(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월27일
(11) 등록번호 10-2617818
(24) 등록일자 2023년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/22 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/22 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2020-7032271
(22) 출원일자(국제) 2019년04월11일
심사청구일자 2022년04월06일
(85) 번역문제출일자 2020년11월09일
(65) 공개번호 10-2020-0142037
(43) 공개일자 2020년12월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/027019
(87) 국제공개번호 WO 2019/200122
국제공개일자 2019년10월17일
(30) 우선권주장
62/656,809 2018년04월12일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2017062451 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
프리시젼 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 노스캐롤라이나주 27701 스위트 에이-100 더램 디브렐 빌딩 302 이스트 페티그루 스트리트
(72) 발명자
스미스, 제임스, 제퍼슨
미국 27560 노스캐롤라이나주 모리스빌 위버 포레스트 웨이 1916
레이프, 자넬
미국 27587 노스캐롤라이나주 웨이크 포레스트 비스타 델 라고 레인 505
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

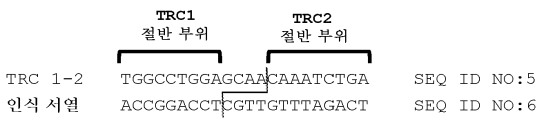
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 **인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자에 대한 특이성을 갖는 최적화된 조작된 뉴클레아제**

(57) 요 약

본 발명은 인간 T 세포 수용체 (TCR) 알파 불변 영역 유전자의 제1 엑손 내의 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 뉴클레아제를 포괄한다. 조작된 메가뉴클레아제는 적어도 하나의 최적화된 특징, 예컨대 제1 세대 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87EE와 비교할 때, 증강된 (즉, 증가된) 특이성 또는 절단 효율을 나타낼 수 있다. 본 발명은 또한, 이러한 조작된 뉴클레아제를 사용하여 유전자 변형된 세포를 만드는 방법, 및 질환, 예컨대 암을 치료하기 위한 제약 조성물 및 방법에 있어서의 상기 세포의 용도를 포괄한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
(72) 발명자
리, 후이
미국 27502 노스캐롤라이나주 아펙스 샤를리온 다운스 레인 2001
겐셀, 조헨
미국 27613 노스캐롤라이나주 롤리 브로드 스트리트 7913

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 T 세포 수용체 (TCR) 알파 불변 영역 유전자 내에 서열식별번호: 5로 이루어진 인식 서열에 결합하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제이며, 여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 조작된 메가뉴클레아제.

청구항 2

제1항의 상기 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, mRNA인 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제2항의 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 DNA 구축물.

청구항 5

제2항의 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로서, 임의로 상기 바이러스 벡터는 재조합 아데노 연관 바이러스 (AAV) 벡터인, 바이러스 벡터.

청구항 6

단리된 진핵 세포의 염색체 내의 표적 서열을 붕괴시킴으로써 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하는 방법이며, 상기 방법은 단리된 진핵 세포 내로

(a) 제1항의 상기 조작된 메가뉴클레아제, 또는

(b) 제2항 또는 제3항의 상기 폴리뉴클레오티드 - 여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제가 상기 진핵 세포에서 발현됨

를 도입하는 단계

를 포함하며,

여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제가 상기 염색체 내에 서열식별번호: 5로 이루어진 인식 서열에 절단 부위를 생성하고, 상기 표적 서열이 상기 절단 부위에서 비-상동 말단 연결에 의해 붕괴되며, 상기 방법이 수술 또는 요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료가 아닌 것인,

방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 mRNA인 방법.

청구항 8

단리된 진핵 세포의 염색체 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하는 방법이며, 상기 방법은

단리된 진핵 세포 내로

(a) 제1항의 상기 조작된 메가뉴클레아제, 또는

제2항 또는 제3항의 상기 폴리뉴클레오티드 - 여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제가 상기 진핵 세포 내의

상기 폴리뉴클레오티드에서 발현됨; 및

(b) 상기 관심 서열을 포함하는 핵산

을 도입하는 단계

를 포함하며,

여기서 상기 조작된 메가뉴클레아제가 상기 염색체 내에 서열식별번호: 5로 이루어진 인식 서열에 절단 부위를 생성하고, 상기 관심 서열이 상기 염색체 내에 상기 절단 부위에 삽입되며, 상기 방법이 수술 또는 요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료가 아닌 것인,

방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 관심 서열이 키메라 항원 수용체 또는 외인성 TCR에 대한 코딩 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 관심 서열을 포함하는 상기 핵산이 상기 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열을 추가로 포함하고, 상기 관심 서열이 상동 재조합에 의해 상기 절단 부위에 삽입되는 것인, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 mRNA인 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 관심 서열을 포함하는 상기 핵산이 바이러스 벡터에 의해 상기 진핵 세포 내로 도입되며, 임의로 상기 바이러스 벡터가 재조합 아데노 연관 바이러스 (AAV) 벡터이며, 임의로 상기 재조합 AAV 벡터가 AAV2 또는 AAV6의 혈청형을 갖는 것인, 방법.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 진핵 세포가 인간 T 세포인 방법.

청구항 14

제6항에 있어서, 상기 유전자 변형된 단리된 진핵 세포가 세포 표면 상에서 외인성 TCR을 발현하지 않는 것인 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양학, 암 면역요법, 분자 생물학 및 재조합 핵산 기술 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자에서의 인식 서열에 대한 특이성을 갖는 최적화된 조작된 뉴클레아제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 유전자 변형된 T 세포를 생성하는 방법에 있어서의 이러한 재조합 메가뉴클레아

제의 용도뿐만 아니라 대상체에서 암을 포함하는 질환을 치료하기 위해 이러한 세포를 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0002] EFS-WEB를 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0003] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 포맷으로 제출되었고 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2019년 4월 11일에 창출된, 상기 ASCII 카피는 P109070028WO00-SEQ로 명명되고 그 크기가 2700 바이트이다.

배 경 기 술

[0004] T 세포 입양 면역요법은 암 치료를 위한 유망한 접근법이다. 이러한 전략은 특이적 종양 관련 항원에 대한 특이성을 증강시키기 위해 유전자 변형된 단리된 인간 T 세포를 활용한다. 유전자 변형은 T 세포 상으로 항원 특이성을 이식하기 위해 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체의 발현을 수반할 수 있다. 외인성 T 세포 수용체와 달리, 키메라 항원 수용체는 모노클로날 항체의 가변 도메인으로부터 자신의 특이성이 유래된다. 따라서, 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포 (CAR T 세포)는 주요 조직 적합성 복합체 비-제한된 방식으로 종양 면역 반응성을 유도한다. T 세포 입양 면역요법은 B 세포 악성 종양 (예를 들어, 급성 림프모구성 백혈병, B 세포 비호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병), 다발성 골수종, 신경모세포종, 교모세포종, 진행성 신경교종, 난소암, 중피종, 흑색종, 전립선암, 췌장암 등을 포함하는 수많은 암에 대한 임상 요법으로서 활용되어 왔다.

[0005] 암 치료로서의 잠재적 유용성에도 불구하고, CAR T 세포를 사용한 입양 면역요법은 부분적으로, 세포 표면 상에서의 내인성 T 세포 수용체의 발현에 의해 제한되어 왔다. 내인성 T 세포 수용체를 발현하는 CAR T 세포는 동종 이계 환자에게 투여된 후 주요 및 소수의 조직 적합성 항원을 인식할 수 있으며, 이는 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)의 발병으로 이어질 수 있다. 그 결과, 임상 시험은 주로, 자가 CAR T 세포의 사용에 중점을 두었으며, 여기서 환자의 T 세포를 단리하고, 키메라 항원 수용체를 혼입하도록 유전자 변형시킨 다음, 이를 동일한 환자에게 재주입한다. 자가 접근법은 투여된 CAR T 세포에 대한 면역 관용성을 제공하지만; 이러한 접근법은 환자의 암이 진단된 후 환자 특이적 CAR T 세포를 생성하는 데 필요한 시간과 비용 둘 다에 의해 제약을 받는다.

[0006] 따라서, 내인성 T 세포 수용체의 발현이 감소하고 투여 시 GVHD를 개시하지 않는 제3자인 건강한 공여자로부터의 T 세포를 사용하여 제조된 "쉽게 사용할 수 있는" CAR T 세포를 개발하는 것이 유리할 것이다. 이러한 산물은 진단에 앞서 생성 및 검증될 수 있으며, 필요한 즉시 환자에게 제공될 수 있었다. 따라서, GVHD의 발생을 방지하기 위해서는 내인성 T 세포 수용체가 결여된 동종 이계 CAR T 세포를 개발하는 것이 필요하다.

[0007] 게놈 DNA의 유전자 변형은 관심 유전자 자리 내의 DNA 서열을 인식하도록 조작되는 부위 특이적, 희귀 커팅 엔도뉴클레아제를 사용하여 수행될 수 있다. 귀소 엔도뉴클레아제는 식물과 진균의 게놈에서 흔히 발견되는 15 내지 40개 염기쌍 절단 부위를 인식하는 자연 발생 뉴클레아제 군이다. 이들은 종종, 기생하는 DNA 요소, 예컨대 군 1 자기 스플라이싱 인트론 및 인테인과 연관된다. 이들은 세포 DNA 복구 기구를 동원하는, 염색체 내에 이중 가닥 파괴를 발생시킴으로써 숙주 게놈 내의 특이적 위치에서의 상동 재조합 또는 유전자 삽입을 자연스럽게 촉진시킨다 (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). 귀소 엔도뉴클레아제는 통상적으로, 4가지 패밀리: LAGLIDADG [서열식별번호 (SEQ ID NO): 2] 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cys 박스 패밀리 및 HNH 패밀리로 분류된다. 이들 패밀리는 촉매 활성 및 인식 서열에 영향을 미치는 구조적 모티프를 특징으로 한다. 예를 들어, LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 패밀리의 구성원은 보존된 LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 모티프의 1개 또는 2개의 카피를 갖는 것을 특징으로 한다 (문헌 [Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774] 참조). LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 모티프의 단일 카피를 갖는 LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 귀소 엔도뉴클레아제는 동종 이량체를 형성하는 반면, LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 모티프의 2개 카피를 가진 구성원은 단량체로서 발견된다.

[0008] I-CreI (서열식별번호: 1)는 조류 클라미도모나스 레인하르드티이(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 엽록체 염색체에서 22개 염기쌍 인식 서열을 인식하고 이를 커팅하는 귀소 엔도뉴클레아제의 LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 패밀리의 구성원이다. 유전자 선택 기술은 야생형 I-CreI 절단 부위 선호도를 변형시키기 위해 사용되었다 (Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames et al. (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178; Seligman et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould et al. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58). 보다 최근에는, 포유동물, 효모, 식물, 박테리아 및 바이러스 게놈 내의 부위를 포함하는 광범위하게 발산하는 DNA 부위를 표적으로 하는 다른 귀소 엔도뉴클레아제 및 I-CreI를 포괄적으로 재설계할 수 있는, 모노-

LAGLIDADG (서열식별번호: 2) 귀소 엔도뉴클레아제를 합리적으로 설계하는 방법이 보고되었다 (WO 2007/047859).

[0009] WO 2009/059195에 처음 기재된 바와 같이, I-CreI 및 그의 조작된 유도체는 정상적으로 이량체성이지만, 제1 서브유닛의 C-말단을 제2 서브유닛의 N-말단에 연결하는 짧은 펩티드 링커를 사용하여 단일 폴리펩티드로 융합될 수 있다 (Li et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot et al. (2009), Nucleic Acids Res. 37:5405-19). 따라서, 기능적 "단일 쇄" 메가뉴클레아제는 단일 전사체로부터 발현될 수 있다.

[0010] 작은 헤어핀 RNA, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 메가TAL 및 CRISPR 시스템의 사용을 포함하여, 내인성 TCR의 발현을 방해하기 위한 뉴클레아제의 사용이 개시되었다 (예를 들어, 문헌 [Osborn et al. (2016), Molecular Therapy 24(3): 570-581; Eyquem et al. (2017), Nature 543: 113-117]; 미국 특허 번호 8,956,828; 미국 공개 번호 US2014/0301990; 미국 공개 번호 US2012/0321667).

[0011] 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자에서 DNA 표적을 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 특이적 용도가 또한, 이전에 개시되었다. 예를 들어, 국제 공개 번호 WO 2014/191527은 TCR 알파 불변 영역 유전자의 엑손 1 내의 인식 서열 ('527 공보의 서열식별번호: 3)을 표적으로 하도록 또한 조작된 I-OnuI 메가뉴클레아제의 변이체를 개시하였다. '527 공보에서는 키메라 항원 수용체가 TCR 녹아웃 세포에서 발현될 수 있다고 논의하지만, 저자는 CAR 코딩 서열을 메가뉴클레아제 절단 부위에 삽입하는 것을 개시하지 않았다.

[0012] 더욱이, 국제 공개 번호 WO 2017/062439 및 WO 2017/062451에서, 출원인은 TCR 알파 불변 영역 유전자의 엑손 1 내의 인식 서열에 대한 특이성을 갖는 조작된 메가뉴클레아제를 개시하였다. 이들은 엑손 1에서의 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)에 대한 특이성을 갖는 "TRC 1-2 메가뉴클레아제"를 포함하였다. '439 및 '451 공보는 또한, CAR 코딩 서열 또는 외인성 TCR 코딩 서열의 TCR 1-2 메가뉴클레아제 절단 부위 내로의 표적화된 삽입을 위한 방법을 개시하였다.

[0013] 본 발명에서, 출원인은 선행 기술에서 교시된 뉴클레아제 및 방법을 개선시켰다. 광범위한 실험을 통해, 출원인은 독특하고 예측할 수 없는 잔기 조합을 포함하는 새로운 제2 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제를 생성하였으며, 이는 예기치 못하게도 '439 및 '451 출원에서 교시된 제1 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제보다 우수하다. 예를 들어, 본 발명의 제2 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 개선된 (즉, 증가된) 특이성 및 오프 타겟(off-target) 커팅 감소를 나타내고, mRNA로부터의 발현 후 세포에서의 지속 시간 감소를 나타내며, CAR T 세포를 생성하기 위해 사용될 때 시험관내에서 기능적으로 우수하고 (예를 들어, 증강된/증가된 TCR 녹아웃, 증강된/증가된 CAR 녹인, 증강된/증가된 CAR T 확장, 개선된 CAR T 세포 표현형 등), 본격적인 CAR T 세포 제조 프로세스에 사용될 때 개선된 CAR T 세포 집단을 생산한다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은 인간 T 세포 수용체 (TCR) 알파 불변 영역 유전자 (서열식별번호: 3)의 제1 엑손 내의 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 제공한다. 이러한 메가뉴클레아제는 TCR 알파 불변 영역 유전자를 붕괴시키고, 결과적으로 세포 표면 TCR의 발현 및/또는 기능을 방해하는 데 유용하다. 메가뉴클레아제 절단은 비-상동 말단 연결의 돌연변이유발 작용에 의해 또는 상동 재조합을 통해 유전자 내로 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입을 촉진함으로써 유전자 기능을 방해할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이와 같이 도입된 외인성 폴리뉴클레오티드는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하므로, 메가뉴클레아제가 내인성 TCR이 결여된 동종 이계 CAR T 세포를 생성하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 제1 세대 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87EE와 비교해서 적어도 하나의 최적화된 특징을 나타낸다. 이러한 최적화된 특징은 오프 타겟 커팅 감소를 초래하는 개선된 (즉, 증가된) 특이성, 세포에서의 지속 시간 감소 (예를 들어, mRNA로부터의 발현 후), 및/또는 TCR 알파 불변 영역 유전자의 변형 효율 증강 (즉, 증가)을 포함한다. 추가로, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포는 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포와 비교 시, 오프 타겟 커팅 및 그의 효과의 감소, 세포에서의 메가뉴클레아제의 지속 시간 감소, CAR T 확장 증강 (즉, 증가)을 포함하는 개선된 특징을 나타내며, 덜 분화된다. 또한, 본원에 의해 개시된 메가뉴클레아제 (또는 이를 코딩하는 핵산)를 도입시킨 세포의 집단은, TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 (또는 이를 코딩하는 핵산)를 도입시킨 세포의 집단과 비교할 때, 변형된 세포의 더 큰 백분율과 덜 분화된 세포의 더 큰 백분율을 갖는다.

[0015] 본 발명은 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하기 위해 조작된 메가뉴클레아제 단백질, 또는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자를 진핵 세포로 전달하는 단계를 포함하는 방법을 추가로 제공한다. 따라서, 유전자 변형

된 진핵 세포 및 그의 집단뿐만 아니라 유전자 변형된 진핵 세포 및 그의 집단을 포함하는 제약 조성물이 추가로 제공된다. 유전자 변형된 T 세포 또는 그의 집단을 투여함으로써 암을 치료하는 면역요법의 방법이 또한 제공되며, 여기서 T 세포는 종양 특이적 항원에 대한 수용체 (예를 들어, CAR 또는 외인성 TCR)를 발현한다.

[0016] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 (서열식별번호: 3)의 엑손 1 내의 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 제공한다. 이러한 조작된 메가뉴클레아제는 제1 서브유닛 및 제2 서브유닛을 포함하며, 여기서 제1 서브유닛은 인식 서열의 제1 인식 절반 부위에 결합하고 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하며, 제2 서브유닛은 인식 서열의 제2 인식 절반 부위에 결합하고, 본원에 의해 개시된 TRC 1-2L.1592 (그의 아미노산 서열은 서열식별번호: 7로서 제시된다)의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖거나, 또는 본원에 의해 개시된 TRC 1-2L.1775 메가뉴클레아제 (그의 아미노산 서열은 서열식별번호: 8로서 제시된다)의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함한다.

[0017] 특정 실시양태에서, HVR2 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7의 잔기 24, 26, 42, 44, 46, 48, 50, 70, 71, 72, 및 73에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 8의 잔기 24, 26, 38, 42, 46, 48, 50, 및 70에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7의 잔기 48, 50, 71, 72, 및 73에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 8의 잔기 48 및 50에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7 또는 서열식별번호: 8의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 및 77에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 66에 상응하는 잔기에 Y, R, K, 또는 D를 포함한다.

[0025] 특정 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24-79를 포함한다.

[0026] 특정한 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7의 잔기 7-153에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 93% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 8의 잔기 7-153에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 94% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 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, 28, 29, 또는 30개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153에 상응하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 특정 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 19에 상응하는 잔기에 G, S, 또는 A를 포함한다.

[0029] 특정 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 80에 상응하는 잔기에 E, Q, 또는 K를 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 80에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0031] 특정 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 139에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0032] 특정한 실시양태에서, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153을 포함한다.

[0033] 일부 이러한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, HVR1 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ,10, 또는 11개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 7의 잔기 219 및 231에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0035] 특정 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266, 및 268에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0036] 일부 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 257에 상응하는 잔기에 Y, R, K, 또는 D를 포함한다.

[0037] 특정한 실시양태에서, HVR1 영역은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270을 포함한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 제1 서브유닛은 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, 28, 29, 또는 30개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344에 상응하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0039] 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 210에 상응하는 잔기에 G, S, 또는 A를 포함한다.

[0040] 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 271에 상응하는 잔기에 E, Q, 또는 K를 포함한다.

[0041] 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 271에 상응하는 잔기를 포함한다.

[0042] 특정한 실시양태에서, 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344를 포함한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제의 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖고, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제의 제1 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 99% 서열 동일성을 갖고, 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 93% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 서브유닛 및/또는 제2 서브유닛은 서열식별번호: 7 및 8의 잔기 198-344 및 잔기 7-153 각각과 비교하여 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, 28, 29, 또는 30개 이하의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0044] 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 링커를 포함하며, 여기서 링커는 제1 서브유닛과 제2 서브유닛을 공유적으로 연결한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7 또는 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 97% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도

98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 특정한 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7 또는 8의 아미노산 서열을 포함한다.

[0047] 특정 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 9로서 제시된 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제와 비교 시 하기 최적화된 특징 중 적어도 하나를 나타낸다: 개선된 (즉, 증가된) 특이성, 세포에서의 감소된 지속 시간, 및 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자의 증강된 (즉, 증가된) 변형 효율.

[0048] 특정한 실시양태에서, 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제는 제1 및 제2 서브유닛을 포함하며, 여기서 제1 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR1 영역을 포함하고; 제2 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR2 영역을 포함한다.

[0049] 특정한 실시양태에서, 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제는 제1 및 제2 서브유닛을 포함하며, 여기서 제1 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 가지며, 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266, 및 268에 상응하는 잔기를 포함하는 HVR1 영역을 포함하고; 제2 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 가지며, 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, 및 77에 상응하는 잔기를 포함하는 HVR2 영역을 포함한다. 이러한 실시양태에서, HVR2 영역은 서열식별번호: 7의 잔기 48, 50, 71, 72, 및 73에 상응하는 잔기 및/또는 서열식별번호: 8의 잔기 48 및 50에 상응하는 잔기를 추가로 포함할 수 있다.

[0050] 특정한 실시양태에서, 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제는 제1 및 제2 서브유닛을 포함하며, 여기서 제1 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 가지며, 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266, 및 268에 상응하는 잔기를 포함하는 HVR1 영역을 포함하고; 제2 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 가지며, 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 및 77에 상응하는 잔기를 포함하는 HVR2 영역을 포함한다.

[0051] 또한 다른 실시양태에서, 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 내의 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제는 제1 및 제2 서브유닛을 포함하며, 여기서 제1 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 198-344와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 HVR1 영역을 포함하고; 제2 서브유닛은 (a) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 7-153과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열; 및 (b) 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 HVR2 영역을 포함한다.

[0052] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0053] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 mRNA이다.

[0054] 추가 실시양태에서, mRNA는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 및 적어도 하나의 부가의 폴리펩티드 또는 핵산을 코딩하는 폴리시스트론성 mRNA이다.

[0055] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 DNA 구축물을 제공한다.

[0056] 특정 실시양태에서, 재조합 DNA 구축물은 바이러스 벡터를 코딩한다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 아데노 연관 바이러스 (AAV) 벡터이다. 구체적 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터이다.

[0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 제공한다.

[0058] 특정 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 AAV 벡터이다. 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터이다.

[0059] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진핵 세포의 염색체 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (a) 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 제1 핵산 - 여기서 조작된 메가뉴클레아제가 진핵 세포에서 발현됨; 및 (b) 관심 서열을 포함하는 제2 핵산을 포함하는 하나 이상의 핵산을 진핵 세포 내로 도입하는 단계를 포함하며; 여기서 조작된 메가뉴클레아제가 염색체 내에 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열에 절단 부위를 생성하고; 관심 서열이 염색체 내에 상기 절단 부위에 삽입된다.

[0060] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 제2 핵산은 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열을 추가로 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다.

[0061] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 제2 핵산은 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열을 포함하지 않으며, 관심 서열은 비-상동 삽입에 의해 절단 부위에 삽입된다.

[0062] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 감소된다.

[0063] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포 또는 인간 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이다.

[0064] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 관심 서열은 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체에 대한 코딩 서열을 포함한다. 상기 방법의 특정한 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체는 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0065] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 적어도 제1 핵산이 mRNA에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0066] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 적어도 제2 핵산이 바이러스 벡터에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 상기 방법의 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 AAV 벡터이다. 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터이다.

[0067] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진핵 세포의 염색체 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (a) 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 진핵 세포 내로 도입하는 단계; 및 (b) 관심 서열을 포함하는 핵산을 진핵 세포 내로 도입하는 단계를 포함하며; 여기서 조작된 메가뉴클레아제가 염색체 내에 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열에 절단 부위를 생성하고; 관심 서열이 염색체 내에 절단 부위에 삽입된다.

[0068] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 핵산은 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열을 추가로 포함하고, 관심 서열은 상동 재조합에 의해 절단 부위에 삽입된다.

[0069] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 핵산은 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열을 포함하지 않으며, 관심 서열은 비-상동 삽입에 의해 절단 부위에 삽입된다.

[0070] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 감소된다.

[0071] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 인간 NK 세포, 또

는 그로부터 유래된 세포이다.

[0072] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 관심 서열은 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체에 대한 코딩 서열을 포함한다. 상기 방법의 특정한 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체는 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0073] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 핵산은 바이러스 벡터에 의해 진핵 세포 내로 도입된다. 상기 방법의 특정한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 AAV 벡터이다. 상기 방법의 구체적 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 AAV 벡터이다.

[0074] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진핵 세포의 염색체에서 표적 서열을 붕괴시킴으로써 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 진핵 세포 내로 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 진핵 세포에서 발현되고, 조작된 메가뉴클레아제는 염색체 내에 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열에 절단 부위를 생성하고, 표적 서열은 절단 부위에서 비-상동 말단 연결에 의해 붕괴된다.

[0075] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 감소된다.

[0076] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 인간 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이다.

[0077] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 핵산은 mRNA에 의해 진핵 세포 내로 도입된다.

[0078] 또 다른 측면에서, 본 발명은 진핵 세포의 염색체에서 표적 서열을 붕괴시킴으로써 유전자 변형된 진핵 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 진핵 세포 내로 도입하는 단계를 포함하며, 여기서 조작된 메가뉴클레아제는 염색체 내에 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열에 절단 부위를 생성하고, 표적 서열은 절단 부위에서 비-상동 말단 연결에 의해 붕괴된다.

[0079] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 감소된다.

[0080] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 진핵 세포는 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 인간 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이다.

[0081] 또 다른 측면에서, 본 발명은 그의 게놈 내에 변형된 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자를 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 제공하며, 여기서 변형된 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자는 T 세포 수용체 알파 불변 영역 내에 서열식별번호: 5 내의 엑손 1 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함하고, 유전자 변형된 진핵 세포는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 본원에 기재된 방법에 의해 제조된다.

[0082] 특정 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 유전자 변형된 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 인간 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이다.

[0083] 특정 실시양태에서, 관심 서열은 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체에 대한 코딩 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체는 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0084] 특정한 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 유전자 변형된 진핵 세포 상에서 감소된다.

[0085] 특정한 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 서열식별번호: 9로서 제시된 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제와 비교 시, 조작된 메가뉴클레아제에 의한 오프 타겟 효과 감소, 및/또는 세포에서의 조작된 메가뉴클레아제의 지속 시간 감소를 포함한다.

[0086] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열식별번호: 5를 포함하는 인식 서열에서 붕괴된 표적 서열을 갖는 염색체를 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포를 제공하며, 여기서 표적 서열은 절단 부위에서 비-상동 말단 연결에 의해 붕괴되고, 유전자 변형된 진핵 세포는 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 본원에 기재된 방법에 의해 제조된다.

[0087] 특정 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 유전자 변형된 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는

인간 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이다.

[0088] 특정한 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 유전자 변형된 진핵 세포 상에서 감소된다.

[0089] 특정한 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 서열식별번호: 9로서 제시된 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제와 비교 시, 조작된 메가뉴클레아제에 의한 오프 타겟 효과 감소, 및/또는 세포에서의 지속 시간 감소를 포함한다.

[0090] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 복수 개의 유전자 변형된 진핵 세포를 포함하는 유전자 변형된 진핵 세포의 집단을 제공한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 상기 집단 내의 세포의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 최대 100%가 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 진핵 세포이다.

[0092] 특정한 실시양태에서, 상기 집단의 유전자 변형된 진핵 세포는 유전자 변형된 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 유전자 변형된 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이다.

[0093] 특정 실시양태에서, 상기 집단의 유전자 변형된 진핵 세포는 세포 표면 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체를 포함한다. 이들 실시양태 중 일부에서, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체는 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0094] 구체적 실시양태에서, 상기 집단의 유전자 변형된 진핵 세포는 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 감소된 세포 표면 발현을 갖는다.

[0095] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이러한 질환을 치료하는 데 유용한 제약 조성물을 제공하며, 여기서 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체 및 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단의 치료 유효량을 포함한다.

[0096] 특정 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단은 유전자 변형된 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 유전자 변형된 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포로 구성된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 T 세포 또는 그의 집단에 존재하는 관심 외인성 서열은 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체에 대한 코딩 서열을 포함한다. 특정의 특정한 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체는 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 유전자 변형된 진핵 세포 상에서 감소된다.

[0099] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 적어도 하나의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA를 포함하는 지질 나노 입자, 또는 지질 나노 입자 제형을 제공한다. 일부 실시양태에서, 지질 나노 입자는 T 세포에 의한 전달 및 흡수를 증가시키는 조성물을 갖는다.

[0100] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체에게 본원에 기재된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0102] 특정 실시양태에서, 상기 방법은 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하기 위한 면역요법이다. 일부 이러한 실시양태에서, 유전자 변형된 진핵 세포는 유전자 변형된 인간 T 세포, 또는 그로부터 유래된 세포, 또는 유전자 변형된 인간 NK 세포, 또는 그로부터 유래된 세포이고, 유전자 변형된 진핵 세포에 존재하는 관심 외인성 서열은 종양 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 세포외 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 또는 외인성 T 세포 수용체에 대한 코딩 서열을 포함하며, 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 세포 표면 발현은 비변형된 대조군 세포와 비교할 때 유전자 변형된 진핵 세포 상에서 감소된다.

[0103] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 암은 암종, 림프종, 육종, 모세포종, 및 백혈병의 암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0104] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 암은 B-세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경모세포종, 골육종, 폐암, 흑색종, 전립선암, 결장암, 신장 세포 암종, 난소암, 횡문근 육종, 백혈병, 및 호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0105] 상기 방법의 특정한 실시양태에서, B-세포 기원의 암은 B-계통 급성 림프모구성 백혈병, B-세포 만성 림프구성 백혈병, B-세포 비호지킨 림프종, 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0106] 상기 방법의 특정한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 예컨대 인간일 수 있다.

[0107] 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단을 제공한다. 본 발명은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단의 용도를 추가로 제공한다. 이러한 한 측면에서, 의약은 암 치료에 유용하다.

[0108] 또 다른 측면에서, 본 발명은 질환의 치료, 및 바람직하게 암의 치료에 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0109] 도 1. 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자에서의 TRC 1-2 인식 서열. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제에 의해 표적화된 TRC 1-2 인식 서열은 2개의 인식 절반 부위를 포함한다. 각각의 인식 절반 부위는 4개의 염기쌍 중앙 서열에 의해 분리된 9개의 염기쌍을 포함한다. TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)은 TRC1 및 TRC2로서 지칭된 2개의 인식 절반 부위를 포함한다.

도 2. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 2개의 서브유닛을 포함하며, 여기서 HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 제1 인식 절반 부위 (예를 들어, TRC1)에 결합하고, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 제2 인식 절반 부위 (예를 들어, TRC2)에 결합한다. 조작된 메가뉴클레아제가 단일 쇄 메가뉴클레아제인 실시양태에서, HVR1 영역을 포함하는 제1 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛으로서 위치 설정될 수 있다. 마찬가지로, HVR2 영역을 포함하는 제2 서브유닛은 N-말단 또는 C-말단 서브유닛으로서 위치 설정될 수 있다.

도 3. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 평가하기 위한 CHO 세포에서의 리포터 검정의 개략도. 리포터 카세트가 세포의 게놈에 안정적으로 통합된 CHO 세포주가 생산되었다. 리포터 카세트는 5'에서 3' 순서로 하기를 포함하였다: SV40 조기 프로모터; GFP 유전자의 5' 2/3; 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열 (예를 들어, TRC 1-2 인식 서열); CHO 23/24 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열 (WO/2012/167192); 및 GFP 유전자의 3' 2/3. 이러한 카세트로 안정적으로 형질감염된 세포는 DNA 파괴 유도제의 부재하에서 GFP를 발현하지 않았다. 메가뉴클레아제는 각각의 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA 또는 플라스미드 DNA의 형질 도입에 의해 도입되었다. 메가뉴클레아제 인식 서열 중 하나에서 DNA 파괴가 유도될 때, GFP 유전자의 복제된 영역이 서로 재조합되어 기능적인 GFP 유전자를 생산하였다. 이어서, GFP 발현 세포의 백분율은 메가뉴클레아제에 의한 게놈 절단의 빈도의 간접 측정 기준으로서 유동 세포계수법에 의해 결정될 수 있었다.

