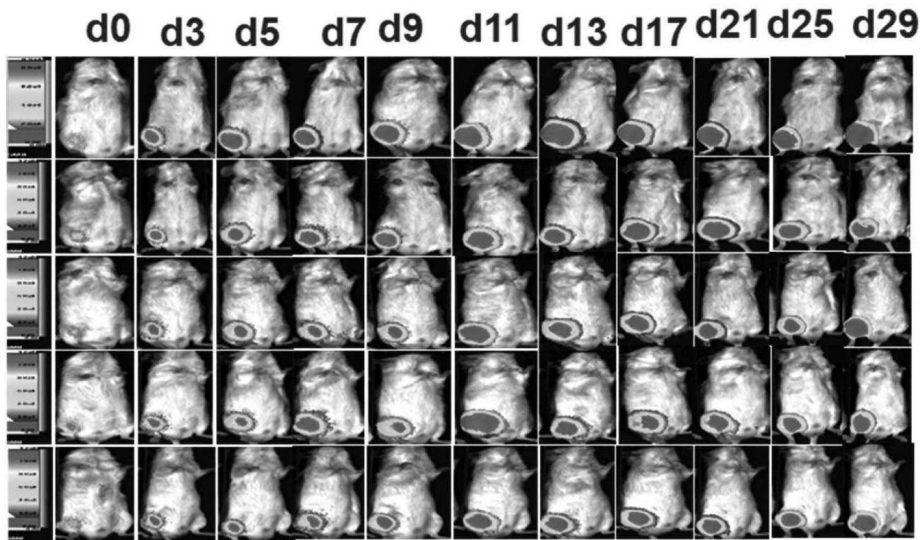
도면17



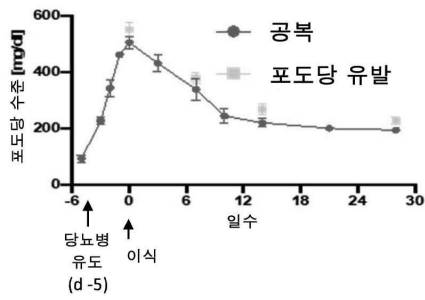
도면18



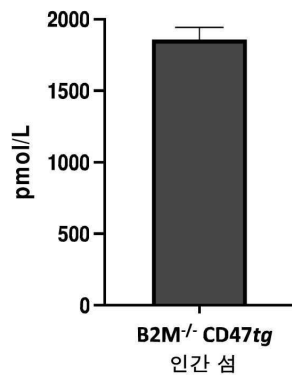
도면19a



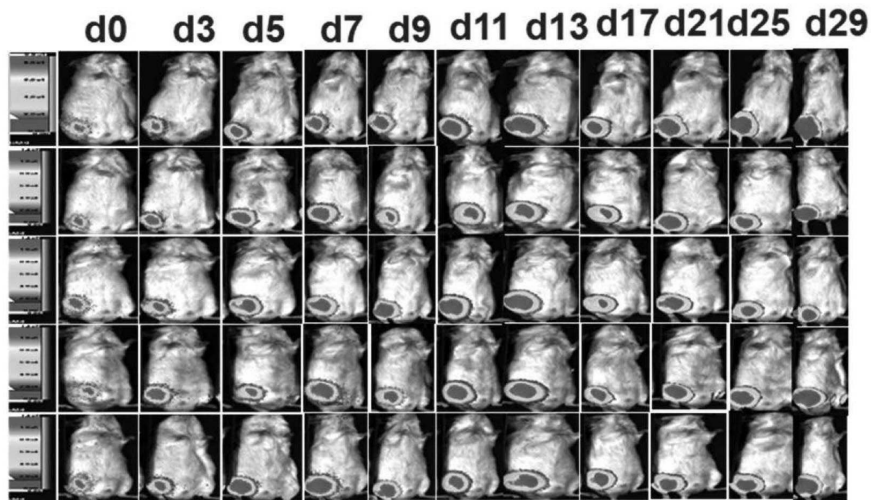
도면19b