도 4. CHO 세포 리포터 검정에서 TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 효율. TRC 1-2L.1592, TRC 1-2L.1775, 및 TRC 1-2L.1843 메가뉴클레아제는 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 표적으로 하기 위해 조작되었고, CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 관하여 스크리닝되었다. 도시된 결과는 관찰된 GFP 발현 세포의 백분율을 제공하며, 이는 표적 인식 서열 또는 CHO 23/24 인식 서열을 절단하기 위한 각각의 메가뉴클레아제의 효능을 나타낸다. 음성 대조군 (bs) 및 제1 세대 TRC 1-2x.87EE는 비교를 위해 본 검정에 추가로 포함되었다. a) TRC 1-2L.1592를 평가하는 CHO 리포터 검정. b) TRC 1-2L.1775를 평가하는 CHO 리포터 검정. c) TRC 1-2L.1843을 평가하는 CHO 리포터 검정.

도 5. CHO 세포 리포터 검정에서 TRC Off1 인식 서열 (서열식별번호: 16) 및 TRC Off2 인식 서열 (서열식별번호: 17)을 인식하고 이를 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 효율. 본 발명의 TRC 1-2 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA는 GFP 직접 반복부 사이의 Off2 인식 서열 또는 반대 선택된 Off1 인식 서열뿐만 아니라 CHO 23-24 인식 서열을 함유하는 CHO 리포터 세포로 형질감염되었다. 제2 세대 메가뉴클레아제는 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 대항하여 각각의 검정에서 비교되었다. a) TRC 1-2L.1592 및 TRC 1-2x.87EE에 의한 오프 타겟 인식 서열의 절단. b) TRC 1-2L.1775 및 TRC 1-2x.87EE에 의한 오프 타겟 인식 서열의 절단. c) TRC 1-2L.1843 및 TRC 1-2x.87EE에 의한 오프 타겟 인식 서열의 절단.

도 6. CHO 세포 리포터 검정에서 TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의

효율. TRC 1-2x.87EE (제1 세대), TRC 1-2L.1108 (중간체), 및 TRC 1-2L.1469 (중간체) 메가뉴클레아제는 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 표적으로 하기 위해 조작되었고, 독성을 결정하기 위해 뉴클레오펙션 후 2, 5, 및 7일에 CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 관하여 스크리닝하였다. 도시된 결과는 7일의 분석 기간에 걸쳐 관찰된 GFP 발현 세포의 백분율을 제공하며, 이는 시간의 함수로서 표적 인식 서열 또는 CHO 23/24 인식 서열을 절단하기 위한 각각의 메가뉴클레아제의 효능을 나타낸다.

도 7. CHO 세포 리포터 검정에서 TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 효율. 제2 세대 TRC 1-2L.1592, TRC 1-2L.1775, 및 TRC 1-2L.1843 메가뉴클레아제는 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 표적으로 하기 위해 최적화되었고, 독성을 결정하기 위해 뉴클레오펙션 후 2, 5, 및 7일에 CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 관하여 스크리닝하였다. 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제, 및 중간체 TRC 1-2L.1469 메가뉴클레아제가 또한, 비교를 위해 본 검정에 포함되었다. 도시된 결과는 7일의 분석 기간에 걸쳐 관찰된 GFP 발현 세포의 백분율을 제공하며, 이는 시간의 함수로서 표적 인식 서열 또는 CHO 23/24 인식 서열을 절단하기 위한 각각의 메가뉴클레아제의 효능을 나타낸다.

도 8. CHO 세포 리포터 검정에서 TRC Off1 및 Off2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하기 위한 조작된 메가뉴클레아제의 효율. 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제, 중간체 TRC 1-2L.1469 메가뉴클레아제, 및 제2 세대 TRC 1-2L.1592, TRC 1-2L.1775, 및 TRC 1-2L.1843 메가뉴클레아제는 TRC Off1 (서열식별번호: 16) 또는 Off2 (서열식별번호: 17) 인식 서열을 포함하는 CHO GFFP 리포터 세포에서, 독성을 결정하기 위해 뉴클레오펙션 후 2, 5, 및 7일에 CHO 세포 리포터 검정에서 효능에 관하여 스크리닝하였다. 도시된 결과는 7일의 분석 기간에 걸쳐 관찰된 GFP 발현 세포의 백분율을 제공한다. a) Off1 인식 서열의 절단. b) Off2 인식 서열의 절단.

도 9. 잠재적으로 유효한 오프 타겟 부위의 수의 측정 기준으로서 올리고 포획 데이터의 그래픽 시각화. 특정한 뉴클레아제에 의해 생성된 각각의 오프 타겟 커트는, 그 부위에서 포획되는 프로브 올리고에 대한 독특한 서열 판독물의 수를 기반으로 플로팅된다. 의도된 부위 (즉, TRC 1-2 인식 서열)는 시험된 각각의 메가뉴클레아제에 대해 가장 높은 판독물 계수를 갖는다 (원을 두름).

도 10. 올리고 포획 데이터의 그래픽 시각화이며, 여기서 오프 타겟 부위가 X 축에 정렬된 판독물의 수에 따라 플로팅되고 의도된 부위와 비교해서 미스매치된 염기쌍의 수가 색상으로 표시되며, 더 어두운 색상이 오프 타겟 부위와 의도된 결합 부위 간의 더 근접한 전반적 매칭물을 표시한다. 박스는 가장 높은 신뢰도 영역을 나타낸다.

도 11. 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제, 중간체 TRC 1-2L.1469 메가뉴클레아제, 또는 제2 세대 TRC 1-2L.1592, TRC 1-2L.1775, 및 TRC 1-2L.1843 메가뉴클레아제를 사용하여 생성된 CAR T 세포의 시험관내 분석을 요약한 표. 메가뉴클레아제는 유전자 편집 효율, 편집 후 확장, 및 분화 잠재력에 관하여 스크리닝되었다. CAR T 세포는 3명의 상이한 건강한 인간 공여자로부터 수득된 세포로부터 준비되었으며, 3가지 상이한 작동인자에 의해 실험을 수행하였다.

도 12. 3명의 상이한 건강한 인간 공여자로부터 수득된 T 세포 집단에서 생성된 올리고 포획 데이터의 그래픽 시각화.

도 13. 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제, 또는 제2 세대 TRC 1-2L.1592, TRC 1-2L.1775, 및 TRC 1-2L.1843 메가뉴클레아제를 사용하여 생성된 CAR T 세포의 시험관내 분석. a) 편집 후 제0일, 제4일 및 제8일에 세포의 총 수. b) 편집 후 제0일, 제4일 및 제8일에 편집된 세포 (즉, TCR-음성)의 총 수. c) 편집 후 제0일, 제4일 및 제8일에 TCR-음성/CAR-양성 세포의 총 수.

도 14. 항원 보유 표적 세포와의 공동 배양 후 CAR T 세포 확장. 확장은 5 일 동안 1:1 및 1:2의 E:T 비율에서 CD19+ 종양 주 라지 또는 Nalm6과 CAR T 세포의 공동 배양 후 평가되었다. 세포 투입 수는 파선으로써 확인된다.

도 15. 항원 보유 표적 세포와의 공동 배양 후 CAR T 세포 확장. 확장은 5 일 동안 1:2의 E:T 비율에서 라지 CD19+ 종양 주와 CAR T 세포의 공동 배양 후 평가되었다. a) 라지 세포와의 공동 배양 후 배양물 중의 CAR-양성 세포의 총 수. b) 라지 세포와 CAR T 세포의 공동 배양 후 배양물 중의 나머지 CD19-양성 세포의 총 수.

도 16. 2일 동안 항원 보유 표적 세포와의 공동 배양 후 배양 상청액 내로의 CAR T 세포 시토카인 분비. 시토카인 분비는 1:1 및 1:2의 E:T 비율에서 CD19+ 종양 주 라지 또는 Nalm6과 CAR T 세포의 공동 배양 후 평가되었다. CD19-음성 K562 골수성 백혈병 세포를 대조군으로서 사용하였다. a) IL-2 분비. b) TNF-알파 분비. c)

INF-감마 분비. D) 그란자임 B 분비. E) 퍼포린 분비.

도 17. CAR T 세포에서 메가뉴클레아제 발현의 웨스턴 블롯 분석. 세포를 TRC 1-2x.87EE 또는 TRC 1-2L.1592 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 전기천공한 다음, TRC 1-2 부위에 삽입하도록 설계된 항-CD19 CAR을 코딩하는 공여자 주형을 운반하는 재조합 AAV6 벡터로 형질 도입시켰다. 전기천공 후 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 및 168시간에, 메가뉴클레아제 단백질 발현을 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정하였다. 동일한 공여자로부터의 모의 세포를 활성화시키고 뉴클레아제 처리군과 동일한 배지에서 배양하며, 뉴클레아제 처리군을 전기천공시킨 후 24시간에 수거하였다.

도 18. TRC 1-2x.87EE 또는 TRC 1-2L.1592를 사용하는 대규모 CAR T 제조 프로세스 실행의 제0일, 제3일, 제8일 (CD3-양성 세포 고갈 전 및 후) 및 제13일에 생존 세포의 총 수.

도 19. TRC 1-2x.87EE 또는 TRC 1-2L.1592를 사용하는 대규모 CAR T 제조 프로세스 실행의 제8일에 생존 CD3-음성 세포의 총 수.

도 20. TRC 1-2x.87EE 또는 TRC 1-2L.1592를 사용하는 대규모 CAR T 제조 프로세스 실행의 제8일 (CD3-양성 세포 고갈 전 및 후) 및 제13일에 CAR-양성인 CD3-음성 세포의 백분율.

서열의 간단한 설명

서열식별번호: 1은 클라미도모나스 레인하르드티이로부터의 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 2는 LAGLIDADG 모티프의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 3은 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 (NCBI 유전자 ID NO. 28755)의 핵산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 4는 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 5는 TRC 1-2 인식 서열의 센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 6은 TRC 1-2 인식 서열의 안티센스 가닥의 핵산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 7은 TRC 1-2L.1592 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 8은 TRC 1-2L.1775 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 9는 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 10은 TRC 1-2L.1592 메가뉴클레아제 TRC1-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 11은 TRC 1-2L.1775 메가뉴클레아제 TRC1-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 12는 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 TRC1-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 13은 TRC 1-2L.1592 메가뉴클레아제 TRC2-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 14는 TRC 1-2L.1775 메가뉴클레아제 TRC2-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 15는 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 TRC2-결합 서브유닛의 아미노산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 16은 Off1 인식 서열의 핵산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 17은 Off2 인식 서열의 핵산 서열을 제시한다.

서열식별번호: 18은 폴리펩티드 링커의 아미노산 서열을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0110] 1.1 참조 및 정의

[0111] 본원에서 언급된 특허 및 과학 문헌은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 이용 가능한 지식을 확립한다. 본원에서 인용되는 발행된 미국 및 비-미국 특허, 허용된 출원, 공개된 미국, 비-미국 및 PCT 출원, 공동 소유 및

공동 계류중인 미공개 미국 특허 출원, 공개된 해외 출원, 및 진뱅크(GenBank) 데이터베이스 서열, 공개 유전자 및 단백질 데이터베이스 수탁 번호 또는 코드 (및 이와 연관된 핵산 및/또는 아미노산 서열)를 포함하는 과학적, 기술적 및 의학적 참고문헌은, 각각이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함된다고 표시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0112] 본 발명은 상이한 형태로 구현될 수 있으며 본원에 제시된 실시양태로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 오히려, 이들 실시양태는 본 개시 내용이 철저하고 완전하며, 본 발명의 범위를 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 완전히 전달하도록 제공된다. 예를 들어, 한 실시양태에 대해 예시된 특징은 다른 실시양태에 혼입될 수 있고, 특정한 실시양태에 대해 예시된 특징은 그 실시양태로부터 결실될 수 있다. 또한, 본 발명으로부터 벗어나지 않는, 본원에 제안된 실시양태에 대한 수많은 변이 및 부가가 본 개시 내용에 비추어 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0113] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 우선일 당시 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 본 발명의 설명에 사용된 전문 용어는 단지 특정한 실시양태를 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다.

[0114] 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 다른 참고문헌은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 예를 들어, "세포"는 단일 세포 또는 다수의 세포를 의미할 수 있다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같은, 구체적으로 달리 표시되지 않는 한, 단어 "또는"은 "중 하나/또는"의 배타적 의미가 아니라 "및/또는"의 포괄적 의미로 사용된다.

[0117] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "엔도뉴클레아제"는 폴리뉴클레오티드 쇄 내의 포스포디에스테르 결합을 절단하는 효소를 지칭한다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같은, 이중 가닥 DNA와 관련하여, 용어 "절단하다" 또는 "절단"은 본원에 "절단 부위"로서 지칭된, 표적 서열 내에서 이중 가닥 파괴를 초래하는 표적 서열 내의 인식 서열의 백본 내의 포스포디에스테르 결합의 엔도뉴클레아제 매개된 가수 분해를 지칭한다. 엔도뉴클레아제에 따라, 절단은 평활 말단이 있는 이중 가닥 단편 또는 5' 또는 3' 염기 오버행이 있는 단편을 초래할 수 있다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "메가뉴클레아제"는 12개 초과 염기쌍인 인식 서열에서 이중 가닥 DNA에 결합하는 엔도뉴클레아제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열은 22개 염기쌍이다. 메가뉴클레아제는 I-CreI로부터 유래되는 엔도뉴클레아제일 수 있고, 예를 들어, DNA 결합 특이성, DNA 절단 활성, DNA 결합 친화성, 또는 이량체화 특성과 관련하여 자연 I-CreI와 비교하여 변형시킨 I-CreI의 조작된 변이체를 지칭할 수 있다. 이러한 I-CreI의 변형된 변이체를 생산하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 그 전체 내용이 참조로 포함된 WO 2007/047859). 본원에 사용된 바와 같은 메가뉴클레아제는 이종 이량체로서 이중 가닥 DNA에 결합한다. 메가뉴클레아제는 또한, 한 쌍의 DNA 결합 도메인이 펩티드 링커를 사용하여 단일 폴리펩티드로 연결되는 "단일 쇄 메가뉴클레아제"일 수 있다. 용어 "귀소 엔도뉴클레아제"는 용어 "메가뉴클레아제"와 동의어이다. 본 개시 내용의 메가뉴클레아제는 본원에 기재된 바와 같은 표적화된 세포, 특히 인간 T 세포에서 발현될 때 실질적으로 무독성이므로, 세포는 전반적인 세포 생존율에 대한 실질적인 해로운 효과 또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 측정될 때 메가뉴클레아제 절단 활성에 있어서의 현저한 감소를 관찰하지 않고서도 형질감염되고 37℃ 하에 유지될 수 있다.

[0120] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "단일 쇄 메가뉴클레아제"는 링커에 의해 연결된 한 쌍의 뉴클레아제 서브유닛을 포함하므로, 이러한 서브유닛이 기능적으로 유사한 이종 이량체와 상호 작용하여 이중 가닥 인식 부위를 절단하도록 하는 폴리펩티드를 지칭한다. 단일 쇄 메가뉴클레아제는 하기 구성을 갖는다: N-말단 서브유닛 - 링커 - C-말단 서브유닛. 2개의 메가뉴클레아제 서브유닛은 일반적으로, 아미노산 서열에 있어서 동일하지 않을 것이고 인식 서열 내의 동일하지 않은 DNA 절반 부위를 인식할 것이다. 따라서, 단일 쇄 메가뉴클레아제는 전형적으로, 슈도-팔린드롬성 또는 비-팔린드롬성 인식 서열을 절단한다. 단일 쇄 메가뉴클레아제는 실제로 이량체가 아니지만, "단일 쇄 이종 이량체" 또는 "단일 쇄 이종 이량체성 메가뉴클레아제"로서 지칭될 수 있다. 명확성을 위해, 달리 명시되지 않는 한, 용어 "메가뉴클레아제"는 이량체성 또는 단일 쇄 메가뉴클레아제를 지칭할 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "링커"는 2개의 메가뉴클레아제 서브유닛을 단일 폴리펩티드로 연결하는 데 사용되는 외인성 펩티드 서열을 지칭한다. 링커는 자연 단백질에서 발견되는 서열을 가질 수 있거나, 또는 임의

의 자연 단백질에서 발견되지 않는 인공 서열일 수 있다. 링커는 가요성이고 2차 구조가 결여되거나 또는 생리적 조건 하에서 특이적 3차원 구조를 형성하는 경향을 가질 수 있다. 링커는 미국 특허 번호 8,445,251, 9,340,777, 9,434,931 및 10,041,053 (이들 각각은 그 전체 내용이 참조로 포함된다)에 의해 포괄된 것 중 임의의 것을 포함할 수 있으나, 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 154-195를 제시하는 서열식별번호: 18과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열식별번호: 7 또는 8의 잔기 154-195를 제시하는 서열식별번호: 18을 포함하는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같은, 단백질과 관련하여, 용어 "재조합" 또는 "조작된"은 단백질을 코딩하는 핵산, 및 단백질을 발현하는 세포 또는 유기체에 유전 공학 기술을 적용한 결과로서 변경된 아미노산 서열을 갖는 것을 의미한다. 핵산과 관련하여, 용어 "재조합" 또는 "조작된"은 유전 공학 기술의 적용의 결과로서 변경된 핵산 서열을 갖는 것을 의미한다. 유전 공학 기술은 PCR 및 DNA 클로닝 기술; 형질감염, 형질전환 및 다른 유전자 전달 기술; 상동 재조합; 부위 지정 돌연변이유발; 및 유전자 융합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 정의에 따르면, 자연 발생 단백질과 동일한 아미노산 서열을 갖지만 이종 숙주에서의 클로닝 및 발현에 의해 생산된 단백질은 재조합으로 간주되지 않는다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "야생형"은 동일한 유형의 유전자의 대립 유전자 집단에서 가장 흔한 자연 발생 대립 유전자 (즉, 폴리뉴클레오티드 서열)를 지칭하며, 여기서 야생형 대립 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드는 그의 원래 기능을 가지고 있다. 용어 "야생형"은 또한 야생형 대립 유전자에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 지칭한다. 야생형 대립 유전자 (즉, 폴리뉴클레오티드) 및 폴리펩티드는 야생형 서열(들)과 비교하여 하나 이상의 돌연변이 및/또는 치환을 포함하는 돌연변이체 또는 변이체 대립 유전자 및 폴리펩티드와 구별될 수 있다. 야생형 대립 유전자 또는 폴리펩티드가 유기체에 정상적 표현형을 부여할 수 있는 반면, 돌연변이체 또는 변이체 대립 유전자 또는 폴리펩티드는 일부 경우에, 변경된 표현형을 부여할 수 있다. 야생형 뉴클레아제는 재조합 또는 비-자연 발생 뉴클레아제와 구별될 수 있다. 용어 "야생형"은 또한, 특정한 유전자의 야생형 대립 유전자를 보유하는 세포, 유기체 및/또는 대상체, 또는 비교 목적으로 사용되는 세포, 유기체 및/또는 대상체를 지칭할 수 있다.

[0124] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유전자 변형된"은 게놈 DNA 서열이 재조합 기술에 의해 의도적으로 변형된 세포 또는 유기체, 또는 그의 조상을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "유전자 변형된"은 용어 "트랜스제닉"을 포괄한다.

[0125] 재조합 단백질과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "변형"은 참조 서열 (예를 들어, 야생형 또는 천연 서열)과 비교하여 재조합 서열 내의 아미노산 잔기의 임의의 삽입, 결실 또는 치환을 의미한다.

[0126] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "인식 서열" 또는 "인식 부위"는 엔도뉴클레아제에 의해 결합되고 절단되는 DNA 서열을 지칭한다. 메가뉴클레아제의 경우, 인식 서열은 4개의 염기쌍에 의해 분리된 한 쌍의 역전된 9개 염기쌍 "절반 부위"를 포함한다. 단일 쇄 메가뉴클레아제의 경우, 단백질의 N-말단 도메인은 제1 절반 부위와 접촉하고, 단백질의 C-말단 도메인은 제2 절반 부위와 접촉한다. 메가뉴클레아제에 의한 절단은 4개의 염기쌍 3' "오버행"을 산출한다. "오버행" 또는 "점착성 말단"은 이중 가닥 DNA 서열의 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생산될 수 있는 짧은 단일 가닥 DNA 세그먼트이다. I-CreI로부터 유래된 메가뉴클레아제 및 단일 쇄 메가뉴클레아제의 경우, 오버행은 22개 염기쌍 인식 서열의 염기 10-13을 포함한다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하는 세포의 염색체 DNA의 영역을 지칭한다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "DNA 결합 친화성" 또는 "결합 친화도"는 메가뉴클레아제가 참조 DNA 분자 (예를 들어, 인식 서열 또는 임의의 서열)와 비-공유적으로 연합하는 경향을 의미한다. 결합 친화도는 해리 상수 Kd로써 측정된다. 본원에 사용된 바와 같은, 참조 인식 서열에 대한 뉴클레아제의 Kd가 참조 뉴클레아제와 비교하여 통계적으로 유의미한 퍼센트 변화 또는 생물학적으로 유의미한 양 (예를 들어, 적어도 2x, 또는 2x 내지 10x) 만큼 증가 또는 감소되는 경우, 이러한 뉴클레아제는 "변경된" 결합 친화도를 갖는다.

[0129] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "특이성"은 인식 서열로서 지칭되는 특정한 염기쌍 서열에서만 또는 특정한 인식 서열 세트에서만 이중 가닥 DNA 분자를 인식하고 이를 절단할 수 있는 뉴클레아제의 능력을 의미한다. 인식 서열 세트는 특정의 보존된 위치 또는 서열 모티프를 공유할 것이지만, 하나 이상의 위치에서 퇴화될 수 있다.

고도로 특이적인 뉴클레아제는 단 하나 또는 매우 적은 인식 서열을 절단할 수 있다. 특이성은 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0130] 본원에서 사용된 바와 같은, 뉴클레아제는 생리학적 조건 하에서 참조 뉴클레아제 (예를 들어, 야생형)에 결합되지 않고 이에 의해 절단되지 않는 인식 서열에 결합하고 이를 절단하는 경우에, 또는 인식 서열의 절단 속도가 참조 뉴클레아제와 비교하여 생물학적으로 유의미한 양 (예를 들어, 적어도 2x 또는 2x-10x) 만큼 증가 또는 감소되는 경우에, "변경된" 특이성을 갖는다.

[0131] 일부 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 (그의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9로서 제시된다)와 비교 시, 서열식별번호: 5를 포함하는 표적 인식 서열 (즉, TRC 1-2)에 대한 개선된 (즉, 증가된) 특이성을 갖는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제와 비교 시 감소된 오프 타겟 절단을 나타낸다. 메가뉴클레아제에 의한 오프 타겟 절단은, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 올리고 포획 분석, T7 엔도뉴클레아제 I (T7E) 검정, 디지털 PCR, 특정한 오프 타겟 부위의 표적화 시퀀싱, 엑솜 시퀀싱, 전체 게놈 시퀀싱, 스트렙타비딘 상에서의 직접 계내 파괴 표지화 강화 및 차세대 시퀀싱 (BLESS), 시퀀싱에 의해 가능해진 DSB의 게놈 전반에서의 편견없는 확인 (GUIDE-seq) 및 선형 증폭 매개된 고 처리량 게놈 전반에서의 전위 시퀀싱 (LAM- HTGTS)을 포함한, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zischewski et al. (2017) Biotechnology Advances 35(1):95-104] 참조; 이는 그 전체 내용이 참조로 포함된다).

[0132] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "상동 재조합" 또는 "HR"은 복구 주형으로서 상동 DNA 서열을 사용하여 이중 가닥 DNA 파괴가 복구되는 자연 세포성 프로세스를 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976] 참조). 상동 DNA 서열은 내인성 염색체 서열 또는 세포에 전달된 외인성 핵산일 수 있다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "비-상동 말단 연결" 또는 "NHEJ"는 2개의 비-상동 DNA 세그먼트를 직접 연결함으로써 이중 가닥 DNA 파괴를 복구하는 자연적인 세포성 프로세스를 지칭한다 (예를 들어, 문헌 [Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976] 참조). 비-상동 말단 연결에 의한 DNA 복구는 오류가 발생하기 쉬우며 종종 복구 부위에서 DNA 서열의 주형이 없는 부가 또는 결실을 초래한다. 일부 경우에, 표적 인식 서열에서의 절단은 표적 인식 부위에서 NHEJ를 초래한다. 유전자의 코딩 서열에서의 표적 부위의 뉴클레아제-유도된 절단에 이어 NHEJ에 의한 DNA 복구는 유전자 기능을 방해하는 돌연변이, 예컨대 프레임시프트 돌연변이를 코딩 서열 내로 도입할 수 있다. 따라서, 조작된 뉴클레아제를 사용하여 세포 집단에서 유전자를 효과적으로 녹아웃시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "표적 서열을 붕괴하는 것"은 유전자 기능을 방해하고 그에 의해 코딩되는 폴리펩티드/발현 산물의 발현 및/또는 기능을 방지하는 돌연변이 (예를 들어, 프레임시프트 돌연변이)의 도입을 지칭한다.

[0134] 본원에 사용된 바와 같은, "상동성 아암(arm)" 또는 "메가뉴클레아제 절단 부위에 플랭킹된 서열에 상동인 서열"은 메가뉴클레아제에 의해 생성된 절단 부위로의 핵산 분자의 삽입을 촉진하는 핵산 분자의 5' 및 3' 말단에 플랭킹된 서열을 지칭한다. 일반적으로, 상동성 아암은 적어도 50개 염기쌍, 바람직하게 적어도 100개 염기쌍, 및 2000개 이하 또는 그 초과의 염기쌍의 길이를 가질 수 있으며, 게놈에서의 그의 상응하는 서열과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95% 또는 그 초과의 서열 상동성을 가질 수 있다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같은, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 항원에 대한 특이성을 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 인간 T 세포)에 부여하거나 이식하는 조작된 수용체를 지칭한다. 키메라 항원 수용체는 전형적으로, 적어도 세포외 리간드 결합 도메인 또는 모이어티, 및 하나 이상의 시그널링 도메인 및/또는 공동 자극 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0136] 일부 실시양태에서, 세포외 리간드 결합 도메인 또는 모이어티는 특정한 에피토프 또는 항원 (예를 들어, 세포, 예컨대 암 세포 또는 다른 질환 유발 세포 또는 입자의 표면 상에 우선적으로 존재하는 에피토프 또는 항원)에 대한 특이성을 제공하는, 모노클로날 항체로부터 유래된 단일 쇄 가변 단편 (scFv)의 형태이다. 일부 실시양태에서, scFv는 링커 서열을 통해 부착된다. 다양한 실시양태에서, 세포외 리간드 결합 도메인은 임의의 관심 항원 또는 에피토프에 특이적이다. 일부 실시양태에서, scFv는 뮤린, 인간화 또는 완전한 인간이다.

[0137] 키메라 항원 수용체의 세포외 도메인은 또한, B 림프구 상의 자가 항원 특이적 B 세포 수용체에 의해 인식될 수 있으므로, T 세포가 항체 매개된 자가 면역 질환에서 자가 반응성 B 림프구를 특이적으로 표적화하고 사멸하도록 지시하는 자가 항원 (문헌 [Payne et al. (2016), Science 353 (6295): 179-184] 참조)을 포함할 수 있다.

이러한 CAR은 키메라 자가 항체 수용체 (CAAR)로서 지칭될 수 있으며, 이들의 용도가 본 발명에 포괄된다.

[0138] 키메라 항원 수용체의 세포외 도메인은 또한, 관심 항원에 대한 자연 발생 리간드, 또는 관심 항원에 결합할 수 있는 능력을 보유하는 자연 발생 리간드의 단편을 포함할 수 있다.

[0139] 세포내 자극 도메인은 항원 결합 후에 활성화 시그널을 면역 이펙터 세포에 전달하는 하나 이상의 세포질 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 세포질 시그널링 도메인은 CD3□를 포함할 수 있으나, 제한되지 않는다. 세포내 자극 도메인은 또한, 리간드 결합 후 증식 및/또는 세포-생존 시그널을 전달하는 하나 이상의 세포내 공동 자극 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 세포내 공동 자극 도메인은 관련 기술 분야에 공지된 것 중 임의의 것일 수 있으며, CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3; 및 CD83, N1, N6 또는 그의 임의의 조합과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있으나, 제한되지 않는다.

[0140] 키메라 항원 수용체는 힌지 또는 스페이서 서열을 통해 세포외 리간드 결합 도메인에 부착되는 막 횡단 도메인을 포함하는 부가의 구조적 요소를 추가로 포함할 수 있다. 막 횡단 도메인은 임의의 막 결합된 또는 막 횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 막 횡단 폴리펩티드는 T-세포 수용체 (즉, CD3 복합체를 구성하는 α, β, γ 또는 ζ 폴리펩티드), IL2 수용체 p55 (α 쇄), p75 (β 쇄) 또는 γ 쇄의 서브유닛, Fc 수용체 (예를 들어, Fcγ 수용체 III)의 서브유닛 쇄, 또는 CD 단백질, 예컨대 CD8 알파 쇄일 수 있다. 또 다른 한편으론 막 횡단 도메인은 합성일 수 있고, 주로 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 포함할 수 있다.

[0141] 힌지 영역은 막 횡단 도메인을 세포외 리간드 결합 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 힌지 영역은 300개 이하의 아미노산, 바람직하게 10개 내지 100개의 아미노산, 및 가장 바람직하게 25개 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 자연 발생 분자의 전부 또는 일부, 예컨대 CD8, CD4 또는 CD28의 세포외 영역의 전부 또는 일부, 또는 항체 불변 영역의 전부 또는 일부로부터 유래될 수 있다. 또 다른 한편으론, 힌지 영역은 자연 발생 힌지 서열에 상응하는 합성 서열일 수 있거나, 또는 전체적으로 합성 힌지 서열일 수 있다. 특정한 예에서, 힌지 도메인은 인간 CD8 알파 쇄, FcγRIIIa 수용체 또는 IgG1의 일부를 포함할 수 있다.

[0142] 본원에 사용된 바와 같은, "외인성 T 세포 수용체" 또는 "외인성 TCR"은 TCR을 내인성으로 발현할 수 있거나 또는 발현하지 않을 수 있는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 인간 T 세포)의 게놈 내로 그의 서열이 도입되는 TCR을 지칭한다. 면역 이펙터 세포 상에서의 외인성 TCR의 발현은 특이적 에피토프 또는 항원 (예를 들어, 암 세포 또는 다른 질환 유발 세포 또는 입자의 표면 상에 우선적으로 존재하는 에피토프 또는 항원)에 대한 특이성을 부여할 수 있다. 이러한 외인성 T 세포 수용체는 알파 및 베타 쇄를 포함할 수 있거나, 또는 또 다른 한편으론, 감마 및 델타 쇄를 포함할 수 있다. 본 발명에 유용한 외인성 TCR은 임의의 관심 항원 또는 에피토프에 대한 특이성을 가질 수 있다.

[0143] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "감소된 발현"은 대조군 세포와 비교할 때 유전자 변형된 T 세포의 세포 표면에서 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 발현에 있어서의 임의의 감소를 지칭한다. 용어 감소된은 또한, 대조군 세포의 집단과 비교할 때 세포 표면에서 내인성 폴리펩티드 (즉, 내인성 T 세포 수용체)를 발현하는 세포의 집단 내의 세포의 백분율 상의 감소를 지칭할 수 있다. 이러한 감소는 최대 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 최대 100%일 수 있다. 따라서, 용어 "감소된"은 내인성 T 세포 수용체의 부분 녹다운과 완전한 녹다운 둘 다를 포괄한다. 내인성 T 세포 수용체의 세포 표면 발현의 녹아웃 (즉, 완전한 녹다운)은 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 사용하는 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자의 유전자 불활성화로부터 발생할 수 있다. T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자에 의해 코딩된 알파 불변 도메인은 세포 표면 상에서의 내인성 TCR 복합체의 어셈블리에 필요하다. 따라서, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자를 녹아웃시키는 것은 세포 표면 T 세포 수용체 발현의 녹아웃을 초래한다.

[0144] 아미노산 서열과 핵산 서열 둘 다와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "퍼센트 동일성", "서열 동일성", "백분율 유사성", "서열 유사성" 등은 정렬된 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드 간의 유사성을 최대화하고, 동일하거나 유사한 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 총 잔기 또는 뉴클레오티드의 수, 및 서열 정렬에서 갭의 존재 및 길이의 함수인, 서열의 정렬에 기초한 두 서열의 유사성 정도의 측정 기준을 지칭한다. 표준 파라미터를 사용하여 서열 유사성을 결정하기 위해 다양한 알고리즘과 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 서열 유사성은 아미노산 서열에 대한 BLASTp 프로그램 및 핵산 서열에 대한 BLASTn 프로그램을 사용하여 측정되며, 둘 다 국립 생명 공학 정보 센터 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)을 통해 이용 가능하며, 예를 들어, 문

헌 [Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish and States (1993), Nature Genet. 3:266-272; Madden et al. (1996), Meth. Enzymol.266:131-141; Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402); Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14]에 기재되어 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 두 아미노산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTp 알고리즘에 대한 하기 파라미터에 근거한 점수이다: 단어 크기 = 3; 갭 개방 페널티 = -11; 갭 연장 페널티 = -1; 및 스코어링 매트릭스 = BLOSUM62. 본원에 사용된 바와 같은, 두 핵산 서열의 퍼센트 유사성은 BLASTn 알고리즘에 대한 하기 파라미터에 근거한 점수다: 단어 크기 = 11; 갭 개방 패널티 = -5; 갭 연장 페널티 = -2; 매치 보상 = 1; 미스매치 패널티 = -3.

[0145] 두 단백질 또는 아미노산 서열의 변형과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상응하는 것"은 제1 단백질에서의 명시된 변형이 제2 단백질에서의 변형에서와 동일한 아미노산 잔기의 치환이라는 것과, 두 단백질이 표준 서열 정렬을 받을 때 (예를 들어, BLASTp 프로그램을 사용함) 제1 단백질에서의 변형의 아미노산 위치가 제2 단백질에서의 변형의 아미노산 위치에 상응하거나 또는 그 위치와 정렬된다는 것을 나타내기 위해 사용된다. 따라서, 제1 단백질에서의 잔기 "X"가 아미노산 "A"로 변형되는 것은, X와 Y가 상이한 번호일 수 있다는 사실에도 불구하고 잔기 X와 Y가 서열 정렬에서 서로 상응한다면, 제2 단백질에서의 잔기 "Y"가 아미노산 "A"로 변형되는 것에 상응할 것이다.

[0146] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "인식 절반 부위", "인식 서열 절반 부위" 또는 간단히 "절반 부위"는 동종 이량체성 또는 이종 이량체성 메가뉴클레아제의 단량체에 의해 인식되거나 또는 단일 쇄 메가뉴클레아제의 하나의 서브유닛에 의해 인식되는 이중 가닥 DNA 분자 내의 핵산 서열을 의미한다.

[0147] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "초가변 영역"은 비교적 높은 가변성을 갖는 아미노산을 포함하는 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛 내의 국소성 서열을 지칭한다. 초가변 영역은 약 50 내지 60개의 연속 잔기, 약 53 내지 57개의 연속 잔기, 또는 바람직하게 약 56개의 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역의 잔기는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 24-79 또는 위치 215-270에 상응할 수 있다. 초가변 영역은 인식 서열 내의 DNA 염기와 접촉하는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있으며 단량체 또는 서브유닛의 염기 선호도를 변경하도록 변형될 수 있다. 초가변 영역은 또한 메가뉴클레아제가 이중 가닥 DNA 인식 서열과 연합할 때 DNA 백본에 결합하는 하나 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 잔기는 DNA 백본 및 표적 인식 서열에 대한 메가뉴클레아제의 결합 친화성을 변경하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 상이한 실시양태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내는 1 내지 20개의 잔기를 포함할 수 있고 염기 선호도 및/또는 DNA 결합 친화성에 영향을 미치도록 변형될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 초가변 영역은 가변성을 나타내는 약 15 내지 20개의 잔기를 포함하고 염기 선호도 및/또는 DNA 결합 친화성에 영향을 미치도록 변형될 수 있다.

[0148] 일부 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75, 및 77 중 하나 이상에 상응한다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 7의 위치 48, 50, 71, 72, 및 73 중 하나 이상에 추가로 상응한다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 8의 위치 48 및 50 중 하나 이상에 추가로 상응한다. 일부 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 68, 70, 71, 72, 73, 75, 및 77 중 하나 이상에 상응한다.

[0149] 다른 실시양태에서, 초가변 영역 내의 가변 잔기는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266, 및 268 중 하나 이상에 상응한다.

[0150] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "T 세포 수용체 알파 유전자" 또는 "TCR 알파 유전자"는 상호 교환 가능하며, T 세포 수용체 알파 서브유닛을 코딩하는 T 세포 내의 유전자 자리를 지칭한다. T 세포 수용체 알파는 재배열되기 전 또는 후, NCBI 유전자 ID 번호 6955를 지칭할 수 있다. 재배열 후, T 세포 수용체 알파 유전자는 내인성 프로모터, 재배열된 V 및 J 세그먼트, 내인성 스플라이스 공여자 부위, 인트론, 내인성 스플라이스 수용체 부위, 및 서브유닛 코딩 엑손을 포함하는 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 자리를 포함한다.

[0151] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "T 세포 수용체 알파 불변 영역" 또는 "TCR 알파 불변 영역"은 T 세포 수용체 알파 유전자의 코딩 서열을 지칭한다. TCR 알파 불변 영역은 NCBI 유전자 ID 번호 28755로써 확인된 야생형 서열 및 그의 기능적 변이체를 포함한다.

[0152] 용어 "재조합 DNA 구축물", "재조합 구축물", "발현 카세트", "발현 구축물", "키메라 구축물", "구축물" 및 "재조합 DNA 단편"은 본원에서 상호 교환 가능하게 사용되며 단일 또는 이중 가닥 폴리뉴클레오티드이다. 재조합 구축물은 자연에서 함께 발견되지 않는 조절 및 코딩 서열을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 핵산 단편의

인공 조합을 포함한다. 예를 들어, 재조합 DNA 구축물은 상이한 공급원으로부터 유래되는 조절 서열 및 코딩 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되고 자연에서 발견되는 것과 상이한 방식으로 배열된 조절 서열 및 코딩 서열을 포함할 수 있다. 이러한 구축물은 단독으로 사용될 수 있거나 또는 벡터와 연계해서 사용될 수 있다.

[0153] 본원에 사용된 바와 같은, "벡터" 또는 "재조합 DNA 벡터"는 주어진 숙주 세포에서 폴리펩티드 코딩 서열의 전사 및 번역이 가능한 서열 및 복제 시스템을 포함하는 구축물일 수 있다. 벡터가 사용되는 경우, 벡터의 선택은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 바와 같이 숙주 세포를 형질전환시키는 데 사용될 방법에 따라 달라진다. 벡터는 플라스미드 벡터 및 재조합 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV 벡터), 또는 본 발명의 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자를 표적 세포에 전달하기에 적합한 관련 기술 분야에 공지된 임의의 다른 벡터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 통상의 기술자는 본 발명의 단리된 뉴클레오티드 또는 핵산 서열 중 임의의 것을 포함하는 숙주 세포를 성공적으로 형질전환, 선택 및 증식하기 위해 벡터 상에 존재해야만 하는 유전자 요소를 잘 알고 있다.

[0154] 본원에 사용된 바와 같은, "벡터"는 또한 바이러스 벡터를 지칭할 수 있다. 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 아데노 연관 바이러스 벡터 (AAV)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0155] 본원에 사용된 바와 같은, "폴리시스트론성" mRNA는 2개 이상의 코딩 서열 (즉, 시스트론)을 포함하고 2개 이상의 단백질을 코딩하는 단일 메신저 RNA를 지칭한다. 폴리시스트론성 mRNA는 IRES 요소, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소, 및 F2A 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 동일한 mRNA 분자로부터의 둘 이상의 유전자의 번역을 허용하는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다.

[0156] 본원에 사용된 바와 같은, "인간 T 세포" 또는 "T 세포"는 공여자, 특히 인간 공여자로부터 단리된 T 세포를 지칭한다. T 세포 및 그로부터 유래된 세포는 배양물 중의 계대되지 않은 단리된 T 세포, 불멸화없이 세포 배양 조건 하에서 계대 및 유지된 T 세포, 및 불멸화되어 세포 배양 조건 하에서 무기한 유지될 수 있는 T 세포를 포함한다.

[0157] 본원에 사용된 바와 같은, "대조군" 또는 "대조군 세포"는 유전자 변형된 세포의 유전자형 또는 표현형에 있어서의 변화를 측정하기 위한 기준점을 제공하는 세포를 지칭한다. 대조군 세포는, 예를 들어, 하기를 포함할 수 있다: (a) 야생형 세포, 즉 유전자 변형된 세포를 초래한 유전자 변경을 위한 출발 물질과 동일한 유전자형의 세포; (b) 유전자 변형된 세포와 동일한 유전자형을 갖지만 아무 가치없는 구축물 (즉, 관심 형질에 대한 공지된 효과가 없는 구축물)로 형질전환된 세포; 또는 (c) 유전자 변형된 세포와 유전적으로 동일하지만, 변경된 유전자형 또는 표현형의 발현을 유도하는 조건 또는 자극 또는 추가의 유전자 변형에 노출되지 않은 세포.

[0158] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "치료" 또는 "대상체를 치료하는 것"은 본 발명의 유전자 변형된 T 세포 또는 유전자 변형된 T 세포의 집단을, 질환이 있는 대상체에게 투여하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 대상체는 암과 같은 질환을 가질 수 있고, 치료는 이러한 질환의 치료를 위한 면역요법을 나타낼 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질환의 발생 또는 재발을 방지하는 것, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 감소, 질환 진행 속도를 감소시키는 것, 질환 상태의 완화 또는 일시적 완화, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 유전자 변형된 진핵 세포 또는 유전자 변형된 진핵 세포의 집단은 본 발명의 제약 조성물의 형태로 치료 동안 투여된다.

[0159] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 유익하거나 바람직한 생물학적 및/또는 임상적 결과를 달성하기에 충분한 양을 지칭한다. 치료 유효량은 사용된 제형 또는 조성물, 질환 및 그의 중증도, 및 치료할 대상체의 연령, 체중, 신체 상태 및 반응성에 따라 달라질 것이다. 구체적 실시양태에서, 본 발명의 유전자 변형된 T 세포 또는 유전자 변형된 T 세포의 집단, 또는 본원에 개시된 제약 조성물의 유효량은 대상체에서 질환의 적어도 한 가지 증상을 감소시킨다. 질환이 암인 실시양태에서, 본원에 개시된 조작된 메가뉴클레아제 또는 제약 조성물의 유효량은 암의 증식 또는 전이 수준을 감소시키거나, 암의 부분적 또는 전체 반응 또는 차도를 유발하거나, 또는 대상체에서 암의 적어도 한 가지 증상을 감소시킨다.

[0160] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "암"은 악성 성장 또는 종양을 유발하는 비정상적이고 비제어된 세포 분열을 특징으로 하는 임의의 신생물성 질환 (침습성인지 아니면 전이성인지의 여부에 관계없음)을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다.

[0161] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "암종"은 상피 세포로 구성된 악성 성장을 지칭한다.

[0162] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "백혈병"은 조혈 기관/시스템의 악성 종양을 지칭하며, 일반적으로 혈액 및 골수에서 백혈구 및 그의 전구체의 비정상적인 증식 및 발생을 특징으로 한다.

[0163] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "육종"은 배아 결합 조직과 같은 물질로 구성되고 일반적으로 섬유성, 이질적 또는 동질적 물질에 포매된 밀집하게 패킹된 세포로 구성되는 종양을 지칭한다.

[0164] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "흑색종"은 피부 및 다른 기관의 멜라닌 세포 체계로부터 발생하는 종양을 지칭한다.

[0165] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "림프종"은 림프구로부터 발생하는 혈액 세포 종양 군을 지칭한다.

[0166] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "모세포종"은 전구체 세포 또는 모세포 (미성숙 또는 배아 조직) 내의 악성 종양에 의해 유발되는 암의 유형을 지칭한다.

[0167] 본원에 사용된 바와 같은, 변수에 대한 수치 범위의 나열은 본 발명이 그 범위 내의 값 중 임의의 것과 동일한 변수로 실시될 수 있음을 전달하기 위한 것이다. 따라서, 본질적으로 불연속적인 변수의 경우, 이러한 변수는 범위의 종말점을 포함하여 수치 범위 내의 임의의 정수 값과 동일할 수 있다. 유사하게, 본질적으로 연속적인 변수의 경우, 이러한 변수는 범위의 종말점을 포함하여 수치 범위 내의 임의의 실제 값과 동일할 수 있다. 예를 들어, 제한없이, 0 내지 2의 값을 갖는 것으로 기재되는 변수는, 이러한 변수가 본질적으로 불연속적인 경우 0, 1 또는 2의 값을 취할 수 있고, 변수가 본질적으로 연속적인 경우 0.0, 0.1, 0.01, 0.001의 값, 또는 ≥0 및 ≤2의 임의의 다른 실제 값을 취할 수 있다.

[0168] 2.1 본 발명의 원리

[0169] 본 발명은 부분적으로, 모 제1 세대 메가뉴클레아제와 비교해서 개선된 특성, 예컨대 개선된 (즉, 증가된) 특이성 및 감소된 오프 타겟 커팅, mRNA로부터의 발현 후 세포에서의 감소된 지속 시간, 인간 T 세포와 함께 시험관 내에서 사용될 때 개선된 세포 특징, 및 본격적인 CAR T 세포 제조 프로세스에 사용될 때 개선된 세포 특징을 갖는 최적화된 제2 세대 메가뉴클레아제의 발견에 근거한다.

[0170] 앞서 기재된 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제와 같이, 이들 최적화된, 제2 세대 메가뉴클레아제는 TCR 알파 불변 영역 유전자의 엑손 1 내의 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식한다. 이러한 인식 서열에서의 절단은 절단 부위에서의 NHEJ를 허용할 수 있고, 인간 T 세포 수용체 알파 쇄 서브유닛의 발현을 붕괴시켜, 세포 표면에서의 T 세포 수용체의 발현 및/또는 기능 감소를 초래할 수 있다. 부가적으로, 이러한 인식 서열에서의 절단은 TCR 알파 불변 영역 유전자 내로의 외인성 핵산 서열의 직접적인 상동 재조합을 추가로 허용할 수 있다. 이러한 외인성 핵산 서열은 관심 서열, 예컨대 키메라 항원 수용체를 코딩하는 서열, 외인성 TCR 수용체, 또는 임의의 다른 관심 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에 의해 개시된 조성물 및 방법은 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)의 녹아웃과 외인성 핵산 서열 (예를 들어, 키메라 항원 수용체 또는 외인성 TCR)의 발현 둘 다를 허용한다. 이러한 세포는 동종 이계 대상체에게 투여될 때 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)을 유발시키지 않거나 또는 그의 유발을 감소시킬 수 있다.

[0171] 2.2 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 내의 TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 최적화된 메가뉴클레아제

[0172] 부위 특이적 뉴클레아제를 사용하여 살아있는 세포의 게놈 내에서 DNA를 파괴하는 것이 가능하다는 것과, 그러한 DNA 파괴가 게놈 내에서 동일하거나 고도로 상동인 DNA 서열과 상기 절단된 표적 부위의 상동 재조합을 통해 게놈의 영구적인 변형을 초래할 수 있다는 것이 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 조작된 재조합 메가뉴클레아제를 사용하여 실시될 수 있다.

[0173] 특정한 실시양태에서, 본 발명을 실시하기 위해 사용된 뉴클레아제는 단일 쇄 메가뉴클레아제이다. 단일 쇄 메가뉴클레아제는 링커 펩티드에 의해 연결된 N-말단 서브유닛 및 C-말단 서브유닛을 포함한다. 두 도메인 각각은 인식 서열의 절반 (즉, 인식 절반 부위)을 인식하고, DNA 절단 부위는 두 서브유닛의 경계면 근처에 있는 인식 서열의 중간에 있다. DNA 가닥 파괴는 메가뉴클레아제에 의한 DNA 절단이 한 쌍의 4개 염기쌍, 3' 단일 가닥 오버행을 생성하도록 4개의 염기쌍으로 상쇄된다.

[0174] 본 발명의 재조합 메가뉴클레아제는 TCR 알파 불변 영역 유전자 (서열식별번호: 3)의 엑손 내의 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식하고 이를 절단하도록 조작되었다. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 제1 초가변 (HVR1) 영역을 포함하는 제1 서브유닛, 및 제2 초가변 (HVR2) 영역을 포함하는 제2 서브유닛을 포함한다. 추가로, 제1 서브유닛은 인식 서열 내의 제1 인식 절반 부위 (즉, TRC1 절반 부위)에 결합하고, 제2 서브유닛은

인식 서열 내의 제2 인식 절반 부위 (즉, TRC2 절반 부위)에 결합한다. 재조합 메가뉴클레아제가 단일 쇄 메가뉴클레아제인 실시양태에서, HVR1 영역을 포함하고 제1 절반 부위에 결합하는 제1 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 위치 설정되고, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반 부위에 결합하는 제2 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 위치 설정되도록 제1 및 제2 서브유닛이 배향될 수 있다. 대체 실시양태에서, HVR1 영역을 포함하고 제1 절반 부위에 결합하는 제1 서브유닛이 C-말단 서브유닛으로서 위치 설정되고, HVR2 영역을 포함하고 제2 절반 부위에 결합하는 제2 서브유닛이 N-말단 서브유닛으로서 위치 설정되도록 제1 및 제2 서브유닛이 배향될 수 있다. TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 예시적인 조작된 메가뉴클레아제가 표 1에 제공된다.

[0175] <표 1>

[0176] TCR 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식하고 이를 절단하는 예시적인 조작된 메가뉴클레아제.

[0177]

메가뉴클레아제	AA SEQ ID	TRC1 서브유닛 잔기	TRC1 서브유닛 SEQ ID	HVR1 잔기	*HVR1 %	TRC2 서브유닛 잔기	TRC2 서브유닛 SEQ ID	HVR2 잔기	*HVR2 %
TRC 1-2L.1592	7	198-344	10	215-270	96.4	7-153	13	24-79	80.3
TRC 1-2L.1775	8	198-344	11	215-270	100	7-153	14	24-79	85.7
TRC 1-2x.87EE	9	198-344	12	215-270	100	7-153	15	24-79	100

[0178] *"HVR1 %" 및 "HVR2 %"는 각각의 메가뉴클레아제의 HVR1 및 HVR2 영역 각각과 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제의 HVR1 및 HVR2 영역 각각 간의 아미노산 서열 동일성을 나타낸다.

[0179] 일부 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 제1 세대 메가뉴클레아제 TRC 1-2x.87EE와 비교해서 적어도 하나의 최적화된 특징을 나타낸다. 이러한 최적화된 특징은 오프 타겟 커팅 감소를 초래하는 개선된 (즉, 증가된) 특이성, mRNA로부터의 발현 후 세포에서의 감소된 지속 시간, 및 TCR 알파 불변 영역 유전자의 절단 및 변형의 증강된 (즉, 증가된) 효율을 포함한다. 따라서, 특정한 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제가 진핵 세포의 집단으로 전달될 때, 이는 TCR 알파 불변 영역 유전자에서의 절단 및/또는 변형을 갖는 세포를 더 큰 백분율로 생성할 수 있다. 이들 실시양태 중 일부에서, 진핵 세포의 집단은 TCR 알파 불변 영역 유전자에서의 절단 및/또는 삽입/결실 ("삽입-결실")을 포함하는 진핵 세포를 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과로 포함한다. 메가뉴클레아제에 의한 TCR 알파 불변 영역 유전자의 절단 및/또는 변형은 T7 엔도뉴클레아제 I 검정, 디지털 PCR, 미스매치 검출 검정, 미스매치 절단 검정, 고 분해능 용융 분석 (HRMA), 이종 이중체 이동성 검정, 시퀀싱, 및 형광 PCR 모세관 겔 전기 영동을 포함하여, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Zischewski et al. (2017) Biotechnology Advances 35(1):95-104] 참조; 이는 그 전체 내용이 참조로 포함된다).

[0180] 특정 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는, 특히 mRNA로서 도입될 때, 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제와 비교 시 세포에서의 감소된 지속 시간을 나타낸다. 세포 내의 mRNA 또는 단백질의 지속성은 RT-PCR, 노던 블롯 분석, 뉴클레아제 보호 검정, 계내 혼성화, 면역 세포 화학, 면역 블롯팅 및 면역 침전을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0181] 2.3 최적화된 메가뉴클레아제를 전달하고 발현하는 방법

[0182] 본 발명은 인간 TCR 알파 불변 영역 유전자 (서열식별번호: 3) 내에서 발견되는 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 조작된 메가뉴클레아제를 사용하여 유전자 변형된 T 세포 및 그의 집단을 생산하는 방법을 제공한다. T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직 및 종양을 포함하는 수많은 공급원으로부터 수득될 수 있다. 본 개시 내용의 특정 실시양태에서, 관련 기술 분야에서 이용 가능한 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, T 세포는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 수득된다. 한 실시양태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 성분채집술에 의해 수득된다.

[0183] 변형된 T 세포 수용체 알파 유전자는 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제에 의한 이중 가닥 절단을 통해 TCR 알파 불변 영역 유전자의 제1 엑손 (즉, 표적화된 엑손) 내로 삽입된 관심 외인성 서열을 포함한다. 이러한 메가뉴클레아제에 의해 생성된 절단 부위는 상기 표적화된 엑손으로 관심 외인성 서열을 직접적으로 상동 재

조합하는 것을 허용할 수 있다.

[0184] 본원에 사용된 바와 같은, 뉴클레오티드 서열과 관련하여 용어 "외인성" 또는 "이종"은 순전히 합성이고, 외래 종으로부터 유래되거나, 또는 동일한 종으로부터 유래되는 경우, 의도적인 인간 개입에 의해 조성 및/또는 게놈 유전자 자리에 있어서 그의 천연 형태로부터 실질적으로 변형되는 서열을 의미하는 것으로 의도된다.

[0185] 다양한 실시양태에서, 관심 외인성 서열은 관심 단백질에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있다. 코딩 서열은 임의의 관심 단백질에 대한 것일 수 있다고 생각된다.

[0186] 특정 실시양태에서, 관심 외인성 서열은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일반적으로, 본 개시 내용의 CAR은 적어도 세포외 도메인 및 세포내 도메인을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 달리 리간드 결합 도메인 또는 모이어티로서 지칭되는 표적 특이적 결합 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인 또는 세포질 도메인은 적어도 하나의 공동 자극 도메인 및 하나 이상의 시그널링 도메인, 예컨대 예를 들어, CD3ζ을 포함한다.

[0187] 일부 실시양태에서, 본 발명에 유용한 CAR은 달리 리간드 결합 도메인 또는 모이어티로서 지칭되는 세포외 표적 특이적 결합 요소를 포함한다. 리간드 결합 도메인의 선택은 표적 세포의 표면을 규정하는 리간드의 유형과 수에 좌우된다. 예를 들어, 리간드 결합 도메인은 특정한 질환 상태와 연관된 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, CAR에서 리간드 결합 도메인에 대한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가 면역 질환 및 암 세포와 연관된 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 종양 세포 상의 항원과 특이적으로 결합하는 원하는 리간드 결합 모이어티를 조작함으로써 관심 종양 특이적 항원을 표적으로 하도록 조작된다. 본 개시 내용의 맥락에서, "종양 항원" 또는 "종양 특이적 항원"은 특이적 과다 증식성 장애, 예컨대 암에 공통인 항원을 지칭한다.

[0188] 일부 실시양태에서, CAR의 세포외 리간드 결합 도메인은 임의의 관심 항원 또는 에피토프, 특히 임의의 관심 종양 항원 또는 에피토프에 특이적이다. 비-제한적인 예로서, 일부 실시양태에서 표적의 항원은 종양 관련 표면 항원, 예컨대 ErbB2 (HER2/neu), 암 배아 항원 (CEA), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), EGFR 변이체 III (EGFRvIII), CD19, CD20, CD22, CD30, CD40, CLL-1, 디시알로강글리오시드 GD2, 관상피 점액, gp36, TAG-72, 글리코스핑고리피드, 신경 교종 관련 항원, B-인간 융모성 성선 자극 호르몬, 알파태아 단백질 (AFP), 렉틴 반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사 효소, RU1, RU2 (AS), 장 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타제, 프로스타제 특이적 항원 (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, 프로스테인, PSMA, 서비빈 및 텔로머라제, 전립선 암종 종양 항원-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린 B2, 인슐린 성장 인자 (IGF)-1, IGF-II, IGFI 수용체, 메소텔린, 종양 특이적 폐티드 에피토프를 제시하는 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, 종양 기질 항원, 피브로넥틴의 여분의 도메인 A (EDA) 및 여분의 도메인 B (EDB) 및 테나신-C의 A1 도메인 (TnC A1) 및 섬유모세포 관련 단백질 (fap); 계통 특이적 또는 조직 특이적 항원, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD38, CD123, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), 엔도글린, 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자, BCMA (CD269, TNFRSF 17), CS1, 또는 바이러스 특이적 표면 항원, 예컨대 HIV 특이적 항원 (예컨대 HIV gp120); EBV 특이적 항원, CMV 특이적 항원, HPV 특이적 항원, 예컨대 E6 또는 E7 종양 단백질, 라사 바이러스 특이적 항원, 인플루엔자 바이러스 특이적 항원뿐만 아니라 이들 표면 마커의 임의의 유도체 또는 변이체이다. 본 개시 내용의 특정한 실시양태에서, 리간드 결합 도메인은 CD19에 특이적이다.

[0189] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 세포외 도메인은 B 림프구 상의 자가 항원 특이적 B 세포 수용체에 의해 인식될 수 있으므로, T 세포가 항체 매개된 자가 면역 질환에서 자가 반응성 B 림프구를 특이적으로 표적화하고 사멸하도록 지시하는 자가 항원 (문헌 [Payne et al. (2016) Science, Vol. 353 (6295): 179-184] 참조)을 추가로 포함한다. 이러한 CAR은 키메라 자가 항체 수용체 (CAAR)로서 지칭될 수 있다.

[0190] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 세포외 도메인은 관심 항원에 대한 자연 발생 리간드, 또는 관심 항원에 결합할 수 있는 능력을 보유하는 자연 발생 리간드의 단편을 포함할 수 있다.

[0191] 일부 실시양태에서, CAR은 힌지 또는 스페이서 서열을 통해 세포외 리간드 결합 도메인 또는 자가 항원을 세포내 시그널링 및 공동 자극 도메인과 연결하는 막 횡단 도메인을 포함한다. 막 횡단 도메인은 임의의 막 결합된 또는 막 횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 막 횡단 폴리펩티드는 T-세포 수용체 (즉, CD3 복합체를 구성하는 α, β, γ 또는 ζ 폴리펩티드), IL2 수용체 p55 (α 쇄), p75 (β 쇄) 또는 γ 쇄의 서브유닛, Fc 수용체 (예를 들어, Fcγ 수용체 III)의 서브유닛 쇄, 또는 CD 단백질, 예컨대 CD8 알파 쇄일 수 있다. 또

다른 한편으론 막 횡단 도메인은 합성일 수 있고, 주로 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 포함할 수 있다. 특정한 예에서, 막 횡단 도메인은 CD8α 막 횡단 폴리펩티드이다.

[0192] 힌지 영역은 막 횡단 도메인을 세포외 리간드 결합 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 힌지 영역은 300개 이하의 아미노산, 바람직하게 10개 내지 100개의 아미노산, 및 가장 바람직하게 25개 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 자연 발생 분자의 전부 또는 일부, 예컨대 CD8, CD4 또는 CD28의 세포외 영역의 전부 또는 일부, 또는 항체 불변 영역의 전부 또는 일부로부터 유래될 수 있다. 또 다른 한편으론, 힌지 영역은 자연 발생 힌지 서열에 상응하는 합성 서열일 수 있거나, 또는 전체적으로 합성 힌지 서열일 수 있다. 특정한 예에서, 힌지 도메인은 인간 CD8 알파 쇄, FcγRIIIa 수용체 또는 IgG1의 일부를 포함할 수 있다.

[0193] CAR의 세포내 시그널링 도메인은 CAR이 배치된 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화 및/또는 증식 및 세포 생존 경로의 활성화를 담당한다. 용어 "이펙터 기능"은 세포의 전문화된 기능을 지칭한다. 예를 들어, T 세포의 이펙터 기능은 세포 용해 활성, 또는 시토카인 분비를 포함하는 헬퍼 활성일 수 있다. 세포내 시그널링 도메인, 예컨대 CD3ζ은 세포외 도메인의 결합에 반응하여 활성화 시그널을 세포에 제공할 수 있다. 논의된 바와 같이, 활성화 시그널은 세포의 이펙터 기능, 예컨대 예를 들어, 세포 용해 활성 또는 시토카인 분비를 유도할 수 있다.

[0194] CAR의 세포내 도메인은 세포외 도메인의 결합 후 세포 증식, 세포 생존 및/또는 시토카인 분비를 촉진하기 위해 공동 자극 시그널을 전달하는 하나 이상의 세포내 공동 자극 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 세포내 공동 자극 도메인은 관련 기술 분야에 공지된 것, 예컨대 N1, N6, CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0195] CAR은 임의의 유형의 암 세포에 특이적일 수 있다. 이러한 암은 암종, 림프종, 육종, 모세포종, 백혈병, B 세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경모세포종, 골육종, 폐암, 흑색종, 전립선암, 결장암, 신장 세포 암종, 난소암, 횡문근 육종, 백혈병, 및 호지킨 림프종을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, B 세포 기원의 암은 B 계통 급성 림프모구성 백혈병, B 세포 만성 림프구성 백혈병, B 세포 비호지킨 림프종, 및 다발성 골수종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0196] 관심 서열은 외인성 T 세포 수용체 (TCR)를 추가로 코딩할 수 있다. 이러한 외인성 T 세포 수용체는 알파 및 베타 쇄를 포함할 수 있거나, 또는 또 다른 한편으론, 감마 및 델타 쇄를 포함할 수 있다. 본 발명에 유용한 외인성 TCR은 임의의 관심 항원 또는 에피토프에 대한 특이성을 가질 수 있다.

[0197] 다른 실시양태에서, 관심 서열은 야생형 또는 변형된 버전의 관심 내인성 유전자를 코딩할 수 있다.

[0198] 관심 서열은 IRES 요소 및 2A 요소, 예컨대, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소, 및 F2A 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 동일한 프로모터로부터의 2개 이상의 유전자의 번역을 허용하도록 관련 기술 분야에 공지된 요소 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 관심 외인성 서열에서의 이러한 요소는 관심 단백질 (예를 들어, CAR)을 코딩하는 핵산 서열의 5' 상류 또는 3' 하류에 위치할 수 있다.