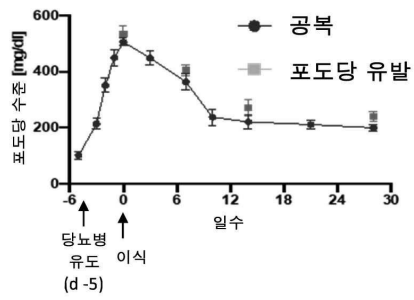
도면19c



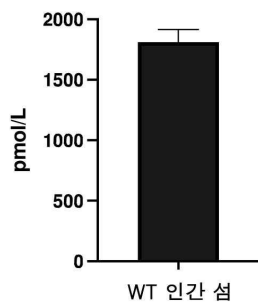
도면19d



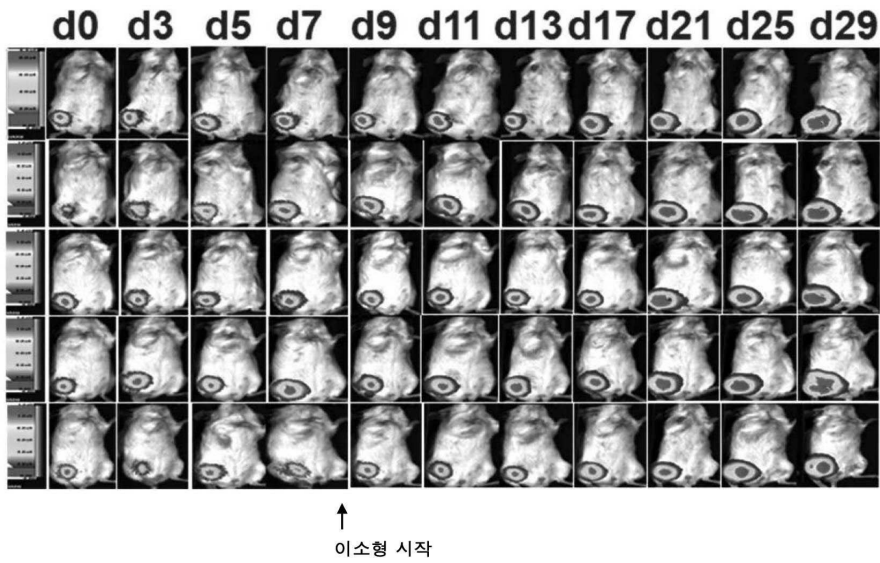
도면19e



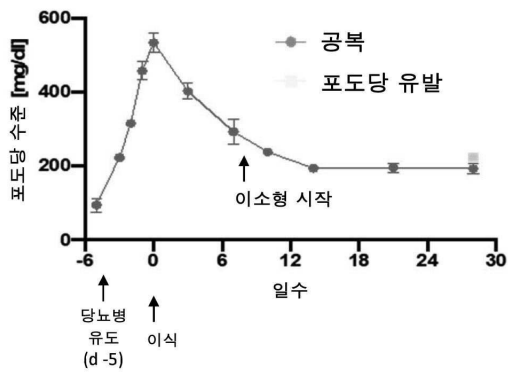
도면19f



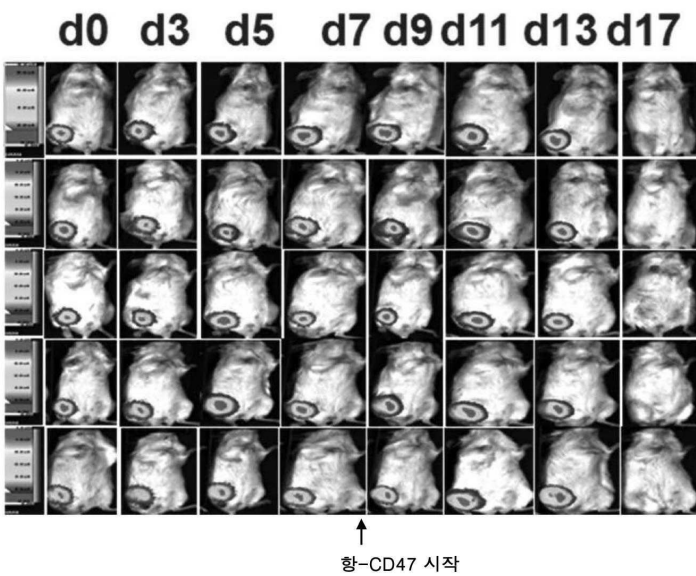