[0199] 본원에 기재된 관심 외인성 서열은 부가의 제어 서열을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 관심 서열은 상동 재조합 인핸서 서열, 코작(Kozak) 서열, 폴리아데닐화 서열, 전사 종결 서열, 선별성 마커 서열 (예를 들어, 항생제 내성 유전자), 복제 기점 등을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 관심 서열은 또한 적어도 하나의 핵 국재화 시그널을 포함할 수 있다. 핵 국재화 시그널의 예는 관련 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Lange et al., J. Biol. Chem., 2007, 282:5101-5105] 참조).

[0200] 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 단백질 형태로, 또는 바람직하게, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산으로서 세포로 전달될 수 있다. 이러한 핵산은 DNA (예를 들어, 원형 또는 선형화된 플라스미드 DNA 또는 PCR 산물) 또는 RNA (예를 들어, mRNA)일 수 있다. 조작된 메가뉴클레아제 코딩 서열이 DNA 형태로 전달되는 실시양태의 경우, 메가뉴클레아제 유전자의 전사를 용이하게 하기 위해 프로모터에 작동가능하게 연결되어야 한다. 본 발명에 적합한 포유동물 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대 시토메갈로바이러스 조기 (CMV) 프로모터 (문헌 [Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81(3):659-63]) 또는 SV40 조기 프로모터 (문헌 [Benoist and Chambon (1981), Nature. 290(5804):304-10]) 뿐만 아니라 유도성 프로모터, 예컨대 테트라사이클린 유도성 프로모터 (문헌 [Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12(9):4038-45])를 포함한다. 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 또한 합성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 합성 프로모터는 JeT 프로

모터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다 (WO 2002/012514).

[0201] 일부 실시양태에서, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자가 세포의 게놈에 통합될 가능성을 감소시키기 때문에, 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA는 세포로 전달된다. 이러한 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA는 관련 기술 분야에 공지된 방법, 예컨대 시험관내 전사를 사용하여 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 7-메틸-구아노신, 항-역 cap 유사체 (ARCA) (US 7,074,596), 클린캡(CleanCap®) 유사체, 예컨대 Cap 1 유사체 [트릴링크 (Trilink; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)]를 사용하여 5' 캡핑되거나 또는 백시니아 캡핑 효소 또는 이와 유사한 것을 사용하여 효소적으로 캡핑된다. 일부 실시양태에서, 상기 mRNA는 폴리아데닐화될 수 있다. mRNA는 코딩된 조작된 메가뉴클레아제의 발현 및/또는 mRNA 자체의 안정성을 증강시키기 위해 다양한 5' 및 3' 비번역 서열 요소를 함유할 수 있다. 이러한 요소는, 예를 들어, 번역 후 조절 요소, 예컨대 우드척 간염 바이러스 번역 후 조절 요소를 포함할 수 있다. mRNA는 뉴클레오시드 유사체 또는 자연 발생 뉴클레오시드, 예컨대 슈도우리딘, 5-메틸시티딘, N6-메틸아데노신, 5-메틸우리딘, 또는 2-티오우리딘을 함유할 수 있다. 부가의 뉴클레오시드 유사체는, 예를 들어, US 8,278,036에 기재된 것을 포함한다.

[0202] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 mRNA는 세포에서 동시에 발현되는 2개 이상의 메가뉴클레아제를 코딩하는 폴리시스트론성 mRNA일 수 있다. 폴리시스트론성 mRNA는 동일한 표적 유전자 내의 상이한 인식 서열을 표적으로 하는 2개 이상의 메가뉴클레아제를 코딩할 수 있다. 또 다른 한편으론, 폴리시스트론성 mRNA는 본원에 기재된 적어도 하나의 메가뉴클레아제 및 동일한 유전자에 위치하는 별도의 인식 서열을 표적화하거나, 또는 절단 부위가 두 유전자 모두에서 생산되도록 제2 유전자에 위치하는 제2 인식 서열을 표적화하는 적어도 하나의 부가의 뉴클레아제를 코딩할 수 있다. 폴리시스트론성 mRNA는 IRES 요소, T2A 요소, P2A 요소, E2A 요소, 및 F2A 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 동일한 mRNA 분자로부터 2개 이상의 유전자 (즉, 시스트론)의 번역을 허용하는 관련 기술 분야에 공지된 임의의 요소를 포함할 수 있다.

[0203] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 단일 가닥 DNA 주형을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 단일 가닥 DNA는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 서열의 상류 및/또는 하류에 5' 및/또는 3' AAV 역위 말단 반복부 (ITR)를 추가로 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 단일 가닥 DNA는 조작된 메가뉴클레아제를 코딩하는 서열의 상류 및/또는 하류에 5' 및/또는 3' 상동성 아암을 추가로 포함할 수 있다.

[0204] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자는 선형화된 DNA 주형을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 예에서, 메가뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA는 원형 플라스미드 DNA가 세포 내로 도입되기 전에 선형화되도록 하나 이상의 제한 효소에 의해 소화될 수 있다.

[0205] 정제된 메가뉴클레아제 단백질은 게놈 DNA를 절단하기 위해 세포 내로 전달될 수 있으며, 이는 하기 본원에 추가로 상세된 것을 포함하여 관련 기술 분야에 공지된 다양한 상이한 메커니즘에 의해, 관심 서열과 절단 부위에서 상동 재조합 또는 비-상동 말단 연결을 허용한다.

[0206] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 세포 침투 펩티드 또는 표적화 리간드와 커플링되어 세포 흡수를 용이하게 한다. 관련 기술 분야에 공지된 세포 침투 펩티드의 예는 폴리-아르기닌 (문헌 [Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) Mol Ther. 16:1624-9]), HIV 바이러스로부터의 TAT 펩티드 (문헌 [Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736]), MPG (문헌 [Simeoni, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2717-2724]), Pep-1 (문헌 [Deshayes et al. (2004) Biochemistry 43: 7698-7706]), 및 HSV-1 VP-22 (문헌 [Deshayes et al. (2005) Cell Mol Life Sci. 62:1839-49])을 포함한다. 대체 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 메가뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA가 표적 세포에 결합하고 이에 의해 내재화되도록 표적 세포 상에 발현되는 특이적 세포-표면 수용체를 인식하는 항체와 공유적으로 또는 비공유적으로 커플링된다. 또 다른 한편으론, 메가뉴클레아제 단백질/DNA/mRNA는 이러한 세포-표면 수용체에 대한 자연 리간드 (또는 자연 리간드의 일부분)와 공유적으로 또는 비공유적으로 커플링될 수 있다 (McCall, et al. (2014) Tissue Barriers. 2(4):e944449; Dinda, et al. (2013) Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74; Kang, et al. (2014) Curr Pharm Biotechnol. 15(3):220-30; Qian et al. (2014) Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10(11):1491-508).

[0207] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 관련 기술 분야에 공지된 방법을 사용하여 나노 입자와 공유적으로 또는 비공유적으로 커플링되거나 또는 이러한 나노 입자 내에 캡슐화된다 (Sharma, et al. (2014) Biomed Res Int. 2014). 나노 입자는 길이 스케일이 <1 □m, 바람직하게 <100 nm인 나노 스케일 전달 시스템이다. 이러한 나노 입자는 금속, 지질, 중합체 또는 생물학적 거대 분자로

구성된 코어를 사용하여 설계될 수 있으며, 재조합 메가뉴클레아제 단백질, mRNA 또는 DNA의 다수의 카피가 나노 입자 코어에 부착되거나 또는 나노 입자 코어로 캡슐화될 수 있다. 이것은 각각의 세포에 전달되는 단백질/mRNA/DNA의 카피 수를 증가시키고, 따라서 표적 인식 서열이 커팅될 가능성을 최대화하기 위해 각각의 조작된 메가뉴클레아제의 세포내 발현을 증가시킨다. 이러한 나노 입자의 표면은 중합체 또는 지질 (예를 들어, 키토산, 양이온성 중합체 또는 양이온성 지질)로 추가로 변형되어, 그의 표면이 세포 전달 및 페이로드의 흡수를 증강시키는 부가의 기능성을 부여하는 코어-쉘 나노 입자를 형성할 수 있다 (Jian et al. (2012) Biomaterials. 33(30): 7621-30). 나노 입자는 부가적으로, 표적화 분자와 유리하게 커플링되어, 나노 입자를 적절한 세포 유형으로 유도하고/하거나 세포 흡수의 가능성을 증가시킬 수 있다. 이러한 표적화 분자의 예는 세포 표면 수용체에 특이적인 항체 및 세포 표면 수용체에 대한 자연 리간드 (또는 자연 리간드의 일부분)를 포함한다.

[0208] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 리포솜 내에 캡슐화되거나 또는 양이온성 지질을 사용하여 복합체 형성된다 (예를 들어, 리포펙타민(Lipofectamine™), 라이프 테크놀로지스 코포레이션 (Life Technologies Corp.; 미국 캘리포니아주 칼즈배드); 문헌 [Zuris et al. (2015) Nat Biotechnol. 33: 73-80; Mishra et al. (2011) J Drug Deliv. 2011:863734] 참조). 리포솜 및 리포플렉스 제형은 페이로드를 분해로부터 보호할 수 있고 표적 세포의 세포막과의 융합 및/또는 이러한 세포막의 붕괴를 통해 세포 흡수 및 전달 효율을 용이하게 할 수 있다.

[0209] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 중합체성 스캐폴드 (예를 들어, PLGA) 내에 캡슐화되거나 또는 양이온성 중합체 (예를 들어, PEI, PLL)를 사용하여 복합체 형성된다 (Tamboli et al. (2011) Ther Deliv. 2(4): 523-536). 중합체성 담체는 중합체 침식 및 약물 확산의 제어를 통해 조정 가능한 약물 방출 속도를 제공하도록 설계될 수 있으며, 높은 약물 캡슐화 효율은 원하는 표적 세포 집단으로 세포내 전달될 때까지 치료용 페이로드를 보호할 수 있다.

[0210] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 재조합 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 미셀로 자기 어셈블리되는 양친매성 분자와 조합된다 (Tong et al. (2007) J Gene Med. 9(11): 956-66). 중합체성 미셀은 응집을 방지하고, 전하 상호 작용을 은폐하며, 비특이적 상호 작용을 감소시킬 수 있는 친수성 중합체 (예를 들어, 폴리에틸렌글리콜)로 형성된 미셀 쉘을 포함할 수 있다.

[0211] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 표적 세포로의 투여 및/또는 전달을 위해 에멀션 또는 나노 에멀션 (즉, < 1 nm의 평균 입자 직경을 갖는다)으로 제형화된다. 용어 "에멀션"은 수 불혼화성 상이 수성 상과 혼합될 때 물을 향하는 극성 헤드 기 및 물로부터 멀어지는 비극성 잔기 (예를 들어, 긴 탄화수소 쇄)를 구동시키는 소수성 힘의 결과로서 형성될 수 있는 지질 구조를 포함한, 임의의 수중유, 유중수, 수중 유중수, 또는 유중 수중유 분산액 또는 비말을 지칭하고, 이에 제한되지 않는다. 이들 다른 지질 구조는 단층, 작은층 및 다층 지질 소포, 미셀 및 층 상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 에멀션은 수성 상과 친유성 상 (전형적으로 오일 및 유기 용매를 함유함)으로 구성된다. 에멀션은 또한 종종, 하나 이상의 계면 활성제를 함유한다. 나노 에멀션 제형은, 예를 들어, 미국 특허 출원 번호 2002/0045667 및 2004/0043041, 및 미국 특허 번호 6,015,832, 6,506,803, 6,635,676, 및 6,559,189 (이들 각각은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 바와 같이, 널리 공지되어 있다.

[0212] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제 단백질, 또는 메가뉴클레아제를 코딩하는 DNA/mRNA는 다작용성 중합체 접합체, DNA 덴드리머 및 중합체성 덴드리머에 공유적으로 부착되거나, 또는 이와 비공유적으로 연합된다 (Mastorakos et al. (2015) Nanoscale. 7(9): 3845-56; Cheng et al. (2008) J Pharm Sci. 97(1): 123-43). 덴드리머 생성은 페이로드 용량과 크기를 제어할 수 있으며, 높은 약물 페이로드 용량을 제공할 수 있다. 더욱이, 다수의 표면 기의 표시를 활용하여 안정성을 개선시키고, 비특이적 상호 작용을 감소시키며 세포 특이적 표적화 및 약물 방출을 증강시킬 수 있다.

[0213] 일부 실시양태에서, 메가뉴클레아제를 코딩하는 유전자는 바이러스 벡터를 사용하여 전달된다. 이러한 벡터는 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 아데노연관 바이러스 (AAV) 벡터를 포함한다 (문헌 [Vannucci, et al. (2013) New Microbiol. 36:1-22]에서 고찰됨). 본 발명에 유용한 재조합 AAV 벡터는 바이러스를 세포로 형질 도입하고 뉴클레아제 유전자를 세포 게놈 내로 삽입할 수 있는 임의의 혈청형을 가질 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6의 혈청형을 갖는다. AAV 벡터는 또한, 숙주 세포에서 제2 가닥 DNA 합성이 필요하지 않도록 자기 상보적일 수 있다 (McCarty, et al. (2001) Gene Ther. 8:1248-54).

[0214] 메가뉴클레아제 유전자가 DNA 형태 (예를 들어, 플라스미드)로 전달되고/되거나 바이러스 벡터 (예를 들어,

AAV)를 통해 전달되는 경우, 이들 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결되어야만 한다. 일부 실시양태에서, 이것은 바이러스 프로모터, 예컨대 바이러스 벡터로부터의 내인성 프로모터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터의 LTR) 또는 널리 공지된 시토메갈로바이러스- 또는 SV40 바이러스-조기 프로모터일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 메가뉴클레아제 유전자는 우선적으로 표적 세포 (예를 들어, T 세포)에서의 유전자 발현을 구동시키는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0215] 본 발명은 TRC 1-2 인식 서열에서 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 내로의 관심 외인성 서열의 도입을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 관심 외인성 서열은 삽입물의 요소에 플랭킹된 3' 상동성 아암 및 5' 상동성 아암을 포함한다. 이러한 상동성 아암은 절단 부위가 생산되는 뉴클레아제 인식 서열의 상류 5' 및 하류 3'에 상응하는 서열과 서열 상동성을 갖는다. 일반적으로, 상동성 아암은 적어도 50개 염기쌍, 바람직하게 적어도 100개 염기쌍, 및 2000개 이하 또는 그 초과의 염기쌍의 길이를 가질 수 있으며, 게놈 내의 상응하는 서열과 적어도 90%, 바람직하게 적어도 95% 또는 그 초과의 서열 상동성을 가질 수 있다.

[0216] 본 발명의 관심 외인성 서열은 이전에 논의된 수단 중 임의의 것에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 관심 외인성 서열은 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 또는 바람직하게 재조합 AAV 벡터를 통해 도입된다. 외인성 핵산을 도입하는 데 유용한 재조합 AAV 벡터는 바이러스를 세포 내로 형질 도입하고 외인성 핵산 서열을 세포 게놈 내로 삽입할 수 있는 임의의 혈청형을 가질 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6의 혈청형을 갖는다. 재조합 AAV 벡터는 또한, 숙주 세포에서 제2 가닥 DNA 합성이 필요하지 않도록 자기 상보적일 수 있다.

[0217] 또 다른 특정한 실시양태에서, 관심 외인성 서열은 단일 가닥 DNA 주형을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 단일 가닥 DNA는 관심 외인성 서열을 포함할 수 있고, 바람직한 실시양태에서, 상동 재조합에 의해 메가뉴클레아제 절단 부위 내로의 핵산 서열의 삽입을 촉진하기 위해 5' 및 3' 상동성 아암을 포함할 수 있다. 단일 가닥 DNA는 5' 상동성 아암의 상류 5'에 5' AAV 역위 말단 반복부 (ITR) 서열, 및 3' 상동성 아암의 하류 3'에 3' AAV ITR 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0218] 또 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 뉴클레아제 및/또는 본 발명의 관심 외인성 서열을 코딩하는 유전자는 선형화된 DNA 주형으로 형질감염시킴으로써 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 예에서, 플라스미드 DNA는 원형 플라스미드 DNA가 세포로 형질감염되기 전에 선형화되도록 하나 이상의 제한 효소에 의해 소화될 수 있다.

[0219] 본 발명에 의해 변형된 T 세포는 메가뉴클레아제 및/또는 관심 외인성 서열의 도입 전에 활성화를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 세포를 활성화하기에 충분한 기간 동안 가용성이거나 또는 지지체 (즉, 비드)와 접합되는 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다.

[0220] 본 발명의 유전자 변형된 세포는 하나 이상의 유도성 자살 유전자를 발현하도록 추가로 변형될 수 있으며, 이러한 유전자의 유도는 세포 사멸을 유발하고 시험관내 또는 생체내 세포의 선택적 파괴를 허용한다. 일부 예에서, 자살 유전자는 세포독성 폴리펩티드, 비-독성 전구 약물을 세포독성 약물로 전환시킬 수 있는 능력이 있는 폴리펩티드, 및/또는 세포 내에서 세포독성 유전자 경로를 활성화시키는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 즉, 자살 유전자는 자체적으로 또는 다른 화합물의 존재하에 세포 사멸을 유발하는 산물을 코딩하는 핵산이다. 이러한 자살 유전자의 대표적인 예는 단순 포진 바이러스의 티미딘 키나제를 코딩하는 유전자이다. 부가의 예는 수두 대상 포진 바이러스의 티미딘 키나제, 및 5-플루오로시토신을 고도로 독성인 화합물 5-플루오로우라실로 전환시킬 수 있는 박테리아 유전자 시토신 데아미나제를 코딩하는 유전자이다. 자살 유전자는 또한, 카스파제-9, 카스파제-8 또는 시토신 데아미나제를 코딩하는 유전자를 비-제한적인 예로서 포함한다. 일부 예에서, 카스파제-9는 이량체화의 특이적 화학적 유도제 (CID)를 사용하여 활성화될 수 있다. 자살 유전자는 또한, 세포를 치료용 및/또는 세포독성 모노클로날 항체에 대해 감수성이 되도록 하는 세포 표면에서 발현되는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 추가 예에서, 자살 유전자는 항-CD20 mAb 리툭시맙에 의해 인식된 항원성 모티프, 및 자살 유전자를 발현하는 세포의 선택을 허용하는 에피토프를 포함하는 재조합 항원성 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 예를 들어, 2개의 리툭시맙 결합 에피토프 및 QBEnd10 결합 에피토프를 포함하는, WO2013153391에 기재된 RQR8 폴리펩티드를 참조한다. 이러한 유전자의 경우, 리툭시맙을 대상체에게 투여하여 필요할 때 세포 고갈을 유도할 수 있다. 추가 예에서, 자살 유전자는 말단절단된 EGFR 폴리펩티드와 조합하여 발현된 QBEnd10 결합 에피토프를 포함할 수 있다.

[0221] 본원에 기재된 방법 및 조성물에 의해 변형된 진핵 세포는 내인성 T 세포 수용체 (즉, 알파/베타 T 세포 수용체)의 감소된 발현을 가질 수 있고, 임의로, 관심 단백질 (예를 들어, CAR)을 추가로 발현할 수 있다. 따

라서, 본 발명은 관심 단백질을 발현하고 내인성 T 세포 수용체 (예를 들어, 알파/베타 T 세포 수용체)를 발현하지 않는 진핵 세포의 집단을 추가로 제공한다. 예를 들어, 이러한 집단은 CAR를 발현하거나 (즉, CAR+) 또는 외인성 T 세포 수용체를 발현하고 (즉, exoTCR+), 내인성 T 세포 수용체의 감소된 발현을 갖는 (즉, TCR-) 본 발명의 복수 개의 유전자 변형된 진핵 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 다양한 실시양태에서, 상기 집단 내의 세포의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 최대 100%가 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 진핵 세포이다. 특정한 예에서, 상기 집단은 TCR-이면서 CAR+인 세포를 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 최대 100% 포함할 수 있다.

[0222] 일부 실시양태에서, 세포의 집단 내로 도입될 때, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 제1 세대 TCR1-2x.87EE 메가뉴클레아제가 세포의 집단 내로 도입될 때보다 TCR-이면서 CAR+인 세포의 집단의 더 큰 백분율을 초래한다.

[0223] 추가로, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포는 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포와 비교 시, 오프 타겟 커팅 및 그의 효과의 감소, 세포에서의 메가뉴클레아제의 지속 시간 감소, CAR T 확장 증강 (즉, 증가)을 포함하는 개선된 특징을 나타내며, 덜 분화된다. 또한, 본원에 의해 개시된 메가뉴클레아제 (또는 이를 코딩하는 핵산)를 도입시킨 세포의 집단은 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 (또는 이를 코딩하는 핵산)를 도입시킨 세포의 집단과 비교할 때, 변형된 세포의 더 큰 백분율과 덜 분화된 세포의 더 큰 백분율을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 도입시킨 세포의 집단은 제1 세대 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제를 도입한 세포의 집단보다 더 큰 백분율의 중심 기억 T 세포 (예를 들어, CD45RO, CCR7 및 CD62L을 발현하는 세포)를 나타낸다.

[0224] 2.4 제약 조성물

[0225] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 유전자 변형된 진핵 세포, 또는 본 발명의 유전자 변형된 진핵 세포의 집단, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 이러한 제약 조성물은 공지된 기술에 따라 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st ed., Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005)] 참조). 본 발명에 따른 제약 제형의 제조에서, 세포는 전형적으로 제약상 허용되는 담체와 혼합되고, 이로써 생성되는 조성물이 대상체에게 투여된다. 물론, 담체는 제형 내의 임의의 다른 성분과 화합성이라는 점에서 허용되어야만 하며, 대상체에게 해롭지 않아야만 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 대상체에서의 질환을 치료하는 데 유용한 하나 이상의 부가의 작용제를 추가로 포함할 수 있다. 부가의 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 유전자 변형된 T 세포의 생체내 세포 증식 및 생착을 촉진하는 생물학적 분자, 예컨대 시토카인 (예를 들어, IL-2, IL-7, IL-15 및/또는 IL-21)을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 유전자 변형된 진핵 세포를 포함하는 제약 조성물은 부가의 작용제 또는 생물학적 분자와 동일한 조성물로 투여될 수 있거나, 또는 또 다른 한편으론 별도의 조성물로 공동 투여될 수 있다.

[0226] 본 개시 내용은 또한, 의약으로서 사용하기 위한, 본원에 기재된 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단을 제공한다. 본 개시 내용은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, 본원에 기재된 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단의 용도를 추가로 제공한다. 이러한 한 측면에서, 상기 의약은 이를 필요로 하는 대상체에서 암 면역요법에 유용하다.

[0227] 본원에 의해 개시된 메가뉴클레아제가 도입되는 세포가 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포와 비교 시, 오프 타겟 커팅의 감소, 세포에서의 메가뉴클레아제의 지속 시간 감소, TCR 알파 불변 영역 유전자의 더 큰 붕괴 효율, CAR T 확장 증강 (즉, 증가)을 나타낼 수 있고, 덜 분화될 수 있다는 것을 고려해 볼 때, 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포를 포함하는 본원에 의해 개시된 제약 조성물은 또한, TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 의해 유전자 변형시킨 세포를 포함하는 제약 조성물의 투여와 비교 시, 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 때 질환 (예를 들어, 암)을 치료하는 데 있어서 개선된 효능을 나타낸다.

[0228] 일부 실시양태에서, 세포의 집단 내로 도입될 때, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제는 제1 세대 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제를 세포의 집단 내로 도입한 경우보다 더 큰 백분율로, TCR-이면서 CAR+인 세포의 집단을 초래한다.

[0229] 추가로, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포는 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제로 유전자 변형시킨 세포와 비교 시, 오프 타겟 커팅 및 그의 효과의 감소, 세포에서의 메가뉴클레아제의 지속 시간 감소, CAR T 확장 증강 (즉, 증가)을 포함하는 개선된 특징을 나타내며, 덜 분화된다. 또한, 본원에 의해 개시된 메가뉴클레아제 (또는 이를 코딩하는 핵산)를 도입시킨 세포의 집단은 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제 (또는 이를 코딩하는 핵산)를 도입시킨 세포의 집단과 비교할 때, 변형된 세포의 더 큰 백분율과 덜 분화된 세포의 더 큰 백분율을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 본원에 의해 개시된 조작된 메가뉴클레아제를 도입시킨 세포의 집단은 모 TRC1-2x.87EE 메가뉴클레아제를 도입시킨 세포의 집단보다 더 큰 백분율의 중심 기억 T 세포 (예를 들어, CD45RO, CCR7 및 CD62L을 발현하는 세포)를 나타낸다.

[0230] 본 발명의 제약 조성물은 T 세포 입양 면역요법에 의해 표적화될 수 있는 임의의 질환 상태를 치료하는 데 유용할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물 및 의약은 암의 치료에 유용하다. 본 개시 내용의 제약 조성물 및 의약으로 치료될 수 있는 암의 비-제한적인 예는 암종, 림프종, 육종, 흑색종, 모세포종, 백혈병 및 생식 세포 종양이고, 이는 B-세포 기원의 암, 신경모세포종, 골육종, 전립선암, 신장 세포 암종, 횡문근육종, 간암, 위암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 유방암, 폐암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 신장암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 결장암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁 경부의 암, 질 암종, 외음부의 암종, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연질 조직의 육종, 요도암, 음경암, 소아기의 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관 형성, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 유표피암, 편평 세포암, 석면에 의해 유발된 암을 포함하여 환경적으로 유발된 암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 급성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 면역 모세포 대세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 균상 식육종, 역형성 대세포 림프종, 및 T-세포 림프종, 및 상기 암의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, B-세포 기원의 암은 B-계통 급성 림프모구성 백혈병, B-세포 만성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, 미만성 큰 B 세포 림프종, 프리-B ALL (소아 적응증), 외투 세포 림프종, 여포성 림프종, 변연부 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 및 B-세포 비호지킨 림프종을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0231] 암이 본원에 의해 개시된 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단으로 치료되는 이들 실시양태 중 일부에서, 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단이 투여된 대상체에게 부가의 치료제, 예컨대 방사선, 수술, 또는 화학 요법제가 추가로 투여된다.

[0232] 본 발명은 게놈 내에 관심 서열을 코딩하는 외인성 핵산 분자를 포함하는 본원에 기재된 복수 개의 유전자 변형된 세포를 포함하는 유전자 변형된 세포의 집단을 추가로 제공하며, 여기서 외인성 핵산 분자는 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 내로 삽입되고, 내인성 TCR의 세포 표면 발현이 감소된다. 따라서, 본 발명의 다양한 실시양태에서, 유전자 변형된 세포의 집단이 제공되며, 여기서 이러한 집단 내의 세포의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 최대 100%가 본원에 기재된 유전자 변형된 세포이다. 본 발명의 추가 실시양태에서, 유전자 변형된 세포의 집단이 제공되며, 여기서 이러한 집단 내의 세포의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 최대 100%가 키메라 항원 수용체를 추가로 발현하는 본원에 기재된 유전자 변형된 세포이다.

[0233] 2.5. 유전자 변형된 세포를 투여하는 방법

[0234] 본원에 개시된 또 다른 측면은 본 개시 내용의 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단의 유효량을, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것이다. 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 유효량의 세포의 집단이 질환을 앓고 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 질환은 암일 수 있고, 본 발명의 유전자 변형된 진핵 세포의 투여는 면역요법을 나타낸다. 투여된 세포는 수용자 내의 표적 세포의 증식을 감소시키거나, 그 수를 감소시키거나 또는 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, 본 개시 내용의 유전자 변형된 진핵 세포는 생체 내에서 복제 및 확장될 수 있으며, 그 결과 질환의 지속적인 제어로 이어질 수 있는 장기 지속성을 초래할 수 있다.

[0235] 가능한 투여 경로의 예는 비경구 (예를 들어, 정맥내 (IV), 근육내 (IM), 피내, 피하 (SC) 또는 주입) 투여를

포함한다. 더욱이, 투여는 연속 주입에 의해 또는 단일 또는 다수의 대량 단일 용량에 의해 이루어질 수 있다. 구체적 실시양태에서, 작용제는 약 12시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간 또는 1시간 미만의 기간에 걸쳐 주입된다. 또한 다른 실시양태에서, 주입은 처음에는 천천히 이루어지고 시간이 지남에 따라 증가한다.

[0236] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단은 암 치료 목적으로 종양 항원을 표적으로 한다. 이러한 암은 암종, 림프종, 육종, 모세포종, 백혈병, B 세포 기원의 암, 유방암, 위암, 신경모세포종, 골육종, 폐암, 흑색종, 전립선암, 결장암, 신장 세포 암종, 난소암, 횡문근 육종, 백혈병, 및 호지킨 림프종을 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 구체적 실시양태에서, 암 및 장애는 프리-B ALL (소아 적응증), 성인 ALL, 외투 세포 림프종, 미만성 큰 B 세포 림프종, 동종 이계 골수 이식 후 구조 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이들 암은, 예를 들어, CD19, CD20, CD22, 및/또는 ROR1을 표적으로 하는 CAR의 조합을 사용하여 치료될 수 있다. 일부 비-제한적인 예에서, 본 개시 내용의 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단은 암종, 림프종, 육종, 흑색종, 모세포종, 백혈병, 및 생식 세포 종양을 표적으로 하며, 이는 B-세포 기원의 암, 신경모세포종, 골육종, 전립선암, 신장 세포 암종, 횡문근 육종, 간암, 위암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 유방암, 폐암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 신장암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 결장암, 직장암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁 경부의 암, 질 암종, 외음부의 암종, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연질 조직의 육종, 요도암, 음경암, 소아기의 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신우 암종, 중추 신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관 형성, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 유표피암, 편평 세포암, 석면에 의해 유발된 암을 포함하여 환경적으로 유발된 암, 다발성 골수종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 급성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 면역 모세포 대세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 균상 식육종, 역형성 대세포 림프종, 및 T-세포 림프종, 및 상기 암의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, B-세포 기원의 암은 B-계통 급성 림프모구성 백혈병, B-세포 만성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, 미만성 큰 B 세포 림프종, 프리-B ALL (소아 적응증), 외투 세포 림프종, 여포성 림프종, 변연부 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 및 B-세포 비호지킨 림프종을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0237] "유효량" 또는 "치료량"이 표시되는 경우, 투여되는 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기 (존재하는 경우), 감염 또는 전이 정도, 및 환자 (대상체)의 상태에 있어서의 개인차를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 유전자 변형된 세포 또는 그의 집단을 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^9개 세포/체중 kg (이들 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여된다. 추가 실시양태에서, 투여량은 10^5 내지 10^6개 세포/체중 kg (이들 범위 내의 모든 정수 값 포함)이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 이러한 투여량으로 여러 번 투여된다. 면역요법에서 통상적으로 공지되는 주입 기술을 사용하여 세포를 투여할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988] 참조). 특정한 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 질환의 징후에 관하여 환자를 모니터링하고 그에 따라 치료를 조정함으로써 의학 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0238] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 유전자 변형된 진핵 세포 또는 그의 집단의 투여는 표적 질환 또는 병태의 적어도 한 가지 증상을 감소시킨다. 예를 들어, 본 개시 내용의 유전자 변형된 T 세포 또는 그의 집단의 투여는 암의 적어도 한 가지 증상을 감소시킬 수 있다. 암의 증상은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있으며 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0239] 2.6 재조합 바이러스 벡터를 생산하는 방법

[0240] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 바이러스 벡터 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터)를 제공한다. 재조합 AAV 벡터는 전형적으로, 포유동물 세포주, 예컨대 HEK-293에서 생산된다. 바이러스 cap 및 rep 유전자는 자기 복제를 방지하기 위해 벡터로부터 제거되어 치료 유전자 (예를 들어, 메가뉴클레아제 유전자)가 전달될 수 있는 공간을 확보하기 때문에, 이들 유전자를 패키징 세포주에서 트랜스로 제공하는 것이 필요하다. 또한, 복제를 지원하는 데 필요한 "헬퍼" (예를 들어, 아데노바이러스) 성분을 제공하는 것이 필요하다 (Cots et al. (2013), Curr. Gene Ther. 13(5): 370-81). 흔히, 재조합 AAV 벡터는 세포주가 "헬퍼" 성분을 코딩하는 제1 플라스미드, cap 및 rep 유전자를 포함하는 제2 플라스미드, 및 바이러스로 패키징될 개재 DNA 서열을 함유하는 바이러스 ITR을 포함하는 제3 플라스미드로 형질감염되는 삼중 형질감염을 사용하여 생산된다. 이어서, 캡시드에 싸여진 게놈 (ITR 및 관심 개재 유전자(들))을 포함하는 바이러스 입자는 동결-해동 주기, 초음파 처리, 세제 또는 관련 기술 분야에 공지된 다른 수단에 의해 세포로부터 단리된다. 이어서, 입자

를 세슘-클로라이드 밀도 구배 원심 분리 또는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, 이어서 관심 유전자(들)로 세포, 조직 또는 유기체, 예컨대 인간 환자에게 전달한다.

[0241] 재조합 AAV 입자는 전형적으로 세포에서 생산 (제조)되기 때문에, 본 발명을 실시하는 데 있어서 조작된 메가뉴클레아제가 패키징 세포에서 발현되지 않도록 주의해야만 한다. 본 발명의 바이러스 게놈은 메가뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함할 수 있기 때문에, 패키징 세포주에서 발현된 임의의 메가뉴클레아제는 바이러스 입자로 패키징되기 전에 바이러스 게놈을 절단할 수 있다. 이는 패키징 효율 및/또는 단편화된 게놈의 패키징을 감소시킬 것이다. 패키징 세포에서의 메가뉴클레아제 발현을 방지하기 위해 하기를 포함하는 몇 가지 접근법을 사용할 수 있다:

[0242] 메가뉴클레아제를 패키징 세포에서 활성이 아닌 조직 특이적 프로모터의 제어하에 배치할 수 있다. 예를 들어, 메가뉴클레아제 유전자(들)를 근육 조직에 전달하기 위해 바이러스 벡터가 개발된 경우, 근육 특이적 프로모터가 사용될 수 있다. 근육 특이적 프로모터의 예는 C5-12 (문헌 [Liu, et al. (2004) Hum Gene Ther. 15:783-92]), 근육 특이적 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터 (문헌 [Yuasa, et al. (2002) Gene Ther. 9:1576-88]) 또는 평활근 22 (SM22) 프로모터 (문헌 [Haase, et al. (2013) BMC Biotechnol. 13:49-54])를 포함한다. CNS (뉴런) 특이적 프로모터의 예는 NSE, 시냅신, 및 MeCP2 프로모터를 포함한다 (Lentz, et al. (2012) Neurobiol Dis. 48:179-88). 간 특이적 프로모터의 예는 알부민 프로모터 (예컨대 Palb), 인간 α1-항트립신 (예컨대 PalAT) 및 헤모펙신 (예컨대 Phpx) (문헌 [Kramer et al., (2003) Mol. Therapy 7:375-85]), 하이브리드 간 특이적 프로모터 (ApoE 유전자로부터의 간 유전자 자리 제어 영역 (ApoE-HCR) 및 간 특이적 알파1-항트립신 프로모터), 인간 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 및 아포지단백질 A-II 프로모터를 포함한다. 눈 특이적 프로모터의 예는 옵신, 및 각막 상피 특이적 K12 프로모터를 포함한다 (Martin et al. (2002) Methods (28): 267-75) (Tong et al., (2007) J Gene Med, 9:956-66). 이들 프로모터, 또는 관련 기술 분야에 공지된 다른 조직 특이적 프로모터는 HEK-293 세포에서 고도로 활성이 아니므로, 본 발명의 바이러스 벡터 내로 혼입될 때 패키징 세포에서 상당한 수준의 메가뉴클레아제 유전자 발현을 산출할 것으로 예상되지 않을 것이다. 유사하게, 본 발명의 바이러스 벡터는 비화합성 조직 특이적 프로모터의 사용 (즉, 널리 공지된 HeLa 세포주 (인간 상피 세포) 및 간 특이적 헤모펙신 프로모터 사용)과 함께 다른 세포주의 사용을 고려한다. 조직 특이적 프로모터의 다른 예는 활막 육종 PDZD4 (소뇌), C6 (간), ASB5 (근육), PPP1R12B (심장), SLC5A12 (신장), 콜레스테롤 조절 APOM (간), ADPRHL1 (심장) 및 일원성 기형 증후군 TP73L (근육)을 포함한다 (Jacox et al., (2010), PLoS One v.5(8):e12274).

[0243] 또 다른 한편으론, 벡터는 메가뉴클레아제가 발현될 가능성이 없는 상이한 종으로부터의 세포에 패키징될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 입자는 비-포유동물 패키징 세포에서 활성이 아닌 포유동물 프로모터, 예컨대 널리 공지된 시토메갈로바이러스- 또는 SV40 바이러스-조기 프로모터를 사용하여 미생물, 곤충 또는 식물 세포에서 생산될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 바이러스 입자는 가오 등의 문헌 [Gao et al. (2007), J. Biotechnol. 131(2):138-43]에 기재된 바와 같이 바큘로바이러스 시스템을 사용하여 곤충 세포에서 생산된다. 포유동물 프로모터의 제어하에 있는 메가뉴클레아제는 이들 세포에서 발현될 가능성이 낮다 (Airenne et al. (2013), Mol. Ther. 21(4):739-49). 더욱이, 곤충 세포는 포유동물 세포와 상이한 mRNA 스플라이싱 모티프를 활용한다. 따라서, 포유동물 인트론, 예컨대 인간 성장 호르몬 (HGH) 인트론 또는 SV40 대형 T 항원 인트론을 메가뉴클레아제의 코딩 서열 내로 혼입하는 것이 가능하다. 이들 인트론은 곤충 세포에서의 프리-mRNA 전사체로부터 효율적으로 스플라이싱되지 않기 때문에, 곤충 세포는 기능적 메가뉴클레아제를 발현하지 않을 것이며 완전한 길이의 게놈을 패키징할 것이다. 대조적으로, 이로써 생성된 재조합 AAV 입자가 전달되는 포유동물 세포는 프리-mRNA를 적절하게 스플라이싱하고 기능적 메가뉴클레아제 단백질을 발현할 것이다. 첸 하이펑 (Haifeng Chen)은 HGH 및 SV40 대형 T 항원 인트론을 사용하여 곤충 패키징 세포에서 독성 단백질 바르나제 및 디프테리아 독소 단편 A의 발현을 약화시켜, 이들 독소 유전자를 운반하는 재조합 AAV 벡터를 생산할 수 있다고 보고하였다 (Chen (2012), Mol Ther Nucleic Acids. 1(11): e57).

[0244] 메가뉴클레아제 유전자는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있어, 메가뉴클레아제 발현을 위해 소분자 유도인자가 필요하다. 유도성 프로모터의 예는 Tet-On 시스템 (클론테크(Clontech); 문헌 [Chen et al. (2015), BMC Biotechnol. 15(1):4]) 및 레오스위치(RheoSwitch) 시스템 (인트렉손(Intrexon); 문헌 [Sowa et al. (2011), Spine, 36(10): E623-8])을 포함한다. 두 시스템뿐만 아니라 관련 기술 분야에 공지된 유사한 시스템은 소분자 활성화제 (각각 독시사이클린 또는 엑디손)에 반응하여 전사를 활성화시키는 리간드 유도성 전사 인자 (각각 Tet 억제인자 및 엑디손 수용체의 변이체)에 의존한다. 이러한 리간드 유도성 전사 활성화제를 사용하여 본 발명을 실시하는 것은 하기를 포함한다: 1) 메가뉴클레아제 유전자를 상응하는 전사 인자에 반응하는

프로모터의 제어하에 배치하고, 메가뉴클레아제 유전자가 전사 인자에 대한 결합 부위(들)를 갖는 것; 및 2) 패키징된 바이러스 게놈에 전사 인자를 코딩하는 유전자를 포함하는 것. 후자의 단계는 전사 활성화제가 동일한 세포에 또한 제공되지 않는 경우에는 메가뉴클레아제가 재조합 AAV 전달 후 표적 세포 또는 조직에서 발현되지 않을 것이기 때문에 필요하다. 이어서, 전사 활성화제는 동족 소분자 활성화제로 처리되는 세포 또는 조직에서만 메가뉴클레아제 유전자 발현을 유도한다. 이러한 접근법은 유리한데, 이는 소분자 유도인자가 전달되는 조직과 시기를 선택함으로써 메가뉴클레아제 유전자 발현을 시공간 방식으로 조절할 수 있기 때문이다. 그러나, 운반 능력이 상당히 제한된 바이러스 게놈에 유도인자를 포함해야 한다는 요구 사항은 이러한 접근법에 결점을 만든다.

[0245] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 재조합 AAV 입자는 메가뉴클레아제의 발현을 방지하는 전사 억제인자를 발현하는 포유동물 세포주에서 생산된다. 전사 억제인자는 관련 기술 분야에 공지되어 있으며 Tet-억제인자, Lac-억제인자, Cro 억제인자 및 람다-억제인자를 포함한다. 많은 핵 호르몬 수용체, 예컨대 엑디손 수용체가 또한, 동족 호르몬 리간드의 부재하에 전사 억제인자로서 작용한다. 본 발명을 실시하기 위해, 패키징 세포는 전사 억제인자를 코딩하는 벡터로 형질감염/형질 도입되고 바이러스 게놈 (패키징 벡터) 내의 메가뉴클레아제 유전자는 상기 억제인자를 위한 결합 부위를 포함하도록 변형되는 프로모터에 작동가능하게 연결되어, 이러한 억제인자가 프로모터를 침묵시키게 한다. 전사 억제인자를 코딩하는 유전자는 다양한 위치에 배치될 수 있다. 이는 별도의 벡터 상에 코딩될 수 있거나; ITR 서열 외부의 패키징 벡터 내로 혼입될 수 있거나; cap/rep 벡터 또는 아데노바이러스 헬퍼 벡터 내로 혼입될 수 있거나; 또는 구성적으로 발현되도록 패키징 세포의 게놈으로 안정적으로 통합될 수 있다. 통상의 포유동물 프로모터를 변형시켜 전사 억제인자 부위를 혼입하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 창(Chang)과 로닌슨(Roninson)은 강력한 구성적 CMV 및 RSV 프로모터를 변형시켜 Lac 억제인자를 위한 작동인자를 포함시키고, 이와 같이 변형된 프로모터로부터의 유전자 발현이 상기 억제인자를 발현하는 세포에서 크게 약화되었음을 보여주었다 (Chang and Roninson (1996), Gene 183:137-42). 비-인간 전사 억제인자의 사용은 메가뉴클레아제 유전자의 전사가 이러한 억제인자를 발현하는 패키징 세포에서만 억제되고, 그 결과로 생성된 재조합 AAV 벡터로 형질 도입된 표적 세포 또는 조직에서는 억제되지 않는다는 것을 보장한다.

[0246] 2.7 조작된 뉴클레아제 변이체

[0247] 본 발명의 실시양태는 본원에 기재된 조작된 뉴클레아제 및 그의 변이체를 포괄한다. 본 발명의 추가 실시양태는 본원에 기재된 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리뉴클레오티드의 변이체를 포괄한다.

[0248] 본원에 사용된 바와 같은, "변이체"는 실질적으로 유사한 서열을 의미하는 것으로 의도된다. "변이체" 폴리펩티드는 천연 단백질 내의 하나 이상의 내부 부위에서 하나 이상의 아미노산을 결실 또는 부가하고/하거나 천연 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 아미노산을 치환함으로써 "천연" 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드를 의미하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 바와 같은, "천연" 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는, 그로부터 변이체가 유래되는 모 서열을 포함한다. 상기 실시양태에 의해 포괄된 변이체 폴리펩티드는 생물학적으로 활성이다. 즉, 그들은 천연 단백질의 원하는 생물학적 활성; 즉, 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 (서열식별번호: 3)에서 발견되는 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식하고 이를 절단할 수 있는 능력을 계속 보유하고 있으며, 일부 실시양태에서, 개선된 (즉, 증가된) 특이성 및 오프 타겟 커팅, 세포에서의 감소된 지속 시간, 및 TCR 알파 불변 영역 유전자의 증강된 (즉, 증가된) 변형 효율로 이루어진 군으로부터 선택된, 제1 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제에 비해 적어도 하나의 개선된 특성을 나타낸다. 이러한 변이체는, 예를 들어, 인간의 조작으로 인해 발생할 수 있다. 상기 실시양태의 천연 폴리펩티드 (예를 들어, 서열식별번호: 7 및 8)의 생물학적 활성 변이체 또는 본원에 기재된 인식 절반 부위 결합 서브유닛의 생물학적 활성 변이체는 본원의 다른 곳에 기재된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정된 바와 같이, 천연 폴리펩티드 또는 천연 서브유닛의 아미노산 서열과 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 서열 동일성을 가질 것이다. 상기 실시양태의 폴리펩티드 또는 서브유닛의 생물학적 활성 변이체는 그러한 폴리펩티드 또는 서브유닛과 불과 약 1 내지 40개의 아미노산 잔기, 불과 약 1 내지 20개, 불과 약 1 내지 10개, 불과 약 5개, 불과 4개, 3개, 2개 또는 심지어 1개의 아미노산 잔기만큼 상이할 수 있다.

[0249] 상기 실시양태의 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 말단절단 및 삽입을 포함하는 다양한 방식으로 변경될 수 있다. 이러한 조작 방법은 일반적으로 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변이체는 DNA 내의 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. 돌연변이유발 및 폴리뉴클레오티드 변경 방법은 관련 기술 분야에

널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; U.S. Pat. No. 4,873,192; Walker and Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York)] 및 그 안에 인용된 참고문헌 참조). 관심 단백질의 생물학적 활성에 영향을 주지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 지침은 본원에 참조로 포함된 문헌 [Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 찾을 수 있다. 보존적 치환, 예컨대 하나의 아미노산을 유사한 특성을 가진 또 다른 아미노산으로 교환하는 것이 최적일 수 있다.

[0250] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 본원에 개시된 HVR1 및 HVR2 영역의 변이체를 포함할 수 있다. 모 HVR 영역은, 예를 들어, 상기 예시된 조작된 메가뉴클레아제의 잔기 24-79 또는 잔기 215-270을 포함할 수 있다. 따라서, 변이체 HVR은 본원에 예시된 조작된 메가뉴클레아제의 잔기 24-79 또는 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있어, 변이체 HVR 영역이 조작된 메가뉴클레아제의 생물학적 활성 (즉, 인식 서열에 결합하고 이를 절단하는 것)을 유지하도록 한다. 추가로, 본 발명의 일부 실시양태에서, 변이체 HVR1 영역 또는 변이체 HVR2 영역은 모 HVR 내의 특이적 위치에서 발견되는 아미노산 잔기에 상응하는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 맥락에서, "상응하는" 것은 변이체 HVR 내의 아미노산 잔기가, 동일한 상대적 위치 (즉, 모 HVR 서열에 남아있는 아미노산과 비교함) 내의 모 HVR 서열에 존재하는 동일한 아미노산 잔기 (즉, 별도의 동일한 잔기)라는 것을 의미한다. 예로서, 모 HVR 서열이 위치 26에서 세린 잔기를 포함하는 경우, 잔기 26에 "상응하는 잔기를 포함하는" 변이체 HVR은 또한, 모 위치 26에 상대적인 (즉, 상응하는) 위치에 세린을 포함할 것이다.

[0251] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR1 영역을 포함한다.

[0252] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR2 영역을 포함한다.

[0253] 일부 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 HVR2 영역을 포함한다.

[0254] 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 7의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 97% 서열 동일성을 갖는 HVR1 영역 및 서열식별번호: 7의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 81% 서열 동일성을 갖는 HVR2 영역을 포함한다.

[0255] 다른 특정한 실시양태에서, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 서열식별번호: 8의 잔기 215-270에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 HVR1 영역 및 서열식별번호: 8의 잔기 24-79에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 86% 서열 동일성을 갖는 HVR2 영역을 포함한다.

[0256] 야생형 I-CreI 메가뉴클레아제의 DNA 인식 도메인에 대한 상당한 수의 아미노산 변형이 이전에 확인된 바 있으며 (예를 들어, US 8,021,867), 이는 단독으로 또는 조합하여, DNA 인식 서열 절반 부위 내의 개별 염기에서 변경된 특이성을 갖는 재조합 메가뉴클레아제를 초래하여, 그 결과로 생성된 합리적으로 설계된 메가뉴클레아제가 야생형 효소와 상이한 절반 부위 특이성을 갖도록 한다. 표 2는 인식 절반 부위의 각각의 절반 부위 위치 (-1 내지 -9)에 존재하는 염기를 기반으로 특이성을 증강시키기 위해 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛에서 만들 수 있는 잠재적인 치환을 제공한다.

[0257] <표 2>

[0258]

	선호된 센스 가닥 염기										
위치	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	**R70*** H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75*				**T46***			G70 A70 S70 G46*

[0259]

	선호된 센스 가닥 염기										
위치	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
				H139 Q46* H46*							
-2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	**Q44***	C44*						
-3	Q68 C24* **I24***	E68 F68 K24* R24*	**R68**	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 **Q26***			S26*
-5		E42	R42			**K28***	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						**S40** S28*
-7	**N30*** **Q38**	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33 **Y33**	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33		R32*	R33				
-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32			**S32** N32 H32 Q32 T32

[0260] 볼드체 항목은 야생형 접촉 잔기이며 본원에 사용된 바와 같은 "변형"을 구성하지 않는다. 별표는 잔기가 안티센스 가닥 상의 염기와 접촉한다는 것을 나타낸다.

[0261] DNA 결합 친화성 및/또는 활성을 조정하기 위해 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛에서 특정 변형이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 조작된 메가뉴클레아제 단량체 또는 서브유닛은 I-CreI 또는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 19에 상응하는 잔기에 G, S, 또는 A를 포함할 수 있고 (WO 2009001159), I-CreI 또는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 66에 상응하는 잔기에 Y, R, K, 또는 D를 포함할 수 있고/있거나 I-CreI

또는 서열식별번호: 7 또는 8의 위치 80에 상응하는 잔기에 E, Q, 또는 K를 포함할 수 있다 (US8021867).

[0262] 폴리뉴클레오티드의 경우, "변이체"는 천연 폴리뉴클레오티드 내의 하나 이상의 부위에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실 및/또는 부가를 포함한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 오픈 리딩 프레임이 유지되도록 상기 실시양태의 핵산의 변이체가 구축될 것임을 인식할 것이다. 폴리뉴클레오티드의 경우, 보존적 변이체는 유전 코드의 축중성으로 인해 상기 실시양태의 폴리펩티드 중 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 서열을 포함한다. 변이체 폴리뉴클레오티드는 합성적으로 유래된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 부위 지정 돌연변이유발을 사용하여 생성되었지만 여전히 상기 실시양태의 재조합 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일반적으로, 상기 실시양태의 특정한 폴리뉴클레오티드의 변이체는 본원의 다른 곳에 기재된 서열 정렬 프로그램 및 파라미터에 의해 결정된 바와 같이, 그 특정한 폴리뉴클레오티드와 적어도 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 가질 것이다. 상기 실시양태의 특정한 폴리뉴클레오티드 (즉, 참조 폴리뉴클레오티드)의 변이체는 또한, 변이체 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드와 참조 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드 간의 퍼센트 서열 동일성을 비교함으로써 평가될 수 있다.

[0263] 본원에 포괄된 변이체 단백질 서열의 결실, 삽입 및 치환은 폴리펩티드의 특징에 있어서 급진적인 변화를 일으킬 것으로 예상되지 않는다. 그러나, 사전에 치환, 결실 또는 삽입의 정확한 효과를 예측하기 어려운 경우, 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역 유전자 (서열식별번호: 3)의 엑손 1 내에서 발견되는 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 우선적으로 인식하고 절단할 수 있는 능력에 관하여 폴리펩티드를 스크리닝함으로써 그 효과가 평가될 것임을 인지할 것이다.

[0264] 실시예

[0265] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 제한적인 것으로 해석되서는 안된다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 단지 일상적인 실험을 사용하여 본원에 기재된 특이적 물질 및 절차에 대한 수많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 실시예에 뒤 따르는 청구 범위에 포괄되도록 의도된다.

[0266] 실시예 1

[0267] TRC 1-2 인식 서열에 대한 특이성을 갖는 메가뉴클레아제의 특징규명

[0268] 1. TRC 1-2 인식 서열을 인식하고 이를 절단하는 메가뉴클레아제

[0269] TRC 1-2L.1592 (서열식별번호: 7) 및 TRC 1-2L.1775 (서열식별번호: 8)로서 지칭된 제2 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 인간 T 세포 수용체 알파 불변 영역에 존재하는 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식하고 이를 절단하도록 조작되었다. 이들 제2 세대 메가뉴클레아제 각각은 SV40으로부터 유래된 N-말단 뉴클레아제-국재화 시그널, 제1 메가뉴클레아제 서브유닛, 링커 서열, 및 제2 메가뉴클레아제 서브유닛을 포함한다. 각각의 TRC 1-2 메가뉴클레아제 내의 제1 서브유닛은 서열식별번호: 5의 TRC1 인식 절반 부위에 결합하는 반면, 제2 서브유닛은 TRC2 인식 절반 부위에 결합한다 (도 1 참조). TRC1-결합 서브유닛 및 TRC2-결합 서브유닛은 각각, HVR1 및 HVR2로서 지칭된 56개 염기쌍 초가변 영역을 포함한다.

[0270] 각각의 TRC1-결합 서브유닛의 HVR1 영역은 서열식별번호: 7 및 8의 잔기 215-270으로 이루어진다. TRC 1-2L.1592 및 TRC 1-2L.1775의 TRC1-결합 서브유닛은 HVR1 영역 외부에서 서로 동일하다. 각각의 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 HVR1 영역은 야생형 I-CreI 서열 (서열식별번호: 1)과 비교하여 위치 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 266, 및 268에서의 변형을 포함한다. 야생형 I-CreI와 비교하여 변형되지는 않았지만, 서열식별번호: 7 및 8의 위치 261에 있는 아르기닌 잔기는 변형된 HVR1 잔기와 조합하여, 뉴클레아제의 특이성에 기여하는 것으로 여겨진다. TRC 1-2L.1592의 HVR1 영역은 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제의 HVR1 영역과 96.43% 서열 동일성을 공유한다. TRC 1-2L.1775의 HVR1 영역은 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제의 HVR1 영역과 100% 서열 동일성을 공유한다.

[0271] 각각의 TRC2-결합 서브유닛의 HVR2 영역은 서열식별번호: 7 및 8의 잔기 24-79로 이루어진다. TRC 1-2L.1592 및 TRC 1-2L.1775의 TRC2-결합 서브유닛은, E (TRC 1-2L.1592) 또는 Q (TRC 1-2L.1775)일 수 있는 서열식별번호: 7 및 8의 위치 80을 제외하고는 HVR2 영역의 외부에서 서로 동일하다. 각각의 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 HVR2 영역은 야생형 I-CreI 서열 (서열식별번호: 1)과 비교하여 위치 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 68, 70, 75, 및 77에서의 변형을 포함한다. TRC 1-2L.1592 메가뉴클레아제는 야생형 I-CreI와 비교하여 위치 71, 72, 및 73에서의 변형을 추가로 함유한다. 또한 서열식별번호: 7 및 8의 위치 139에

있는 아르기닌 잔기가 야생형 I-CreI 서열과 비교하여 변형되고, 변형된 HVR2 잔기와 조합하여 뉴클레아제의 특이성에 기여하는 것으로 여겨진다. TRC 1-2L.1592의 HVR2 영역은 제1 세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제의 HVR2 영역과 단지 80.36% 서열 동일성을 공유한다. TRC 1-2L.1775의 HVR2 영역은 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제의 HVR2 영역과 단지 85.71% 서열 동일성을 공유한다.

[0272] 2. 제1 세대 TRC 1-2 뉴클레아제의 최적화

[0273] 이전에 보고된 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제는 GUIDE-seq (문헌 [Tsai et al. (2015), Nat Biotechnology 33:187-197])와 매우 유사한 방법을 사용하여 인식 부위 특이성에 관하여 평가되었지만, 메가뉴클레아제에 대한 잠재적인 오프 타겟 부위를 찾기 위해 조정되었다. 일반적으로, 잠재적인 오프 타겟 부위는 이중 가닥 DNA 파괴에서 프로브 올리고뉴클레오티드를 포획함으로써 확인된다. TRC 1-2 메가뉴클레아제는 4개의 염기쌍 3' 오버행을 생성하므로, 프로브 올리고는 또한 뉴클레아제 절단에 의해 창출될 가능성이 더 높은 부위에서 라이게이션 효율을 개선하기 위해 무작위 배정된 4개의 염기쌍 오버행을 함유한다.

[0274] TRC 1-2x.87EE의 특이성 분석 결과, 인간 T 세포에서 다양한 잠재적인 오프 타겟 부위가 발견되었다. 이러한 오프 타겟은 높은 빈도로 적중된 독특한 표적과 낮은 빈도로 적중된 반복 표적의 두 가지 관련 범주로 분류될 수 있다. 이러한 오프 타겟의 인식에 관여하는 주요 아미노산은 다시 무작위 배정되었다. 그 후에, 의도된 부위를 커팅하기 위해 동시 선택을 실행하고, 오프 타겟 부위를 커팅하지 않도록 반대 선택을 실행하였다. 오프 타겟 부위는 오프 타겟 둘 다에 대항하여 차별될 것인 답변 (즉, 뉴클레아제)을 단리하기 위해 연속적인 선택 라운드 사이에 교대로 사용되었다. 사용된 2가지 오프 타겟은 낮은 빈도로 커팅되지만 게놈 내의 고도로 반복되는 부위인 Off1: 5' - TGGCCTGGAGaAACAgtgtaaa - 3' (서열식별번호: 16), 및 빈번하게 적중하고 독특한 오프 타겟의 Off2: 5' - cGGCCTGtAGtAcaggAcCTGA - 3' (서열식별번호: 17)이다 (소문자는 의도된 부위로부터의 미스매치를 나타낸다). 다양한 뉴클레아제 라이브러리가 사용되었다.

[0275] 선택 후, 각각의 성공적인 라이브러리로부터의 단리된 클론의 96 웰 플레이트를 준비하여 플라스미드 DNA를 단리하였다. 각각의 플라스미드 DNA는 GFP 유전자에서 2개의 직접적인 반복부 사이의 중단에서 통합된 표적 부위를 함유하는 CHO 세포로 개별적으로 형질감염되었다. 표적 부위를 절단하면, 단일 가닥 어닐링에 의해 GFP 유전자가 복구되고 표적 부위 커팅 빈도는 유동 세포계수기 상에서 GFP 양성 세포의 수를 계수함으로써 계수될 수 있다. 본 발명자들은 의도된 부위와 Off1 표적 부위를 가진 세포에 대항하여 뉴클레아제 플라스미드를 검정하였다. 이런 방식으로, 본 발명자들은 어떤 뉴클레아제가 여전히 의도된 부위를 커팅하고 있지만 오프 타겟의 최상의 것을 구별하는지 평가할 수 있었다. 본 발명자들은 5가지 후보를 확인하였다. TRC 1-2에 대한 원래 라이브러리로부터 L.1462, L.1466 및 L.1469의 3가지 후보를 다시 단리하였다. 3가지 답변은 모두 독특하였지만 서로 관련이 있었다. 2가지 후보, 즉 L.1108 및 L.1118이 TRC 라이브러리 2로부터 단리되었다. 이들 후보 각각은 본 발명의 제2 세대 뉴클레아제의 개발에 있어서 중간체 뉴클레아제를 나타낸다.

[0276] 뉴클레아제를 추가로 개선하기 위해, 인식 부위 특이성에 관여한 주요 아미노산을 무작위 배정하였다. L.1462, L.1466 및 L.1469는 하나의 라이브러리에 수집되었고 L.1108 및 L.1118은 제2 라이브러리에 수집되었다. PCR에 의한 새로운 무작위 배정이 둘 다에 도입되었다. 유사한 선택 전략이 새로운 라이브러리와 함께 수행되었고; 의도된 부위를 위하여 및 Off1 또는 Off2에 대항하여 동시에 선택된다. 오프 타겟은 선택 라운드 사이에 교대로 사용되었다. 개별 답변의 96 웰 플레이트를 선택으로부터 생성하고, CHO iGFFP 검정에서 시험하여 의도된 부위와 Off1 및 Off2 모두의 커팅을 결정하였다. 이러한 부가의 최적화 라운드로부터 몇 가지 새로운 뉴클레아제가 확인되었다. L.1462, L.1466 및 L.1469에 기반한 라이브러리부터의 답변은 L.1775 및 L.1843을 포함하였다. L.1108 및 L.1118에 기반한 라이브러리로부터의 하나의 답변: L.1592. 모든 새로운 뉴클레아제는 의도된 표적에 대한 강력한 활성과 오프 타겟 둘 다에 대항한 강력한 차별을 명확하게 보여주었다 (하기 추가로 기재되는 바와 같음). 새로운 뉴클레아제는 올리고 포획 검정 (하기에 추가로 기재됨)을 통해 실행되어 잠재적인 오프 타겟 부위를 결정하였으며, 이는 일반적으로 잠재적인 오프 타겟의 수가 감소하였고, 특히 L.1592는 잠재적으로 합법적인 오프 타겟 부위를 거의 갖고 있지 않았다는 것을 명확하게 보여주었다. L.1108, L.1469, L.1592, L.1775 및 L.1843은 독성에 대한 일반적인 측정인, 시간 경과에 따른 GFP 시그널의 안정성을 검정하기 위해 7일 기간에 걸쳐 iGFFP 검정에서 추가로 평가되었다. L.1469, L.1592, L.1775 및 L.1843은 기능에 대하여 1차 T 세포에서 추가로 시험되었다.

[0277] 3. TRC 1-2 인식 서열 절단 및 오프 타겟 커팅의 평가

[0278] TRC 1-2 메가뉴클레아제가 TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5)을 인식하고 이를 절단할 수 있었는 지의 여부를 결정하기 위해, 각각의 TRC 1-2 메가뉴클레아제를, 이전에 보고된 CHO 세포 리포터 검정을 사용하여 평가하

였다 (WO/2012/167192, 도 3 참조). 이러한 검정을 수행하기 위해, 세포의 게놈으로 통합된 비-기능적 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 발현 카세트를 운반하는 한 쌍의 CHO 세포 리포터 주가 생산되었다. 각각의 세포주에서의 GFP 유전자는 한 쌍의 인식 서열에 의해 중단되어, 메가뉴클레아제에 의한 어느 하나의 인식 서열의 세포 내 절단이 상동 재조합 사건을 자극하여 기능적 GFP 유전자를 생성하도록 하였다. 두 세포주에서, 인식 서열 중 하나는 TRC 1-2 유전자로부터 유래되었고, 제2 인식 서열은 "CHO 23/24"라고 하는 대조군 메가뉴클레아제에 의해 특이적으로 인식되었다. TRC 1-2 인식 서열 (서열식별번호: 5) 및 CHO 23/24 인식 서열을 포함하는 CHO 리포터 세포가 본원에서 "TRC 1-2 세포"로서 지칭된다.