도면20a



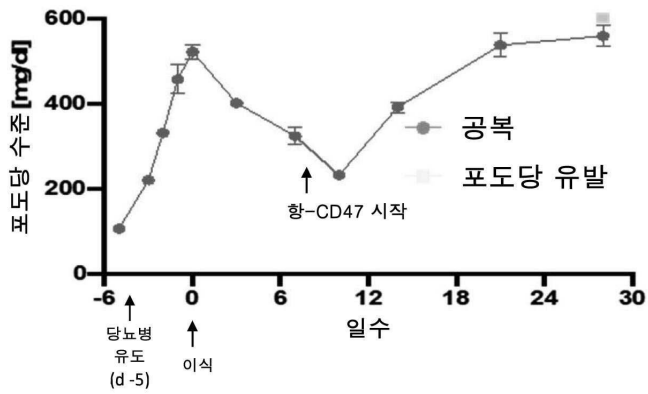
도면20b



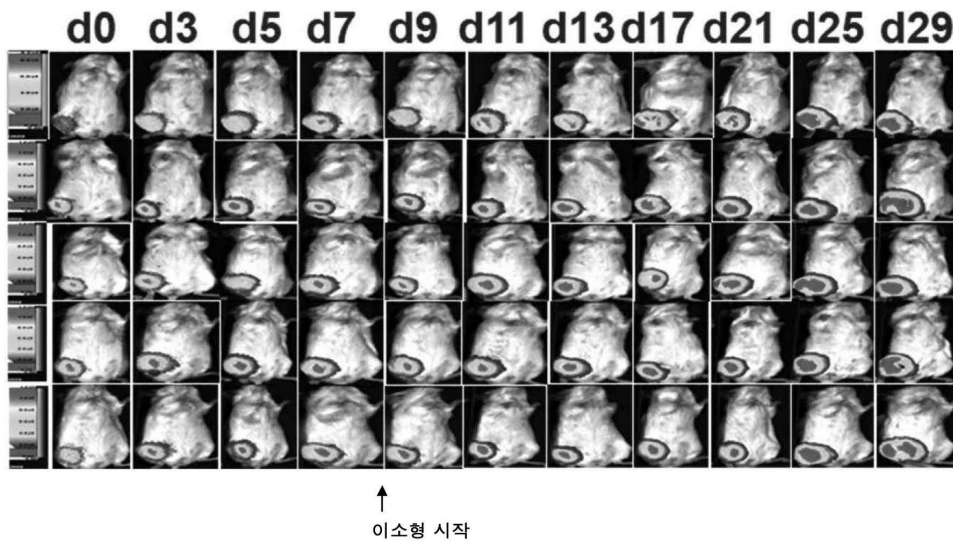
도면20c



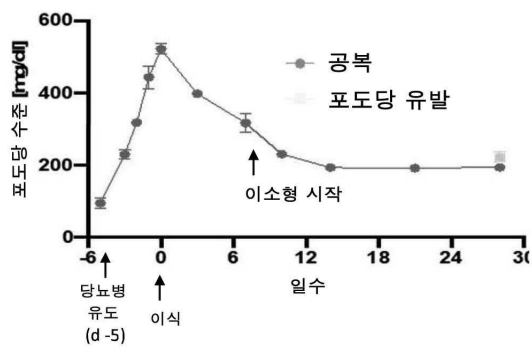
도면20d



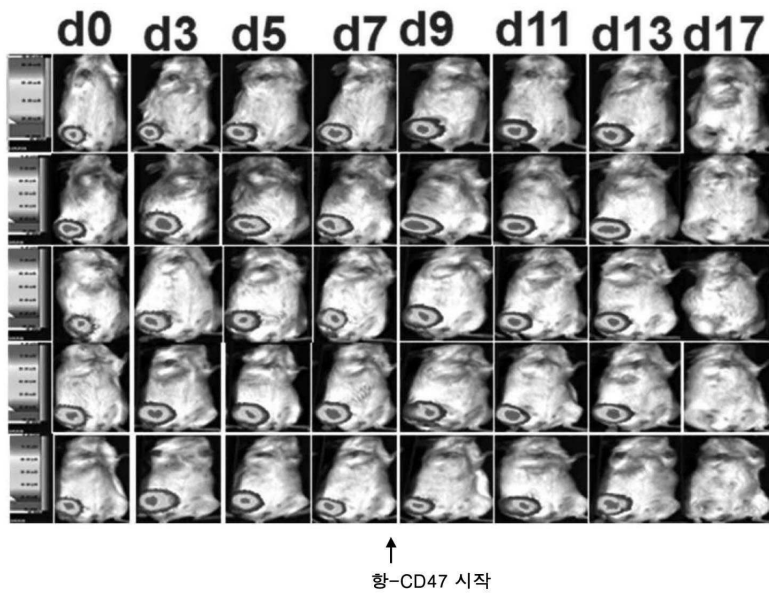
도면21a



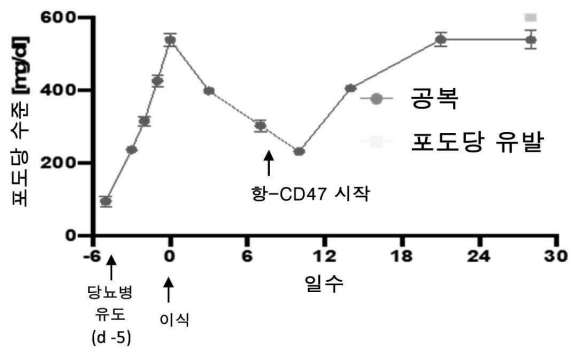
도면21b



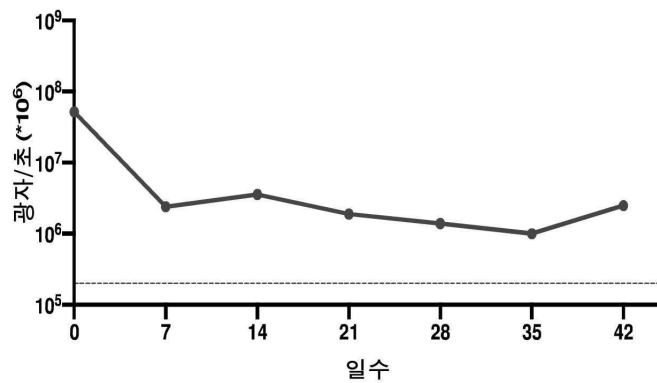
도면21c



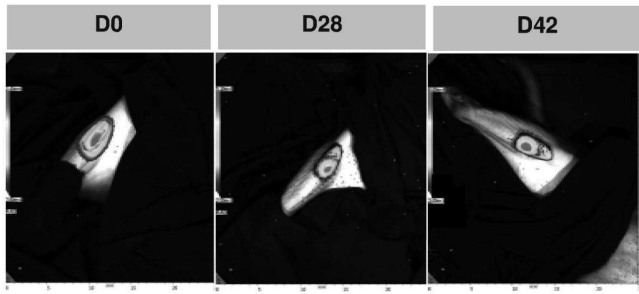
도면21d



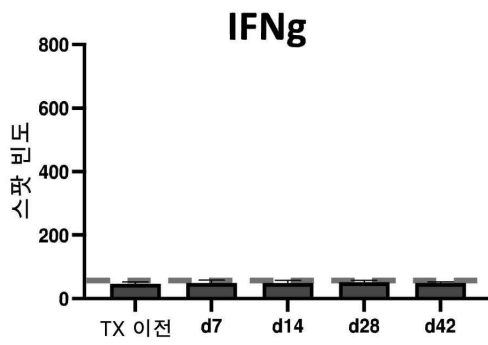
도면22a



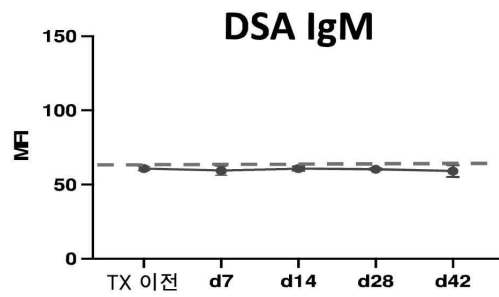