[0279] TRC 1-2 세포를 TRC 1-2 메가뉴클레아제 (예를 들어, TRC 1-2x.87EE, TRC 1-2L.1592, TRC 1-2L.1775, 또는 TRC 1-2L.1843) 중 하나를 코딩하거나 또는 CHO 23/34 메가뉴클레아제를 코딩하는 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 4e5 CHO 세포는 제조업체의 지침에 따라 리포펙타민 2000 [써모 피셔(ThermoFisher)]을 사용하여 96-웰 플레이트에서 50 ng의 플라스미드 DNA로 형질감염되었다. 형질감염 후 48시간에, 형질감염되지 않은 음성 대조군 (1-2 bs)과 비교해서 GFP 양성 세포의 백분율을 결정하기 위해 세포를 유동 세포계수법에 의해 평가하였다. 모든 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 음성 대조군을 상당히 초과하는 빈도 및 CHO 23/24 양성 대조군과 거의 동등하거나 또는 이를 초과하는 빈도로 TRC 1-2 인식 서열을 포함하는 세포주에서 GFP 양성 세포를 생성하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 각각의 TRC 1-2 메가뉴클레아제가, 세포 내의 의도된 TRC 1-2 인식 서열을 효율적으로 인식하고 절단할 수 있었다는 것을 나타낸다 (도 4a-4c).

[0280] 또 다른 한편으론, TRC 1-2 메가뉴클레아제는 또한, GFP 직접 반복부 사이에 반대 선택된 오프 타겟 서열을 함유하는 TRC Off1 및 TRC Off2 세포로 형질감염되었다. 의도된 표적 부위 TRC 1-2 CHO 세포와 달리, TRC Off1 및 TRC Off2 CHO 세포 내의 바람직한 뉴클레아제는 단지 배경 수준의 GFP 양성 세포를 갖는데, 이는 오프 타겟 서열을 커팅하는 것에 대항하여 차별할 수 있기 때문이다. CHO 23-24 표적 부위는 이러한 실험에서 양성 대조군으로서 작용하며, 이는 표적 부위가 CHO 23-24 뉴클레아제에 의해 커팅되는 경우에 GFP가 여전히 생산될 수 있다는 것을 명확하게 보여준다. 새로운 뉴클레아제는 TRC 1-2 x.87EE와 비교해서 Off1 및 Off2 표적 부위에 대항하여 현저하게 개선된 (즉, 증가된) 차별을 명확하게 보여주며, %GFP는 TRC 1-2 bs 음성 대조군과 거의 동등한 수준으로 나타난다 (도 5a-5c).

[0281] TRC 1-2.L1469, L.1592, L.1775, 및 L.1843 조작된 메가뉴클레아제의 효능은 또한, 메가뉴클레아제 mRNA를 TRC 1-2 세포 내로 도입한 후 2, 5 및 7일에 시간 의존적 방식으로 결정되었다. 이러한 연구에서는, TRC 1-2 세포 (1.0x106개)를, 제조업체의 지침에 따라 바이오래드(BioRad) 유전자 펄서 X셀을 사용하여 세포 당 1x106개 카피의 메가뉴클레아제 mRNA로 전기천공시켰다. 형질감염 후 48시간에, GFP 양성 세포의 백분율을 결정하기 위해 유동 세포계수법에 의해 세포를 평가하였다. CHO 23/24 메가뉴클레아제가 또한, 양성 대조군으로 각각의 시점에 포함되었다. 각각의 메가뉴클레아제는 CHO 23-24와 비교하여 거의 동등한 GFP 양성 백분율을 나타냈다 (도 6 및 도 7). L.1469만이 GFP 양성 세포에서 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 명확하게 보여주었으며, 이는 후속 최적화에서 개선된 해결되지 않은 일부 독성 문제가 있다는 것을 나타낸다. 나머지 뉴클레아제는 CHO 23-24 대조군과 동등하거나 더 높은 수준에서 시간이 지남에 따라 안정하거나 증가하는 GFP 양성 세포를 나타냈다.

[0282] 연장된 iGFFP 검정은 또한, 7일 기간에 걸쳐 2가지 오프 타겟인 Off1 및 Off2에 대항한 차별을 위해 동일한 군의 메가뉴클레아제를 평가하는 데 사용되었다. 이러한 경우, Off1 또는 Off2 및 CHO 23-24를 함유하는 세포를, 제조업체의 지침에 따라 바이오래드 유전자 펄서 X셀을 사용하여 세포 당 1x106개 카피의 메가뉴클레아제 mRNA로 전기천공시켰다. 형질감염 후 2일, 5일 및 7일에, GFP 양성 세포의 백분율을 결정하기 위해 유동 세포계수법에 의해 세포를 평가하였다. CHO 23-24 메가뉴클레아제가 또한, 양성 대조군으로서 각각의 시점에 포함되었다. 각각의 뉴클레아제는 TRC 1-2x.87EE와 비교해서 오프 타겟에 대항하여 개선된 차별을 보여주었다 (도 8a 및 8b). L.1592는 모의 대조군 세포와 거의 등등한 Off1 또는 Off2의 최소 커팅을 나타내었다. L.1469는 Off1 및 Off2의 일부 검출가능한 커팅을 보여주었지만, TRC 1-2x.87EE에 의해 관찰된 것보다 훨씬 더 낮았다. L.1775 및 L.1843은 오프 타겟에 대항한 차별에 있어서 그의 모 L.1469보다 개선된 것으로 나타난다.

[0283] 4. 올리고 포획 검정 및 오프 타겟 커팅의 분석

[0284] 이들 연구에서, 올리고 포획 검정은 TRC 1-2 메가뉴클레아제에 의해 유도된 오프 타겟 커팅을 확인하기 위해 사용되었다. GUIDE-seq와 유사하게, 올리고 포획 검정은 세포의 게놈 DNA 내의 파괴 부위에서 올리고뉴클레오티드를 포획함으로써 TRC 1-2 메가뉴클레아제에 의해 생산된 잠재적인 오프 타겟 부위를 확인한다. GUIDE-seq는 CRISPR-Cas9 생성된 DNA 파괴를 위해 개발되었으며, 이러한 기술을 본 뉴클레아제에 적용하기 위해 화학 및 분석에 대한 몇 가지 주요 변형이 있다. CRISPR-cas9와 달리, 본 발명의 조작된 메가뉴클레아제는 4개의 염기쌍

3' 오버행을 생성한다. 이러한 차이를 수용하기 위해, 올리고 포획에 사용된 올리고뉴클레오티드는 TRC 1-2 메가뉴클레아제로 생성된 오버행과 화합성일 수 있는 4개의 염기쌍 오버행을 무작위로 배정하였다. 평활 말단이 아니라 점착성 말단을 라이게이션하는 효율이 더 높기 때문에 더 높은 삽입 빈도가 관찰된다. 세포를 뉴클레아제를 코딩하는 mRNA 및 이중 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드로 형질감염시켰다. 2일 후, 이들 세포로부터 게놈 DNA를 단리하고 초음파 처리하여 DNA를 더 작은 크기로 전단하였다. 올리고뉴클레오티드 어댑터를 상기 전단된 DNA에 라이게이션하고 PCR을 사용하여, 한쪽 말단에 어댑터를 함유하고 다른 쪽 말단에 포획된 올리고뉴클레오티드를 함유하는 임의의 DNA 조각을 증폭시켰다. 이와 같이 증폭된 DNA를 정제하고 표준 상용 키트를 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 제조하였다.

[0285] V2 2x150 키트를 사용하여 일루미나(Illumina) MiSeq 상에서 시퀀싱 라이브러리를 실행하였다. 데이터를 필터링하고, 올리고뉴클레오티드를 포획한 유효한 부위에 대해 분석하며, 잠재적인 오프 타겟 부위를 예측한다. 여기에서 다시, 프로토콜은 CRISPR-cas9에 대해 사용된 PAM 검색에서 TRC 1-2 메가뉴클레아제 검색으로 조정할 필요가 있었다. 개발된 소프트웨어는 각각의 서열을 체크하여, 그것이 유효한 판독물인지를 검증하기 위해 서열에 플랭킹된 포획된 올리고 및 어댑터가 있는지를 확인한다. 상기 소프트웨어는 또한, PCR 중복을 체크하고 동일한 판독물을 제거하여 PCR 편향을 감소시키는 데 도움을 준다. 서열 판독물을 참조 게놈에 정렬하고, 수천개의 염기쌍 창 내의 분류된 서열을, 잠재적 TRC 1-2 메가뉴클레아제 부위에 대해 스캐닝하였다.

[0286] 각각의 TRC 1-2 메가뉴클레아제는 연결된 이량체이다. 각각의 단량체는 2개의 절반 부위 사이의 중앙에 4개의 염기쌍 스페이서가 있는 9개의 염기쌍 절반 부위를 인식한다. 소프트웨어는 허용된 갭이 없는 각각의 절반 부위에 대해 가장 가까운 서열 매치를 찾는다. 중간 4개의 염기쌍은 오프 타겟 선택에서 고려되지 않는데, 이는 TRC 1-2 메가뉴클레아제가 일반적으로, 표적 부위 내의 이러한 위치에서 더 많은 양의 축중성을 견딜 수 있기 때문이다. 소프트웨어는 조합된 절반 부위에서의 염기 미스매치 수가 있긴 하지만 중간 4개의 염기쌍 미스매치를 계수하지 않은 잠재적인 오프 타겟 부위의 목록을 출력한다. 상기 소프트웨어는 6개 초과의 염기쌍이 미스매치된 것으로 확인된 임의의 오프 타겟을 제거하는 CRISPR-Cas9와는 달리, 임의적인 미스매치 필터에 기반하여 임의의 오프 타겟을 제거하지 않는다. 대신, 게놈 내의 취약한 지점 또는 핫스팟에서 올리고의 무작위 포획으로부터 생성된 배경 소음을 2가지 방식으로 감소시킬 수 있다. 첫째, 미처리된 모의 샘플을 또한, 올리고 포획를 통해 실행하고, 존재하는 뉴클레아제가 없는 통합 부위의 창은 뉴클레아제 함유 샘플로부터 공제될 수 있다. 본 발명자들은 또한, 검정을 삼중으로 실행하고 3회 반복 중 적어도 2회에서 반복되지 않는 임의의 부위를 제거하는 것이, 무작위 통합 소음을 실증적으로 제거하는 좋은 방식이라는 것을 발견하였다.

[0287] 판독물 계수는 특정한 부위에서의 커팅 빈도와 직접적인 상관이 없지만, 일반적으로 더 자주 발생하기 때문에 잠재적으로 더 우려되거나 더 유효한 오프 타겟을 강조 표시할 수 있다. 잠재적으로 유효한 오프 타겟 부위의 수의 측정 기준으로서 올리고 포획 데이터를 그래픽으로 시각화하는 한 가지 방식이 도 9에 도시된다. 특정한 뉴클레아제에 의해 생성된 각각의 오프 타겟은 그 부위에서 포획되는 프로브 올리고에 대한 독특한 서열 판독물의 수를 근거로 하여 플로팅된다. 의도된 부위는 가장 높은 판독물 계수를 가져야 하며, 이는 시험된 모든 TRC 1-2 메가뉴클레아제에 대해 그러하다. 더 나은 뉴클레아제는 더 높은 계수의 부위를 제거하고 플롯의 맨 왼쪽에서 배경 소음 위에 더 적은 점을 갖는다. 이러한 플롯을 사용하면, 예를 들어, TRC 1-2L.1592가 제1 세대 TRC 1-2x.87EE보다 더 높은 판독물 계수 부위를 더 많이 제거하는 것이 명백하다.

[0288] 부가의 시각화 방법을 사용하면, 본 발명자들은 특정한 부위에서 회수된 판독물의 수의 관점에서 뿐만 아니라 추정상의 오프 타겟 부위와 의도된 부위 간의 미스매치의 수에 의해 올리고 포획 데이터를 볼 수 있게 된다. 이를 통해, 무작위 통합 또는 시퀀싱 소음과 비교 시 실제 올리고 통합 부위를 보다 정확하게 결정할 수 있다. 도 10에서, 오프 타겟 부위는 X 축에 정렬된 판독물의 수에 따라 플로팅되며, 의도된 부위와 비교해서 미스매치된 염기쌍의 수는 색상으로 표시되며, 더 어두운 색상은 오프 타겟 부위와 의도된 결합 부위 간의 전반적인 매치가 더 가깝다는 것을 나타낸다. 박스는 신뢰도가 가장 높은 영역을 나타낸다. 이러한 박스 내의 오프 타겟은 정렬된 판독물 계수가 높거나 또는 의도된 부위와 매우 높은 유사성을 가지므로, 그 부위가 배경 소음이 될 가능성이 감소된다. 신뢰 영역 내의 부위를 비교하면, 도 10은 TRC 1-2x.87 EE와 비교해서, 최적화된 메가뉴클레아제, 및 특히 TRC 1-2L.1592의 증가된 특이성을 명확하게 보여준다. TRC 1-2L.1592는 더 높은 판독물 계수 부위의 수가 감소할 뿐만 아니라 의도된 것과 더 유사한 부위가 감소한다는 것을 보여준다.

[0289] 실시예 2

[0290] 최적화된 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 시험관내 분석

[0291] 1. 유전자 편집 효율, 편집 후 확장, 및 분화의 평가

[0292] 첫 번째 일련의 실험에서는, 4개의 최적화된 제2 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제를 유전자 편집 효율, 및 편집 후 확장 및 분화 잠재력에 관하여 스크리닝하였다. 3가지 상이한 작동인자 각각은 상이한 건강한 인간 T 세포 공여자로부터 수득된 T 세포 내의 모든 뉴클레아제 변이체를 평가하였다. 성분채집술 물질은 키 바이오로직스(Key Biologics; 미국 테네시주 멤피스)로부터의 공여자 K708, K799 및 K6784로부터 공급되었다. K708 및 K6784 T 세포는 하기 프로토콜에 따라 프로세싱되었다: 인간 CD3 양성 선택 시약 [스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies)]을 사용한 T 세포 강화, 이뮤노컬트(ImmunoCult) 항-CD2/CD3/CD28 (스템셀 테크놀로지스)을 사용한 자극 및 4D 뉴클레오펙터(NucleoFEctor) [론자(Lonza)]를 사용한 뉴클레아제 RNA 전달. K799로부터의 T 세포는 하기 프로토콜에 따라 프로세싱되었다: CD4 및 CD8 마이크로 비드 및 CliniMACS 세포 단리기 [밀테니이 바이오텍(Miltenyi Biotec)]를 사용한 T 세포 강화, 트랜스액트(TransAct) (밀테니이)를 사용한 자극, 및 맥스사이트(MaxCyte)-GT를 사용한 뉴클레아제 RNA 전달.

[0293] 4개의 최적화된 뉴클레아제 변이체 (TRC 1-2L.1496, L.1592, L.1775, 및 L.1843)의 편집 효율, 확장 및 분화를 전구 뉴클레아제 TRC 1-2x.87EE 및 모의 전기천공시킨 T 세포와 비교하였다. 이뮤노컬트/트랜스액트로 초기 자극 후 3일에, T 세포를 수거하고, 뉴클레아제 중 하나를 코딩하는 RNA로 전기천공하며, TRC 1-2 절단 부위 내로 삽입될 CAR 유전자를 코딩하는 AAV6 벡터로 즉시 형질 도입하였다. AAV를 투여받지 않은 대조군 배양물은 병렬로 어셈블리되었다.

[0294] 편집 후 제4일 및 제8일에, 뉴클레오카운터(NucleoCounter) NC-200 [케모메텍(ChemoMetec)]을 사용하여 총 배양 세포성을 결정하였다. 편집 효율은 인간 CD3-PE [바이오레젠드(BioLegend) 클론 UCHT1] 및 항-FMC63scFv-알렉사플루오르647 (자가 생산되고 접합된 신규 클론)에 대항하여 유도된 항체로 배양 샘플을 염색함으로써 결정되었다. 분화는 CD4-BV786 (클론 OKT4 바이오레젠드), CD8-BV711 (클론 RPA-T8, 바이오레젠드), CD62L-BB515 [클론 SK11 BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)], 및 CD45RO-PE/Cy7 (클론 UCHL1, 바이오레젠드)을 사용하여, CD4 구획과 CD8 구획 둘 다에서 중심 기억, 과도기 기억 및 이펙터 기억 세포의 빈도를 비교함으로써 평가되었다.

[0295] 이러한 실험의 결과가 도 11에 요약되어 있다. 내인성 T 세포 수용체의 녹아웃 빈도 (CD3 양성 표현형에서 CD3 음성 표현형으로 전환하는 T 세포에 의해 측정됨)는 3명의 상이한 공여자에서 각각의 뉴클레아제에 대해 결정되었다. 시험된 (및 두 세포 제조 방법을 사용한) 3명의 공여자 모두에 대해, TRC 1-2L.1592와 L.1775 둘 다는 TRC 1-2x.87EE와 유사하거나 더 높은 효율로 녹아웃 세포를 생성하였다. 이에 비해, L.1469와 L.1843은 더 낮은 녹아웃 빈도를 생성하였다. 이것은 시험된 3명의 공여자 모두에게 해당된다. L.1775는 L.1592보다 약간 더 높은 편집 효율을 명확하게 보여주었다. TRC 1-2 인식 서열의 편집 증가는 CAR 유전자의 증가된 삽입 속도와 연관이 있었다. 3명의 공여자 모두에서, L.1592 및 L.1775는 동등하거나 우수한 편집 및 삽입 빈도를 지원하였다.

[0296] 편집 후 제8일에, 세포 계수 데이터를 사용하여 CAR T 세포 배수 확장을 계산하였다. 모든 3명의 공여자 전반에 걸쳐, L.1592, L.1775 및 L.1843은 x.87EE보다 더 큰 전기천공 후 확장을 촉진시켰다. 대조적으로, L.1469는 x.87EE보다 덜한 확장을 촉진시켰다. 3명의 공여자 중 2명에서, L.1843은 3가지 최적화된 뉴클레아제의 가장 광범위한 확장을 허용하였다. L.1775는 공여자마다 다른 정도의 확장을 지원하였다.

[0297] CD4:CD8 비율과 기억 서브세트 데이터가 또한, 편집 후 제8일에 포획되었다. L.1592, L.1775 및 L.1843은 전형적으로 더 큰 빈도의 CD4+ 세포를 초래하였지만, x.87EE와 비교해서 CD4:CD8 비율에 대한 주요 섭동은 최적화된 뉴클레아제 중 어떠한 것으로부터도 관찰되지 않았다. x.87EE와 비교해서, L.1469로 편집된 세포에서는 중심 기억으로부터 멀어지고 과도기 및 이펙터 기억 집단으로의 더 큰 정도의 분화가 관찰되었다. 대조적으로, L.1592, L.1775 또는 L.1843으로 편집될 때 동등하거나 더 큰 빈도의 세포가 중심 기억 표현형을 유지하였다.

[0298] 이러한 연구는 4개의 최적화된 뉴클레아제 중 3개가 편집 효율, 세포 확장 및 분화 특징의 관점에서 TRC 1-2 x.87EE를 능가하였다는 것을 보여준다. 하나의 뉴클레아제인 L.1469는 x.87EE만큼 잘 수행되지 않았다. 시험관내 기능이 개선된 3가지 변이체 중 변이체 L.1775는 배양물 중의 편집된 세포의 가장 높은 빈도를 지원하지만, 편집 후 확장의 가장 적은 양을 지원하고 배양물 중의 T 세포의 분화를 가속화한다. 변이체 L.1843은 가장 많은 양의 편집 후 확장을 허용하고, 유리한 중심 기억 빈도를 유지하지만, 녹아웃 빈도의 관점에서는 L.1775 또는 L.1592보다 덜 효율적이다. 놀랍게도, L.1592는 이들 기준 3가지 모두를 사용하여 제1 세대 x.87EE에 비해 개선된 것으로 나타난다.

[0299] 2. 올리고 포획 검정 및 오프 타겟 커팅의 분석

[0300] 올리고 포획은 앞서 실시예 1에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 3명의 공여자 각각으로부터 수득된 T 세포의 3가지 복제물에 대해 수행되었다. 올리고 포획의 결과가 도 12에 도시되어 있다. 점은 각각의 추정상의 오프타겟 부위뿐만 아니라 의도된 표적 부위에서 회수된 시퀀싱 판독물의 수를 나타낸다. 7개 초과의 미스매치를 가진 부위가 이전 연구에서 TRC 1-2L.1592에 의해 절단되는 것으로 나타나지 않았기 때문에, 의도된 표적과 7개 초과의 미스매치를 가진 추정상의 부위를 제거하였다. 각각의 샘플에 대한 의도된 표적 부위는 원으로 강조 표시된다. 의도된 표적과 비교해서 미스매치의 수는 각각의 원의 어두움으로써 표시되며, 불일치가 더 적을수록 더 어두운 색상을 갖는다. 플롯은 모의 배경을 제거하지 않고 회수된 판독물의 총 수에 있어서의 차이를 설명하기 위해 샘플 당 독특한 판독물의 수로 정규화된 판독물 계수를 사용한 올리고 포획 데이터를 나타낸다. 도시된 바와 같이, TRC 1-2L.1592는 CAR T 세포 집단에서 편집 및 표적화된 삽입을 위해 사용될 때 의도된 것과 더 유사한 부위의 수가 적을뿐만 아니라 더 높은 판독물 계수 부위의 수가 적다는 것을 나타낸다.

[0301] 3. 편집 효율, 확장 및 시토카인 분비에 대한 시험관내 연구

[0302] 두 번째 일련의 시험관내 연구에서, 제2 세대 최적화된 TRC 1-2 메가뉴클레아제를, T 세포를 편집하는 데 있어서의 효율, 편집된 T 세포가 편집 후 확장할 수 있는 능력, 및 뉴클레아제 변이체로 생성된 CAR T 세포가 항원 보유 표적 세포와 직면하여 반응할 수 있는 능력에 관하여 평가하였다.

[0303] 성분채집술 물질은 키 바이오로직스 (미국 테네시주 멤피스)로부터의 공여자 K708로부터 공급되었고, T 세포는 인간 CD3 양성 선택 시약 (스템셀 테크놀로지스)을 사용한 강화시켰으며, 이뮤노컬트 항-CD2/CD3/CD28 (스템셀 테크놀로지스)을 사용하여 자극하였고, 4D 뉴클레오펙터 (론자)를 사용하여 뉴클레아제 RNA를 전달하였다. 삼중 샘플을 병렬로 실행하였다.

[0304] 3가지 최적화된 메가뉴클레아제 (TRC 1-2L.1592, L.1775, 및 L.1843)의 편집 효율, 확장 및 분화를 전구 뉴클레아제 TRC 1-2x.87EE 및 모의 전기천공시킨 T 세포와 비교하였다. 이뮤노컬트/트랜스액트로 초기 자극 후 3일에, T 세포를 수거하고, 뉴클레아제 중 하나를 코딩하는 RNA로 전기천공하며, TRC 1-2 절단 부위 내로 삽입될 CAR 유전자를 코딩하는 AAV6 벡터로 즉시 형질 도입하였다. 편집 후 제4일 및 제8일에, 베크만 쿨터 (Beckman-Coulter) 시토FLEX-LX 유동 세포계수기를 사용하여 편집 효율 및 확장을 결정하기 위해 배양물을 샘플링하였다. 항-CD3-PE (바이오레젠드 클론 UCHT1)를 사용하여 내인성 T 세포 수용체 녹아웃 효율을 평가하였고, 항-FMC62scFv-알렉사플루오르647 (자가 생산되고 접합된 신규 클론)을 사용하여 CAR 녹인을 측정하였다.

[0305] 증식, 세포독성 및 시토카인 생산은 CAR T 세포를 CD19+ 종양 주 라지(Raji) 또는 Nalm6과 함께 1:1 및 1:2의 E:T 비율로 공동 배양함으로써 평가하였다. CD19 음성 K562 골수성 백혈병 세포가 대조군으로서 사용되었다. 배양 상청액을 수집하고, 루미넥스(Luminex) MAGPIX 기기 및 밀리플렉스(MilliPlex) MAP 15-플렉스 비드 세트 [밀리포어(Millipore)]를 사용하여 분비된 시토카인에 관하여 분석하였다. 증식 및 표적 사멸은 항-CD4-APC (바이오레젠드 클론 OKT4), 항-CD8-FITC (바이오레젠드 클론 RPA-T8), 및 항-CD19-PE (바이오레젠드 클론 HIB19)로 배양 세포 샘플을 염색하고, 시토FLEX-LX를 사용하여 세포 계수와 함께 형광 데이터를 획득함으로써 평가하였다.

[0306] RNA 없이 전기천공된 T 세포 (모의 대조군)와 비교해서, 제8일에 총 배양 세포성은 TRC 1-2 메가뉴클레아제 x.87EE 및 L.1775로 편집된 T 세포에 대해 대략 50% 감소되었다 (도 13a). L.1592 또는 L.1843으로 편집된 배양물은 이러한 정도까지 총 배양 세포성 감소를 나타내지 않았다. 편집 효율을 고려하고 프로세스에서 생성된 편집된 세포의 총 수를 계산할 때, L.1592가 가장 많은 TCR 녹아웃 세포를 생성하였다 (도 13b). 변이체 x.87EE 및 L.1775는 거의 동등한 수의 편집된 세포를 생성한 반면 L.1843은 가장 적은 수를 생성하였다. 이러한 패턴은 또한, 배양물 중의 CAR+/TCR- 세포의 수를 측정할 때 관찰되었다 (도 13c).

[0307] CAR T 세포를 항원 보유 표적 세포와 공동 배양할 때, TRC 1-2 x.87EE로 생산된 CAR T 세포는 입력 수보다 거의 3배 확장되었다 (가로 파선으로써 규정됨 - 도 14). 놀랍게도, 최적화된 뉴클레아제로 생산된 CAR T 세포는 x.87EE보다 훨씬 더 격렬하게 증식하여, 5일 후에 10배 확장에 접근하였다. E:T 비율이 1:2로 증가하였을 때, x.87EE 및 L.1843 편집된 CAR T 세포의 증식은 1:1 비율에 비해 대략 ½ 만큼 감소되었다. 이는 L.1775 또는 L.1592를 사용하여 생산된 CAR T 세포에서는 관찰되지 않았으며, 이는 다른 TRC 1-2 뉴클레아제보다 훨씬 더 우수한 성능을 보이는 것으로 밝혀졌다 ($p < 0.0001$, 도 15a). CD19+ 라지 세포의 나머지 수를 측정하였을 때 (1:2 E:T 비율에서, 도 15b), 4가지 모든 CAR T 산물은 CAR T 세포를 받지 않은 대조군 배양물과 비교해서 90% 이상의 라지 수 감소를 명확하게 보여주었다. 최적화된 뉴클레아제를 사용하여 생산된 CAR T 세포는 x.87EE를 사용하여 생산된 세포보다 라지 세포를 상당히 더 잘 제거하였다.

[0308] 공동 배양 상청액의 분석 결과, x.87EE가 아닌 최적화된 뉴클레아제를 사용하여 CAR T 세포를 만들 때, 더 높은 수준의 이펙터 시토카인이 생산된 것으로 나타났다. L.1592 편집된 CAR T 세포는 가장 높은 수준의 IL-2, TNF α, IFNɣ 및 그랜자임 B (도 16a-16d), 및 두 번째로 높은 수준의 퍼포린을 분비하였다 (도 16e). IL-2 및 TNFα의 경우에는, x.87EE 편집된 CAR T 세포와 L.1592 편집된 CAR T 세포의 시토카인 생산 간의 차이가 2 내지 3배인 반면, 다른 모든 차이는 사소하였다.

[0309] 전반적으로, 최적화된 TRC 1-2 메가뉴클레아제 L.1775, L.1592, 및 L.1843은 x.87EE보다 기능적으로 우수하였다. 이는 CAR T 세포의 제조를 지원할 수 있는 뉴클레아제의 상대적 능력 (도 13) 뿐만 아니라 표적 항원과 직면하여 반응할 수 있는 CAR T 세포의 능력 (도 14-16)의 관점에서 사실이었다. 여러 실험을 통해, L.1775는 일반적으로 가장 높은 편집 효율 (녹아웃 빈도)을 지원하였고 L.1843은 편집 후 T 세포의 가장 큰 확장을 허용하였지만, L.1592는 두 번째로 높은 편집 효율과 가장 높거나 또는 두 번째로 높은 확장을 조합하여 가장 높은 전반적 수의 CAR T 세포를 생성하였다. 중요하게도, L.1592로 생산된 CAR T 세포는 다른 최적화된 메가뉴클레아제에 비해 기능적 이점 (증식, 표적 세포 사멸 및 시토카인 생산)을 표시하였다.

[0310] 4. 최적화된 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 시험관내 체류 시간

[0311] 최적화된 제2 세대 TRC 1-2 메가뉴클레아제가 제1 세대 TRC 1-2x.87EE보다 시험관내 체류 시간이 더 짧은 지를 결정하기 위한 연구가 추가로 시행되었다. 더 짧은 체류 시간은 유전자 편집 및 오프 타겟 커팅에 있어서의 잠재적 감소와 관련하여 유리할 수 있다.

[0312] 이들 연구에서는, T 세포를 CD4 및 CD8 마이크로 비드 및 LD 컬럼 (밀테니이)을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포의 자기 강화에 의해 성분채집술 산물 (키 바이오로직스)로부터 수득하였다. 세포를, 5% FBS [GE 하이클론(GE Hyclone)], 10 ng/ml IL-2 [셀제닉스(Cellgenix)], 및 1% 항생제/항진균제 용액 [깁코(Gibco)]을 함유하는 쉬르(Xuri) 배지 (GE)에서 항-CD3/항-CD28 트랜스액트 시약 (밀테니이)으로 3일 동안 활성화시켰다. 이어서, 세포를, 맥스사이트 전기천공 시스템을 사용하여 TRC 1-2x.87EE 또는 TRC 1-2L.1592 뉴클레아제를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA (트릴링크), 1e6개 세포 당 1 ug의 mRNA로 전기천공시켰다. 세포를, 30 ng/ml IL-2 및 1% 항생제/항진균제 용액을 함유하는 무 혈청 쉬르 배지에서 상동 재조합 [SAB 테크(SAB Tech)]에 의해 TRC 1-2 부위에 삽입하도록 설계된 항-CD19 키메라 항원 수용체를 코딩하는 공여자 주형을 운반하는 재조합 AAV6 벡터로 후속적으로 형질 도입하였다. 전기천공 후 6시간에, 샘플을 정량화하고 5% FBS, 30 ng/ml IL-2 및 1% 항생제/항진균제 용액을 함유하는 쉬르 배지에 재현탁하였다. 96시간 시점에서, LD 컬럼, CliniMACS 완충액 및 CD3 마이크로 비드 (밀테니이)를 사용하여 자기 고갈에 의해 TRC 전기천공된 군으로부터 잔류 미편집된 CD3+ T 세포를 제거하였다. 이어서, 세포를 나머지 실험 동안 37℃에서 쉬르 배지 + 5% FBS/1% 항-항 + 10 ng/ml IL-15 및 IL-21에서 배양하였다.

[0313] 전기천공 후 6시간, 24시간, 48시간, 96시간 및 168시간에, T 세포 샘플을 정량화하고 동일한 양의 생존 세포를 펠릿화하며 프로테아제 억제제 [로슈(Roche)]가 부가된 RIPA 완충액 (EMD 밀리포어)에 재현탁하고, 잘 혼합하며, 웨스턴 블롯에 대해 하기 기재되는 바와 같이 추가로 프로세싱하기 전에 30분 동안 동결 보존하거나 또는 얼음 상에서 인큐베이션하였다.

[0314] 동일한 공여자로부터의 모의 세포를 활성화하고 뉴클레아제 처리군과 동일한 배지에서 배양하며, 뉴클레아제 처리군을 전기천공시킨 후 24시간에 수거하였다.

[0315] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 용해물을 원심 분리시키고 상청액을 새로운 튜브로 옮기며 얼음 위에 놓아두었다. 단백질 농도는 BCA 검정 [피어스(Pierce)]에 의해 결정되었으며, 각각의 샘플에 대한 15 μg 총 단백질은 샘플 완충액 + DTT [누페이지(NuPage)]였고, 이를 90℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 각각의 샘플 5 μg을 겔의 각각의 웰에 부하하였다. 전기천공 후 24시간 시점으로부터의 단일 모의 샘플을 대조군으로서 사용하였다. 전기 영동 후, 샘플을 PVDF 막 [노벡스(Novex)]으로 옮겼다 (누페이지 전기 영동 시스템 및 시약). 막을 TBS-T 중의 5% 무지방 건조 우유로 차단하고 1차 항체로 염색하였다:

[0316] 블롯 1차 항체

[0317] A 토끼 폴리클로날 항 뉴클레아제, [프리시젼 바이오사이언시스(Precision BioSciences) 독점, 1:6500으로 사용됨]

[0318] B 마우스 항 B-액틴 [시그마(Sigma), 1:15000으로 사용됨]

[0319] 막을 6회 세척한 다음, 적절한 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다:

[0320] 블롯 2차 항체

[0321] A 염소 항 토끼 HRP [인비트로젠(Invitrogen), 1:50000으로 사용됨]

[0322] B 염소 항 마우스 HRP (인비트로젠, 1:75000으로 사용됨)

[0323] 세척 단계 후, 막을 ECL 프라임 [아머샴(Amersham)]에 노출시키고, 사란(Saran) 랩으로 감싸며, UVP ChemiDoc-It 815 영상화기를 사용하여 영상을 포착하였다.

[0324] 도 17에 도시된 바와 같이, 예상대로 모의 샘플에서는 뉴클레아제 발현이 검출가능하지 않았다. TRC1-2x.87EE 또는 TRC1-2L.1592 뉴클레아제를 코딩하는 mRNA로 전기천공된 샘플에서는 뉴클레아제 단백질이, 분석된 가장 빠른 시점, 즉 전기천공 후 6시간에 고도로 발현되었다. 전기천공 후 24시간에, 단백질은 검출가능한 상태로 남아 있지만; 발현은 두 뉴클레아제에 대해 전기천공 후 6시간에서보다 실질적으로 더 낮았고, 이러한 시점에서 TRC 1-2x.87EE보다 TRC 1-2L.1592에 대해 현저히 더 낮은 것으로 관찰되었다. TRC 1-2L.1592 mRNA 처리된 샘플에서는, 전기천공 후 48시간 또는 후속 시점에서 뉴클레아제 단백질이 검출가능하지 않은 반면, TRC 1-2x.87EE 단백질 발현은 이러한 시점에서 여전히 검출가능하다. 액틴 발현은 모든 샘플 및 시점 전반에 걸쳐 일관되며, 이는 각각의 샘플에 대해 동등한 양의 단백질이 부가되었음을 나타낸다.

[0325] 이들 연구는 TRC1-2x.87EE 및 TRC1-2L.1592 뉴클레아제가 mRNA의 전기천공 후 6시간에 높은 수준으로 발현되었음을 입증해 주었다. 그러나, T 세포에서의 TRC 1-2L.1592의 발현은 TRC 1-2x.87EE보다 더 빠르게 감소하였다. 도 11에서 입증된 바와 같이, TRC 1-2L.1592는 더 짧은 기간 동안 발현되긴 하였지만, TRC 1-2x.87EE와 비교해서 감소된 유전자 편집 효율을 나타내지 않는다. 발현의 지속 기간은 줄이면서 높은 유전자 편집 활성을 유지하는 것이 TRC 1-2L.1592의 바람직한 특징이며, TRC 1-2x.87EE에 비해 예상치 못한 유리한 개선을 나타내는데, 이는 이들 특성이, TRC 1-2x.87EE와 비교해서 TRC 1-2L.1592를 사용한 경우에 T 세포의 증강된 (즉, 증가된) 내약성 및 더 큰 증식 능력과, 더 낮은 오프 타겟 활성과 상관이 있기 때문이다.

[0326] 실시예 3

[0327] CAR T 생산에 있어서 최적화된 TRC 1-2 메가뉴클레아제의 평가

[0328] TRC 1-2L.1592 메가뉴클레아제를 대규모 프로세스 실행에서 추가로 평가하여, CAR T 세포의 대규모 생산이 제1세대 TRC 1-2x.87EE 메가뉴클레아제에 비해 개선되었는 지를 결정하였다.

[0329] TRC 1-2x.87EE를 사용하여 동종 이계 CAR T 세포를 생성하는 데 사용되는 대규모 프로세스는 건강한 사전 자격을 갖춘 공여자로부터의 신선한 류코팩(Leukopak)으로 시작되었다. 류코팩 산물은 표적 T 세포의 면역 자기 강화를 겪기 전에 혈소판을 제거하기 위해 세척되었다. 이어서, 강화된 T 세포를 성장 배지로 세척하고 활성화 시약을 사용하여 활성화시켰다. 3일의 활성화 기간 후, 세포를 세척하고 전기천공 완충액에서 농축시켰다. TRC 1-2x.87EE를 코딩하는 mRNA를 부가하고 세포와 mRNA의 혼합물을 전기천공 장치를 통해 프로세싱하였다. 전기천공된 세포를, CAR 삽입 유전자를 코딩하는 AAV 벡터를 함유하는 성장 배지로 희석시켰다. 확장 기간 후, 세포를 제8일에 수집하고 CD3 양성 집단의 면역 자기 고갈을 수행하였다. 고갈 후, 표적 CD3 음성 세포를 부가의 기간 동안 성장 배지에서 확장시켰다. 마지막으로, 세포를 제13일에 수집하고, 세척하며, 동결 보호 용액에 농축하고 동결시켰다. TRC 1-2L.1592를 사용하여 동종 이계 CAR T 세포를 생성하는 데 사용된 대규모 프로세스는, TRC 1-2L.1592 실행에서의 성장 배지 제형이 동물 기원 없음 (AOF)이었다는 것을 제외하고는 TRC 1-2x.87EE에 대해 기재된 바와 본질적으로 동일하게 수행되었다.

[0330] 생존 세포의 총 수는 생산 프로세스의 주요 시점에서 결정되었다 (도 18). 세포 수는 제0일부터 제8일 고갈 단계까지 거의 동등한 수준이다. 그러나, TRC 1-2L.1592의 경우에 상당히 더 높은 T 세포 수용체 녹아웃 효율로 인해, TRC 1-2L.1592 프로세스에 있어서의 고갈 단계는 유리하게, TRC 1-2x.87EE 프로세스 실행에서 회수된 세포 수의 2배를 초과하여 회수하였다. 확장 속도는 제8일과 제13일 사이에 유사하며, 제13일에 총 생존 세포가 대략 2배 더 커지게 된다.

[0331] CD3 녹아웃 효율 (즉, 내인성 T 세포 수용체의 녹아웃 지표)은 각각의 생산 실행의 제8일에 유동 세포계수법에 의해 결정되었다 (도 19). 놀랍게도, (전체 살아있는 세포 중) CD3 음성, 유전자 편집된 세포의 백분율은 TRC 1-2x.87EE 프로세스 실행보다 TRC 1-2L.1592 프로세스 실행에서 거의 20% 더 높았다.

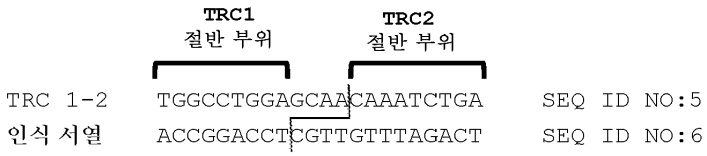
[0332] 마지막으로, CAR 녹인 효율은 각각의 생산 프로세스의 3가지 주요 시점에서 유동 세포계수법에 의해 측정되었다 (도 20). 예기치 못하게도, (CD3 음성 세포 중) CAR 양성, 형질 도입된 세포의 백분율은 TRC 1-2x.87EE 프로세스 실행에서보다 TRC 1-2L.1592 프로세스 실행에서 대략 25% 더 높다. CAR 녹인 백분율은 제8일과 제13일 프로

세스 종료 사이에 두 프로세스 모두에 대해 안정적이며, 결과적으로 TRC 1-2L.1592 프로세스 실행의 종료 시 CAR 양성 세포의 백분율이 유사하게 더 높다.

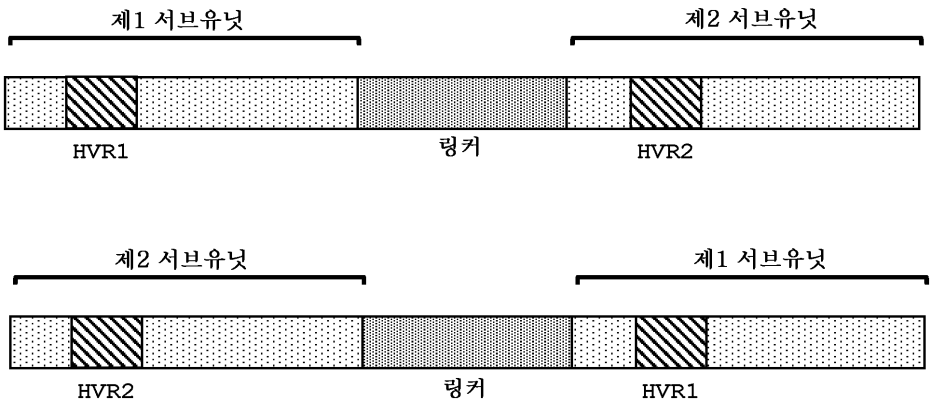
[0333] 결론적으로, 이들 연구는 놀랍게도, TRC 1-2L.1592 뉴클레아제가 최종 동종 이계 세포 요법 산물의 양뿐만 아니라 품질을 상당히 개선시켰음을 보여주었다. TRC 1-2L.1592는 내인성 T 세포 수용체를 보다 효율적으로 녹아웃시켜, 유전자 편집된 CD3 음성 세포의 더 많은 집단을 생성하여 전반적 생산 프로세스 수율을 대략 2배 개선시켰다. 부가적으로, TRC 1-2L.1592는 잠재적으로, 개선된 CAR 녹인 효율에 의해 입증된 바와 같이 표적화된 이중 가닥 파괴에서 CAR 유전자 삽입물과의 상동 재조합을 위한 개선된 환경을 제공해 준다. CAR 양성 백분율 상의 증가는 CAR 음성 세포 수를 줄이면서 의약품 순도를 상당히 더 높여 준다.

도면

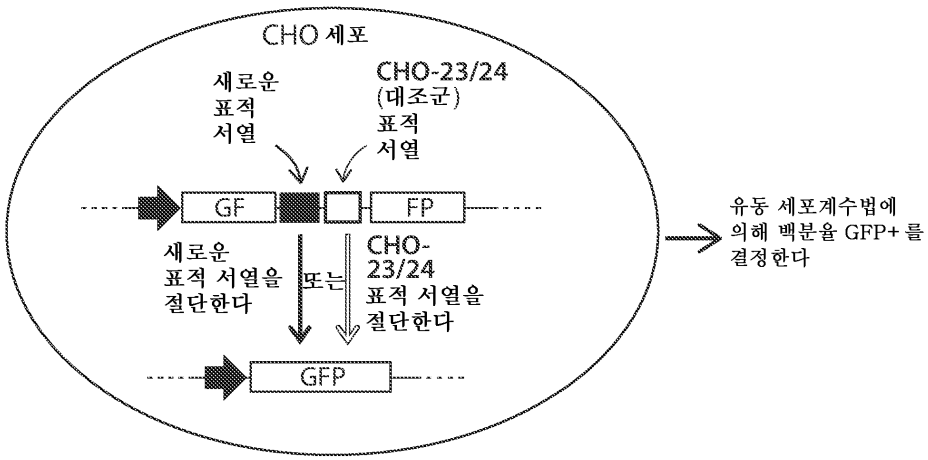
도면1



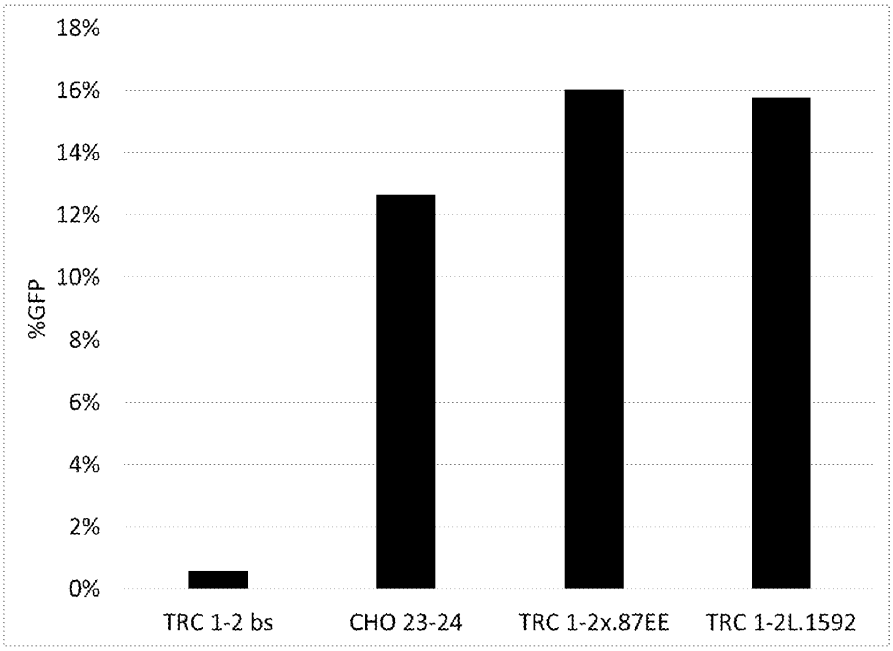
도면2



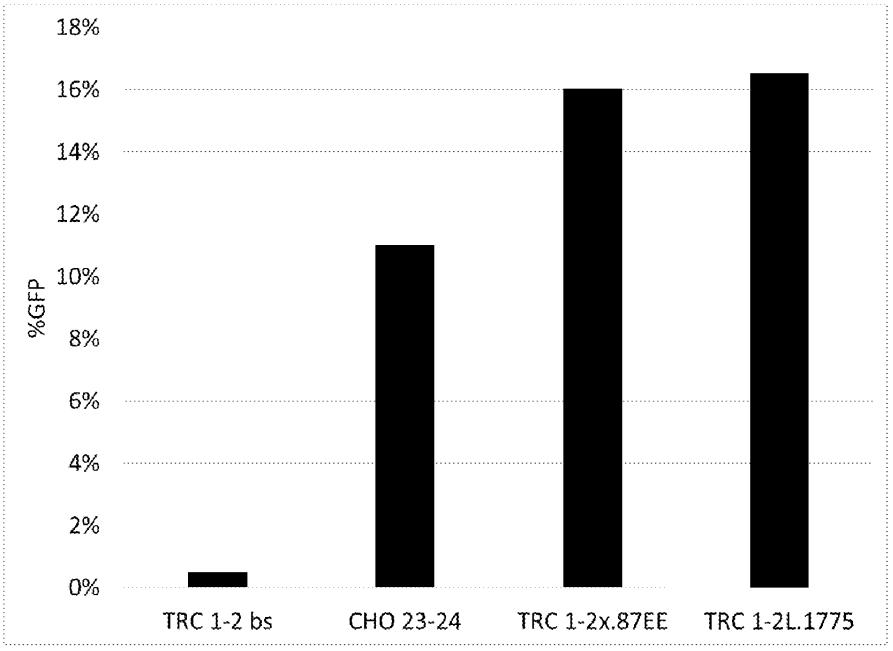
도면3



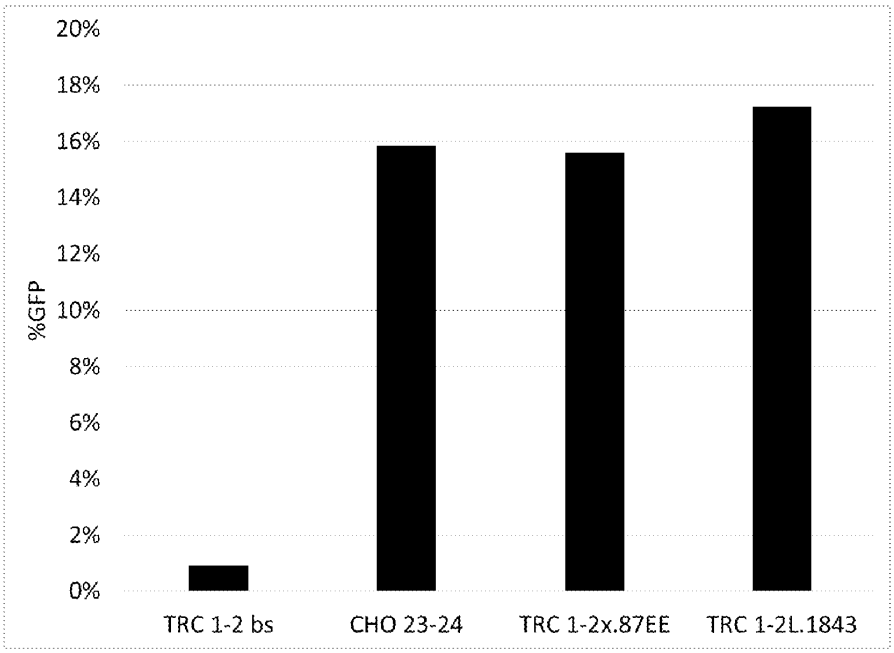
도면4a


18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
%GFP
TRC 1-2 bs
CHO 23-24
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1592

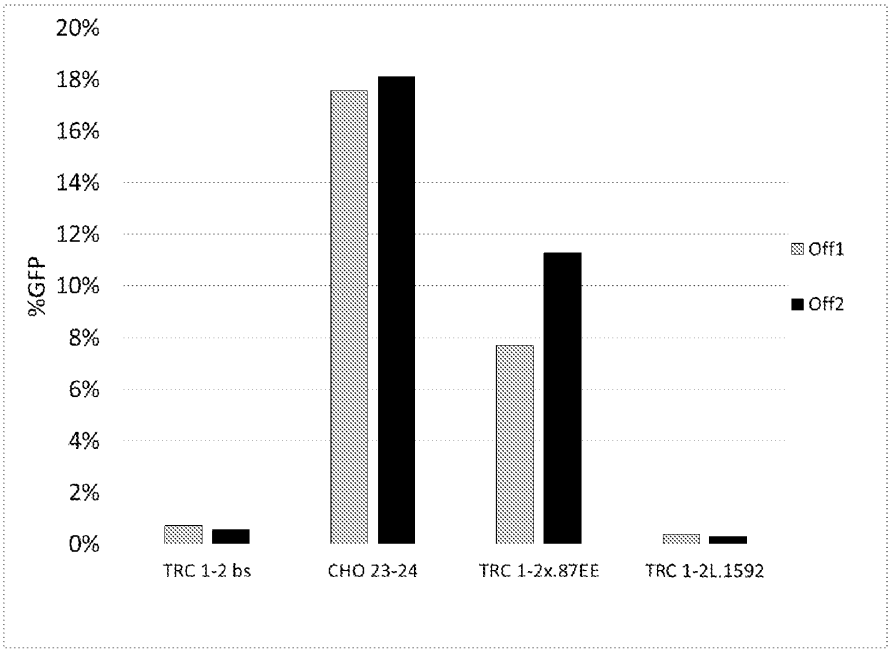
도면4b


18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
%GFP
TRC 1-2 bs
CHO 23-24
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1775

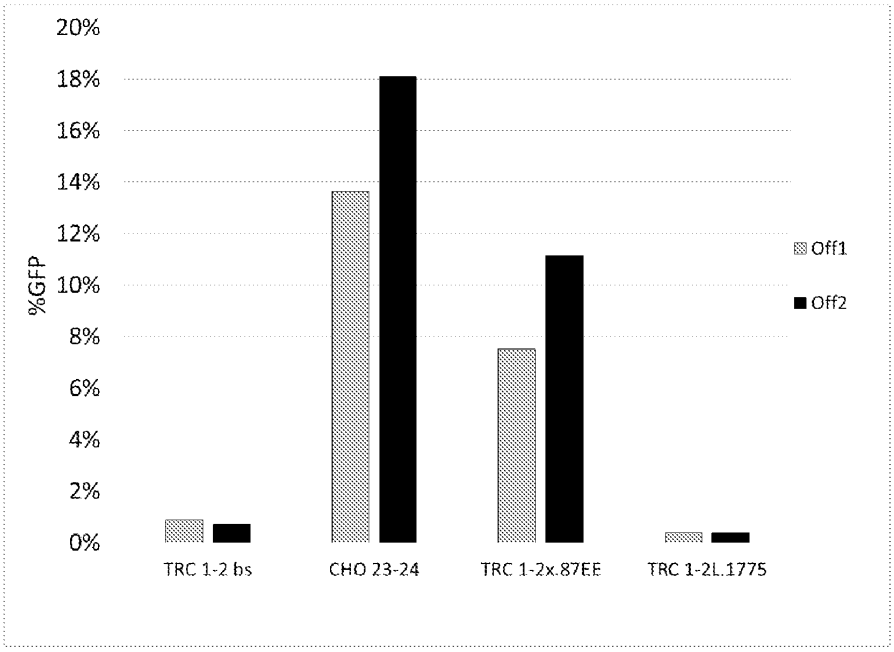
도면4c


20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
%GFP
TRC 1-2 bs
CHO 23-24
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1843

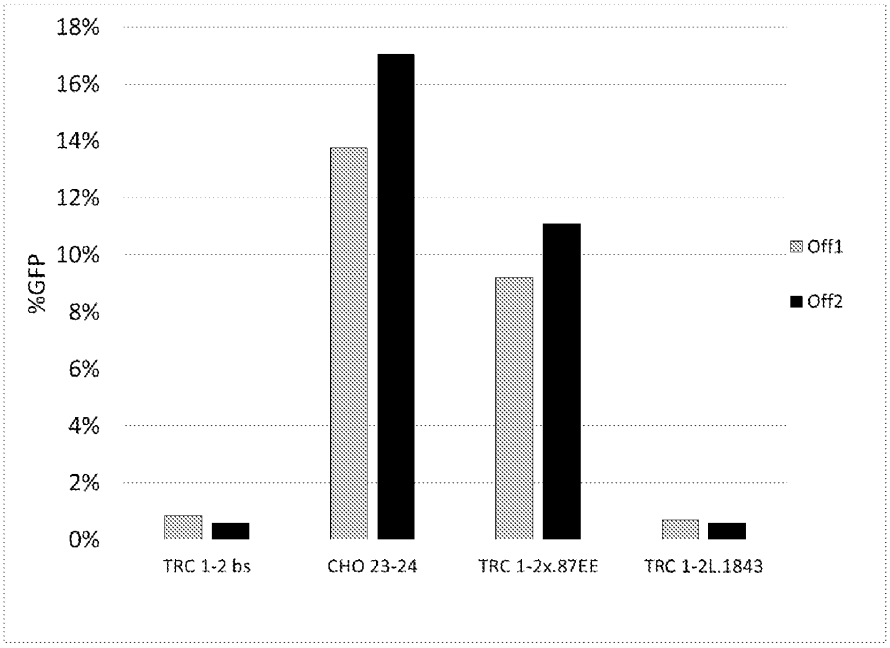
도면5a


20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
%GFP
Off1
Off2
TRC 1-2 bs
CHO 23-24
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1592

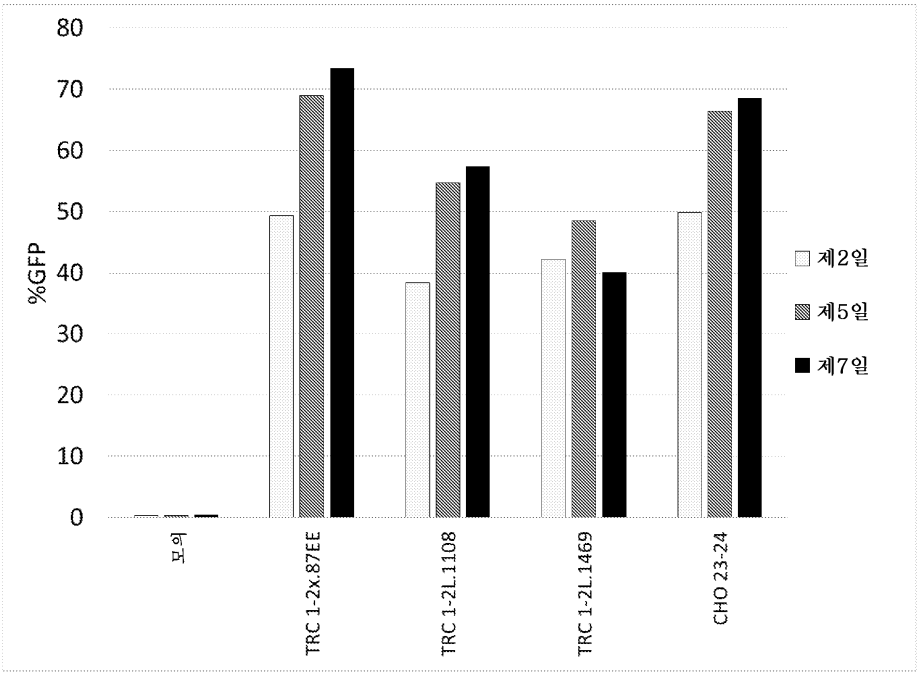
도면5b


20%
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
%GFP
Off1
Off2
TRC 1-2 bs
CHO 23-24
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1775

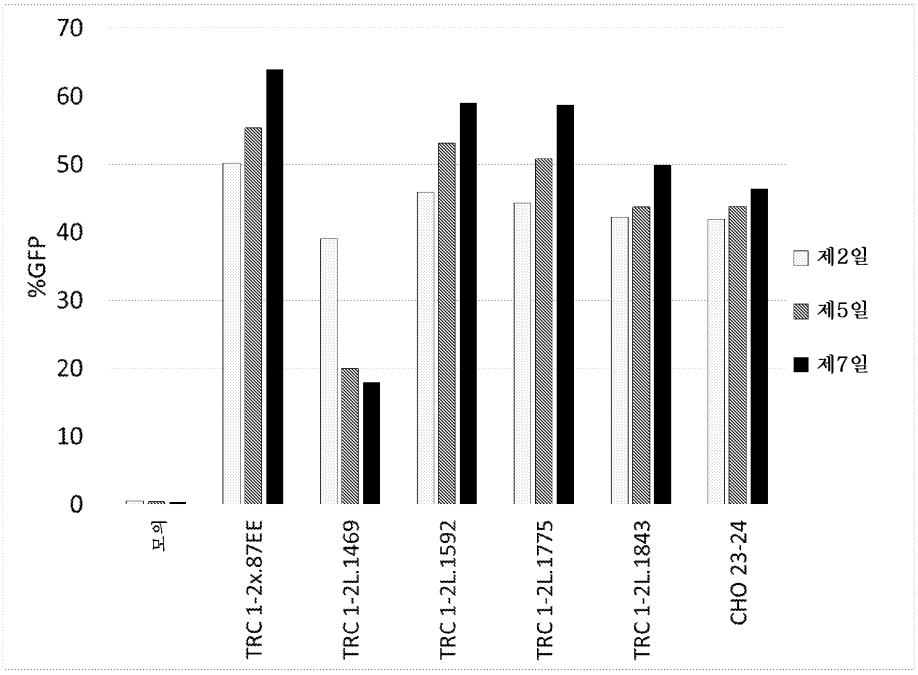
도면5c


18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
%GFP
Off1
Off2
TRC 1-2 bs
CHO 23-24
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1843

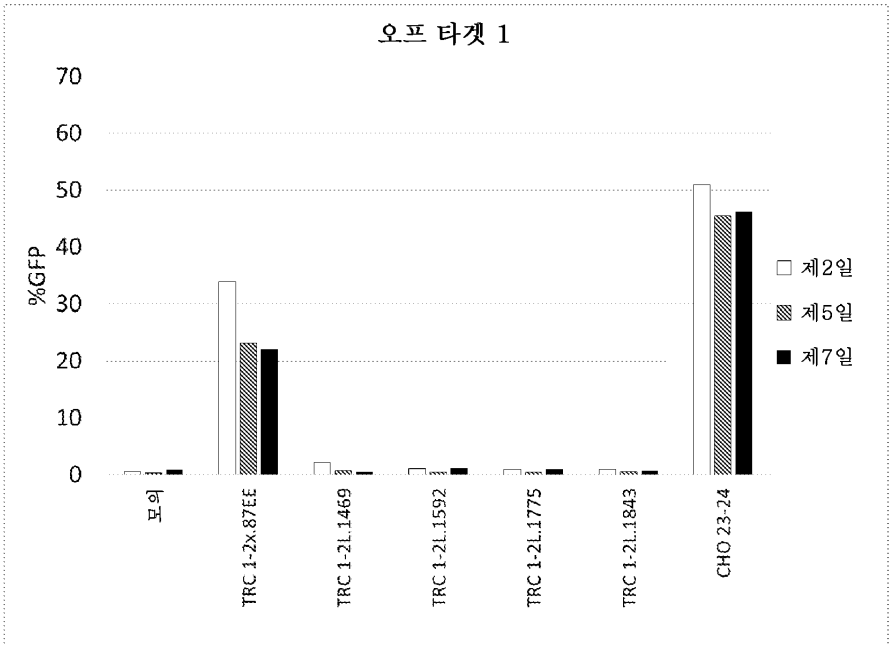
도면6


80
70
60
50
40
30
20
10
0
%GFP
모의
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1108
TRC 1-2L.1469
CHO 23-24
제2일
제5일
제7일

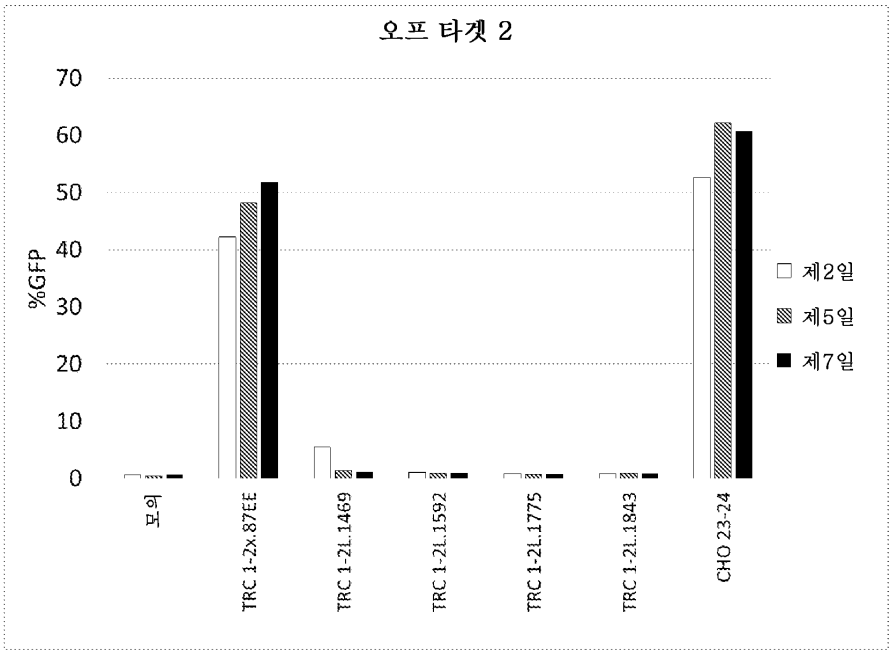
도면7


70
60
50
40
30
20
10
0
%GFP
모의
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1469
TRC 1-2L.1592
TRC 1-2L.1775
TRC 1-2L.1843
CHO 23-24
제2일
제5일
제7일