도면22b



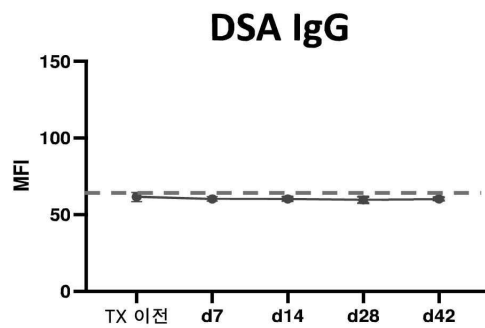
도면23a



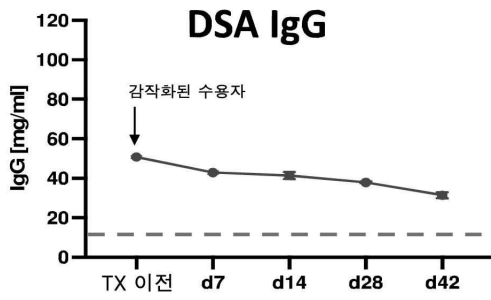
도면23b



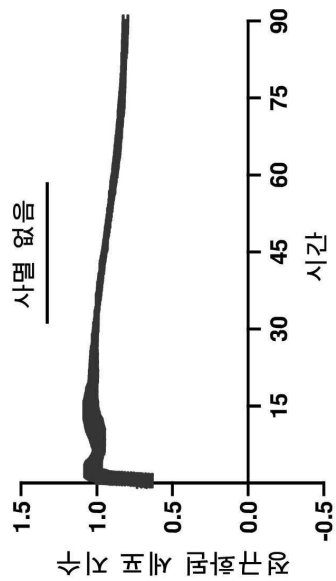
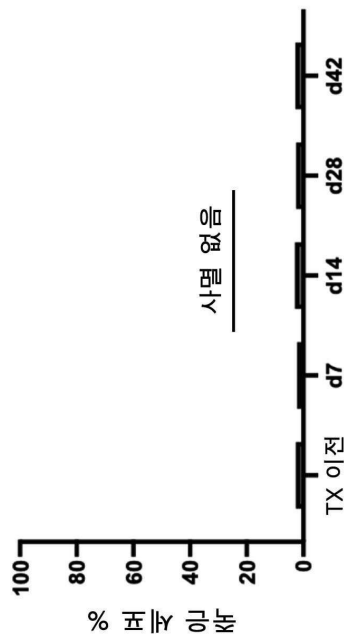
도면23c



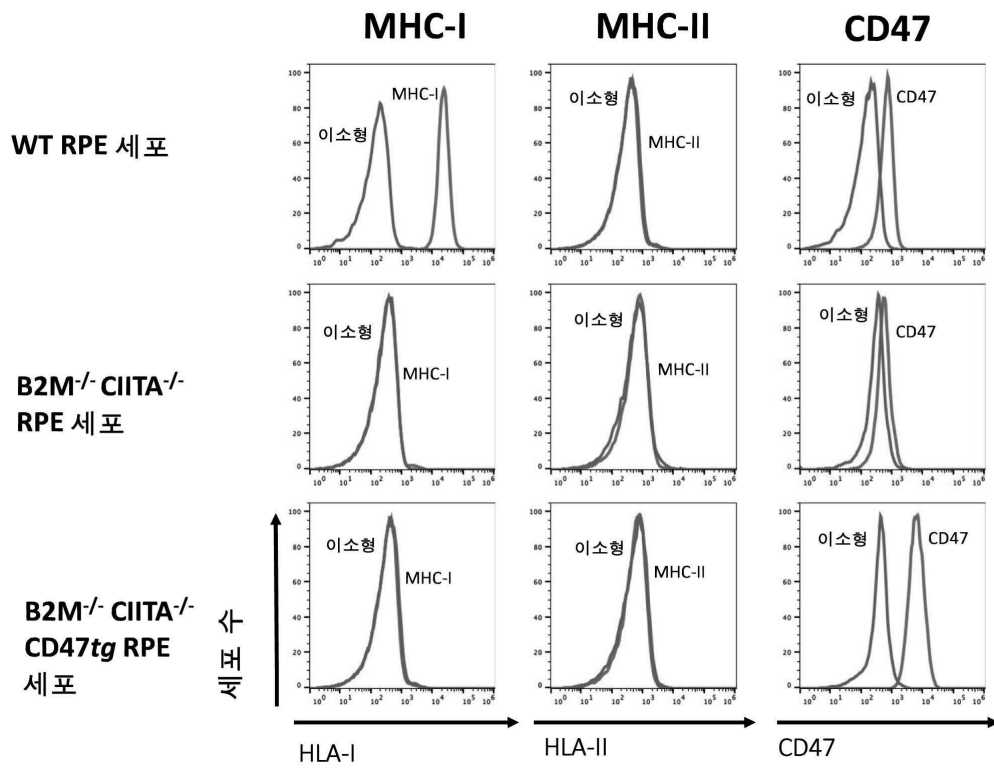
도면23d



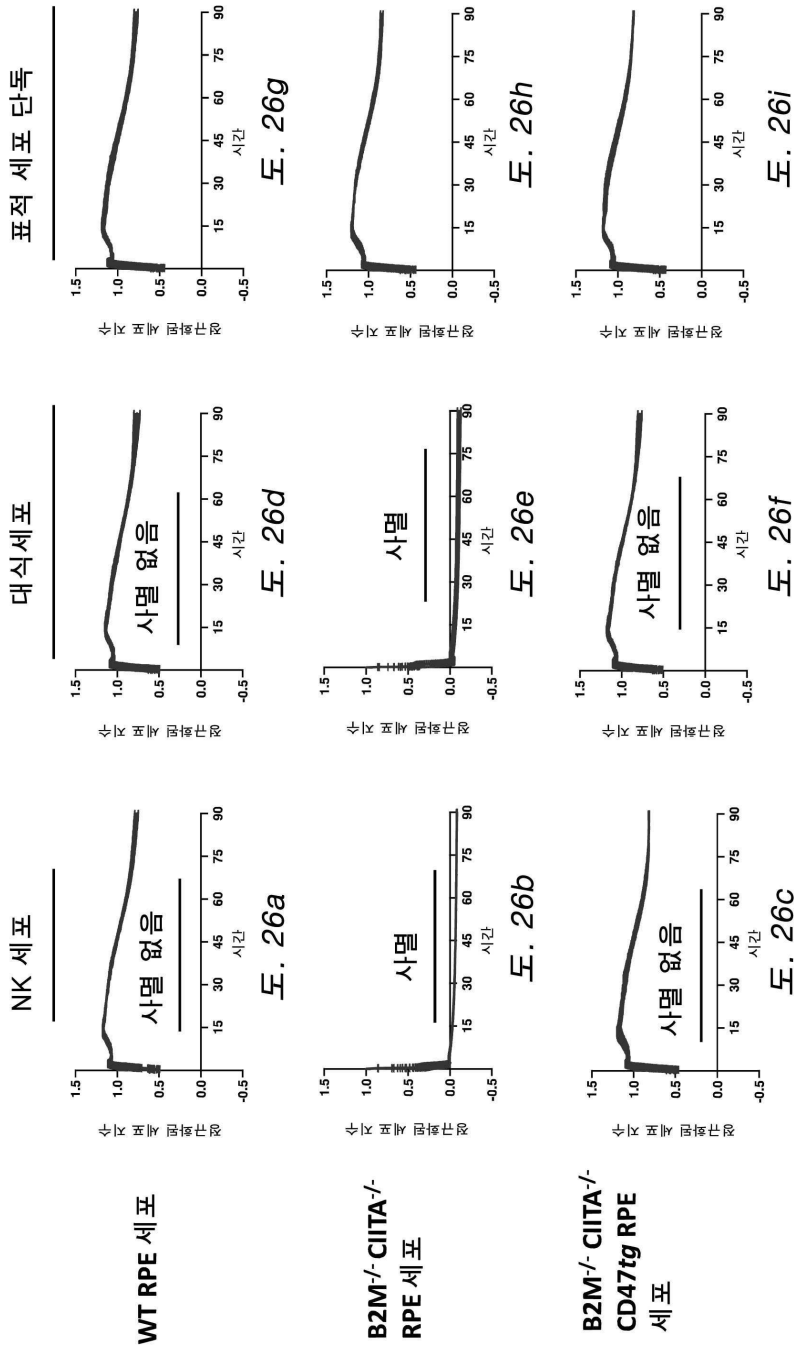
도면24



도면25



도면26



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.