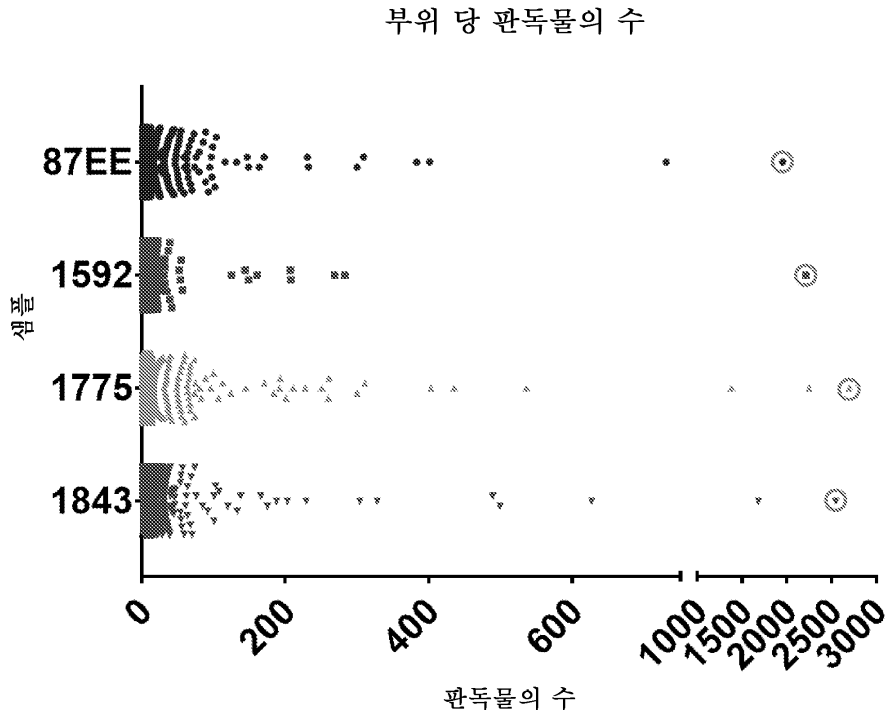
도면8a


오프 타겟 1
70
60
50
40
30
20
10
0
%GFP
모의
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1469
TRC 1-2L.1592
TRC 1-2L.1775
TRC 1-2L.1843
CHO 23-24
제2일
제5일
제7일

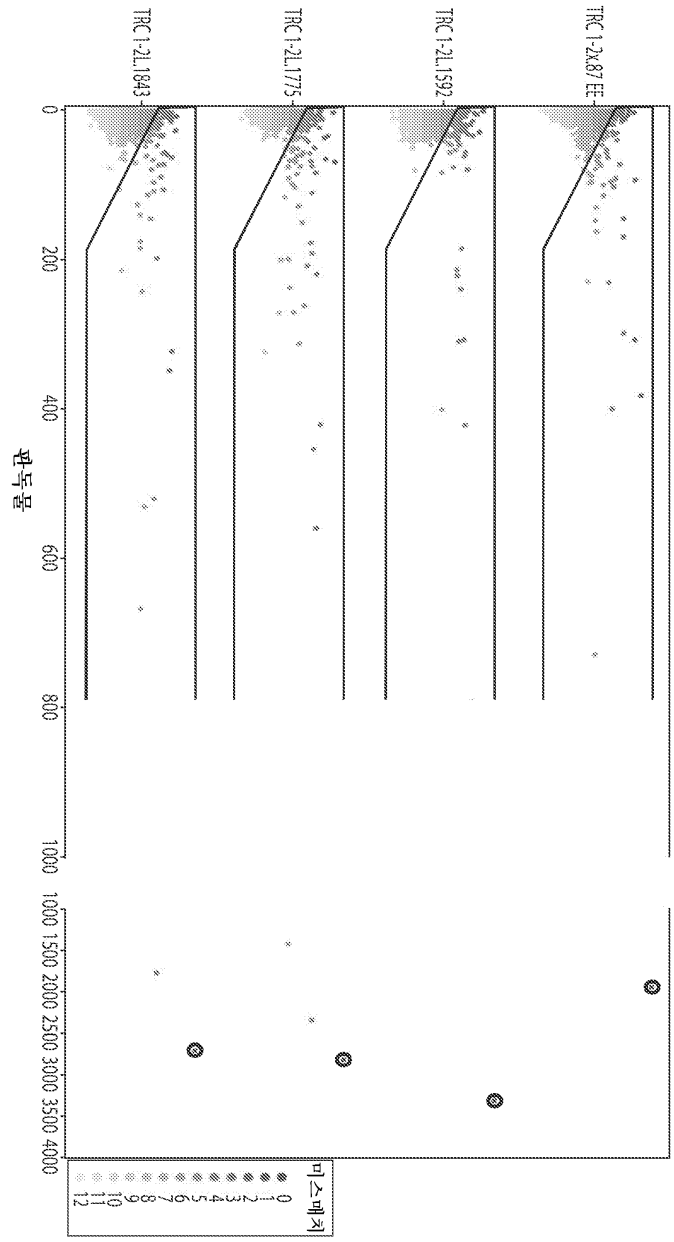
도면8b


오프 타겟 2
70
60
50
40
30
20
10
0
%GFP
모의
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1469
TRC 1-2L.1592
TRC 1-2L.1775
TRC 1-2L.1843
CHO 23-24
제2일
제5일
제7일

도면9


부위 당 판독물의 수
87EE
1592
1775
1843
샘플
0
200
400
600
1000
1500
2000
2500
3000
판독물의 수

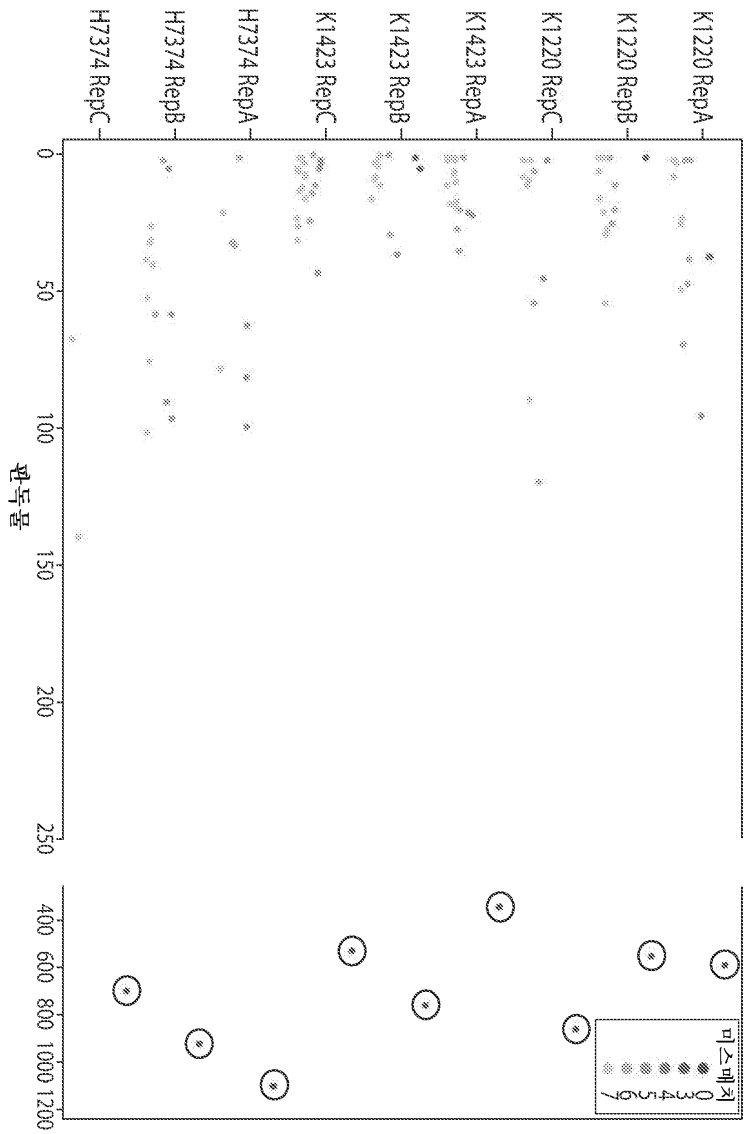
도면10


TRC 1-2L.87 EE
TRC 1-2L.1592
TRC 1-2L.1775
TRC 1-2L.1843
판독물
0
200
400
600
800
1000
1000 1500 2000 2500 3000 3500 4000
미스매치
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

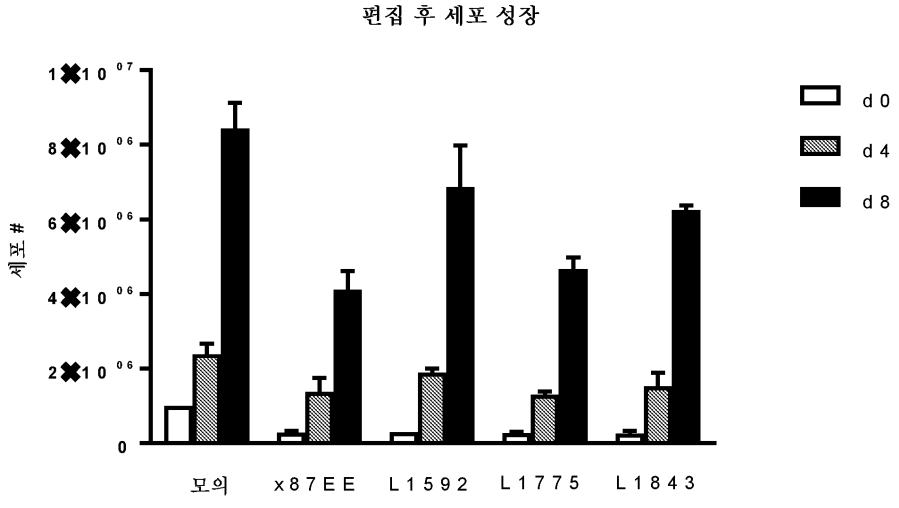
도면11

공여자	측정		뉴클레아제					
			x.87EE	L.1469	L.1592	L.1775	L.1843	모의
K708	CD3 녹아웃		65.60%	40.10%	63.90%	66.40%	45.10%	
	CD19 CAR 녹인		41.50%	21.50%	42.20%	44.40%	28.10%	
	%CAR T		63.26%	53.62%	66.04%	66.87%	62.31%	
	배수 확장		9.1	4.4	9.9	13.97	13.83	
	기억 표현형	중심	82.91%	80.51%	91.82%	90.72%	91.05%	
		과도기	13.73%	12.67%	6.13%	6.87%	6.86%	
		이펙터	1.61%	2.62%	0.73%	0.85%	0.88%	
	CD4+ CD8+ 비율	CD4+	16.46%	16.35%	23.14%	19.34%	23.40%	
		CD8+	81.05%	79.97%	74.41%	78.05%	73.97%	
K799	CD3 녹아웃		59.90%	40.50%	60.40%	64.10%	37.90%	0.30%
	CD19 CAR 녹인		33.30%	20.50%	39.40%	41.20%	23.10%	0.03%
	%CAR T		55.59%	50.62%	65.23%	64.27%	60.95%	
	배수 확장		3.61	1.3	5.21	4.03	4.72	
	기억 표현형	중심	90.04%	60.75%	92.62%	90.85%	91.48%	
		과도기	5.75%	24.93%	4.87%	6.05%	6.00%	
		이펙터	2.28%	4.94%	1.41%	1.66%	1.34%	
	CD4+ CD8+ 비율	CD4+	43.61%	37.32%	49.10%	50.16%	52.03%	
		CD8+	54.68%	59.13%	49.52%	48.35%	46.42%	
K6784	CD3 녹아웃		48.90%	26.90%	50.60%	51.20%	32.30%	
	CD19 CAR 녹인		21.30%	10.70%	23.90%	23.10%	13.30%	
	%CAR T		43.56%	39.78%	47.23%	45.12%	41.18%	
	배수 확장		4.87	1.6	9	8.6	15.7	
	기억 표현형	중심	64.35%	39.07%	71.17%	65.00%	71.90%	
		과도기	21.72%	43.68%	19.22%	22.57%	17.21%	
		이펙터	8.70%	9.38%	5.89%	7.61%	6.45%	
	CD4+ CD8+ 비율	CD4+	48.89%	51.47%	51.75%	42.52%	42.20%	
		CD8+	46.68%	39.67%	43.68%	48.88%	50.54%	

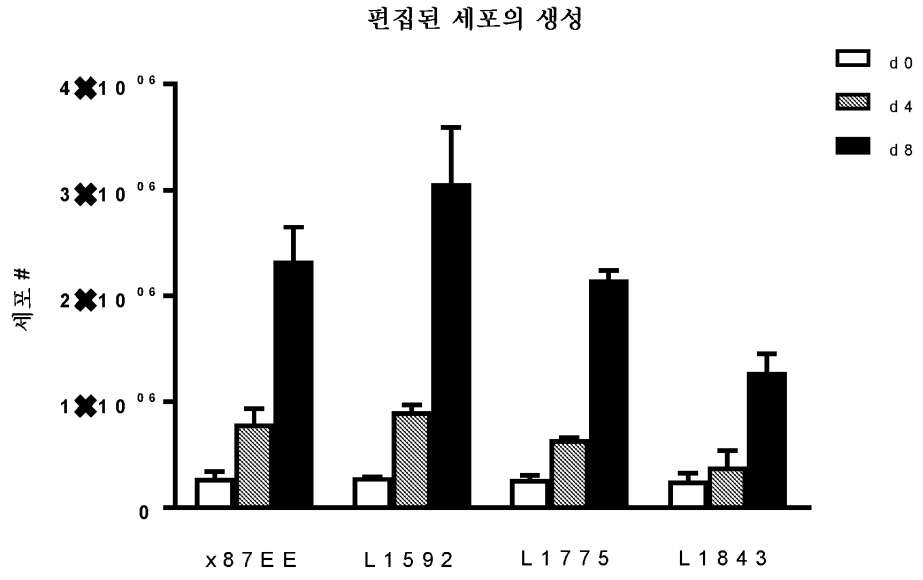
도면12


H7374 RepC
H7374 RepB
H7374 RepA
K1423 RepC
K1423 RepB
K1423 RepA
K1220 RepC
K1220 RepB
K1220 RepA
판독물
0
50
100
150
200
250
400
600
800
1000
1200
미스매치
0
1
2
3
4
5
6
7

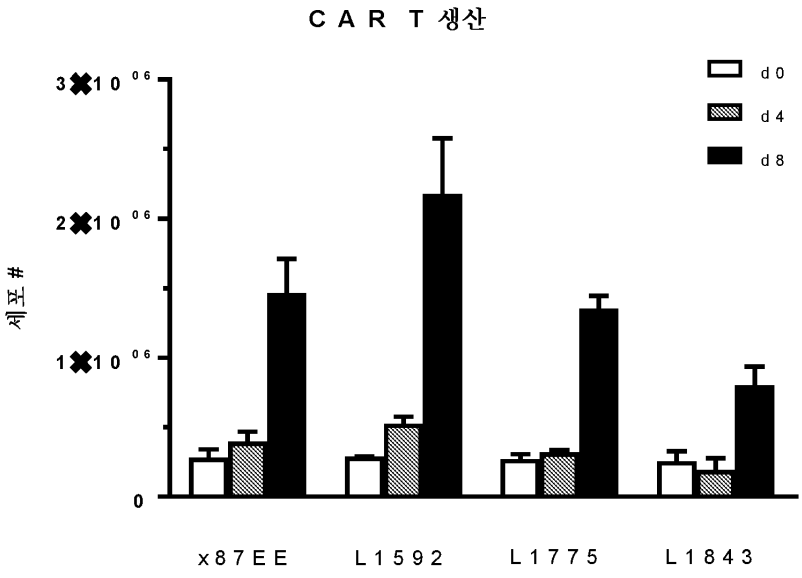
도면13a


편집 후 세포 성장
세포
1✖10 07
8✖10 06
6✖10 06
4✖10 06
2✖10 06
0
모의
x87EE
L1592
L1775
L1843
d0
d4
d8

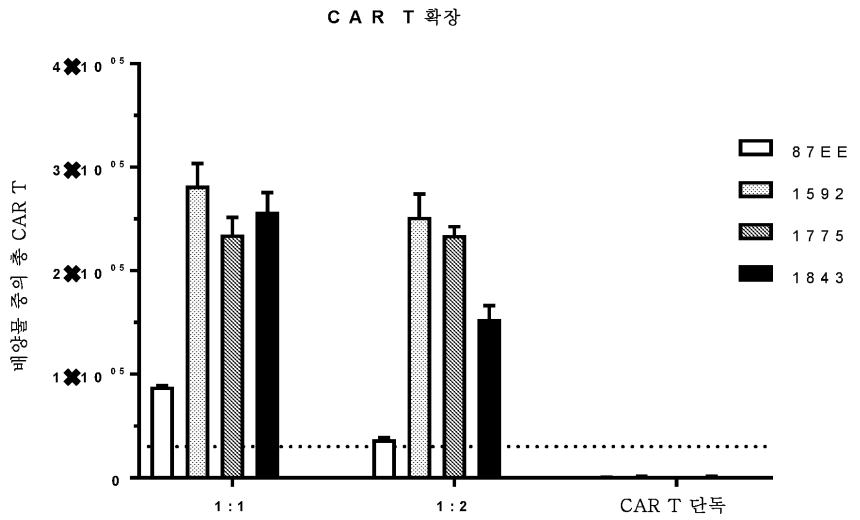
도면13b


편집된 세포의 생성
d0
d4
d8
세포 #
4✖10 06
3✖10 06
2✖10 06
1✖10 06
0
x87EE
L1592
L1775
L1843

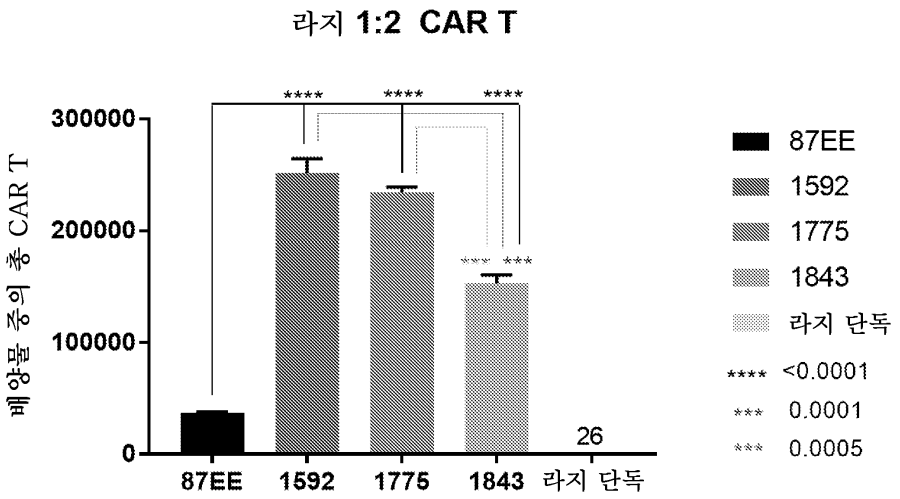
도면13c


CAR T 생산
d0
d4
d8
세포 #
3✖10 06
2✖10 06
1✖10 06
0
x87EE
L1592
L1775
L1843

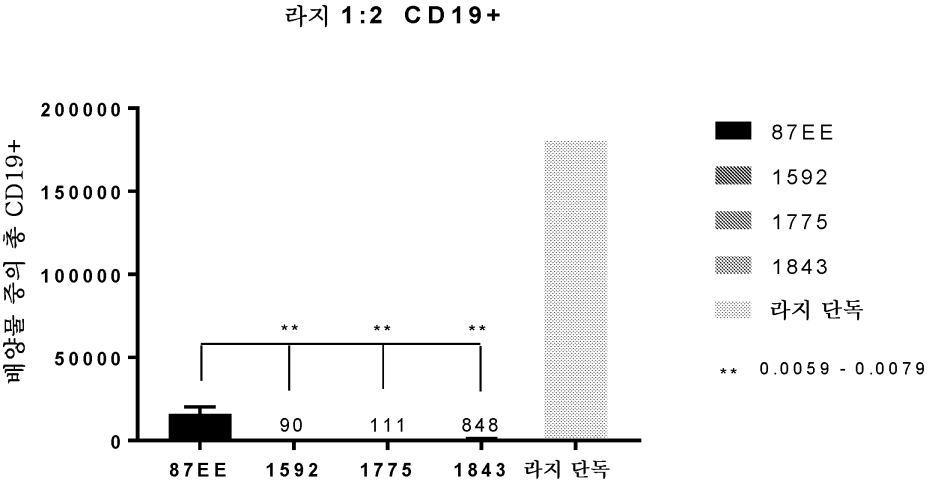
도면14



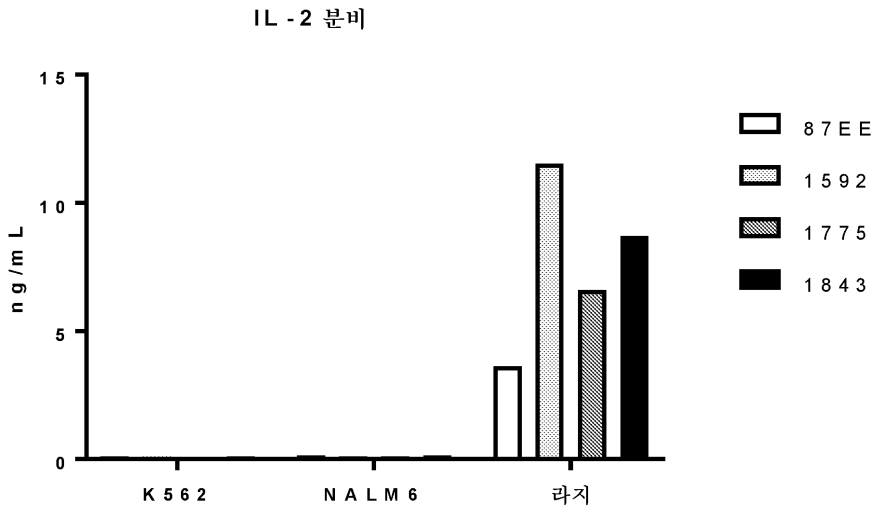
도면15a



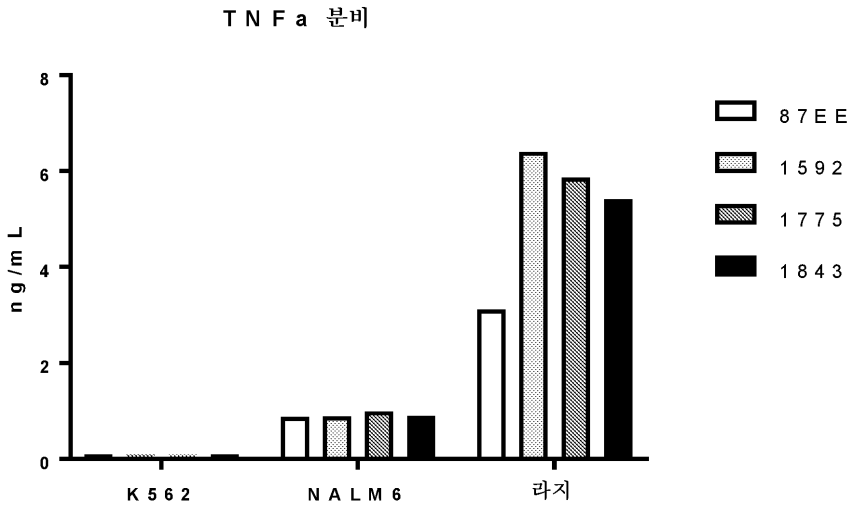
도면15b



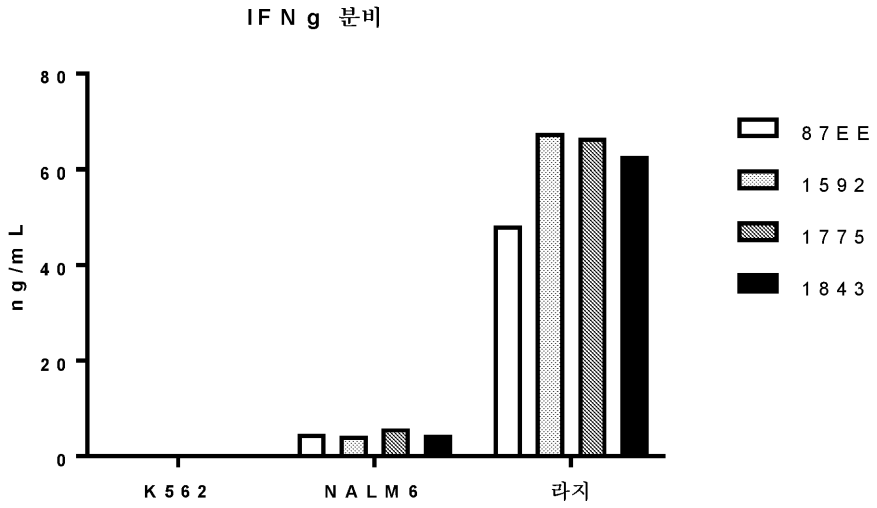
도면16a


IL-2 분비
15
10
5
0
ng/mL
K562
NALM6
라지
87EE
1592
1775
1843

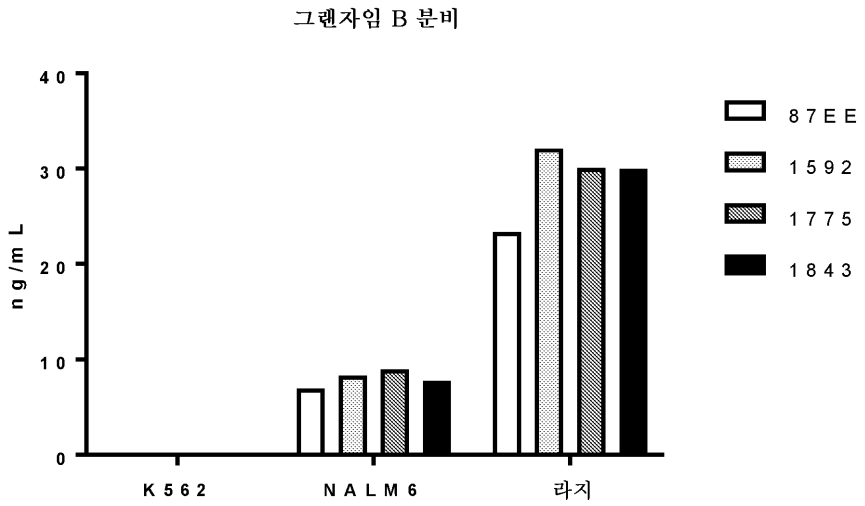
도면16b


TNFa 분비
8
6
4
2
0
ng/mL
K562
NALM6
라지
87EE
1592
1775
1843

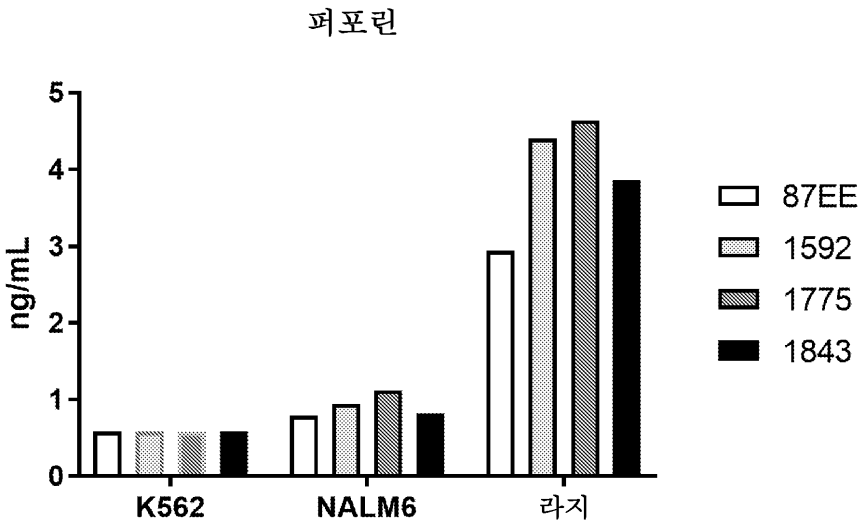
도면16c


IFNg 분비
80
60
40
20
0
ng/mL
K562
NALM6
라지
87EE
1592
1775
1843

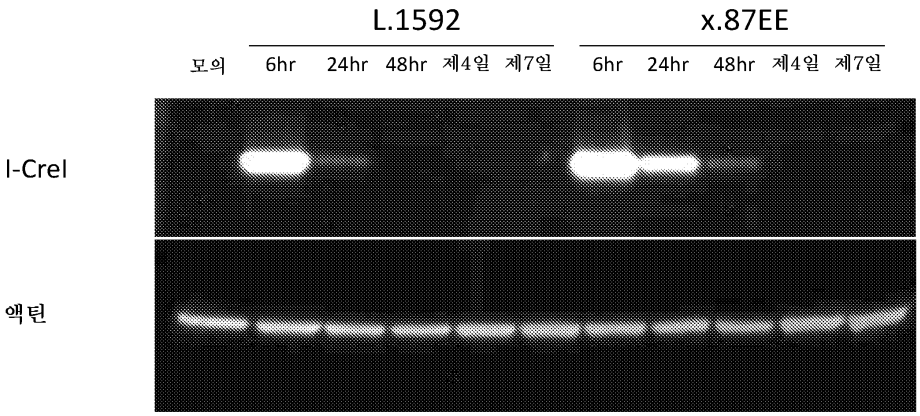
도면16d


그랜자임 B 분비
40
30
20
10
0
ng/mL
K562
NALM6
라지
87EE
1592
1775
1843

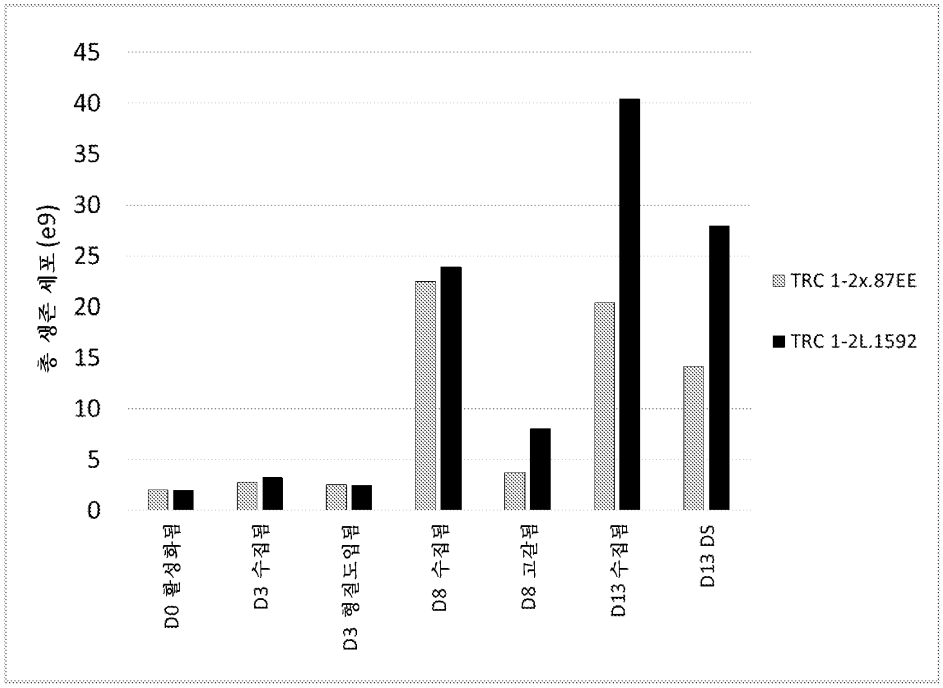
도면16e


퍼포린
5
4
3
2
1
0
ng/mL
K562
NALM6
라지
87EE
1592
1775
1843

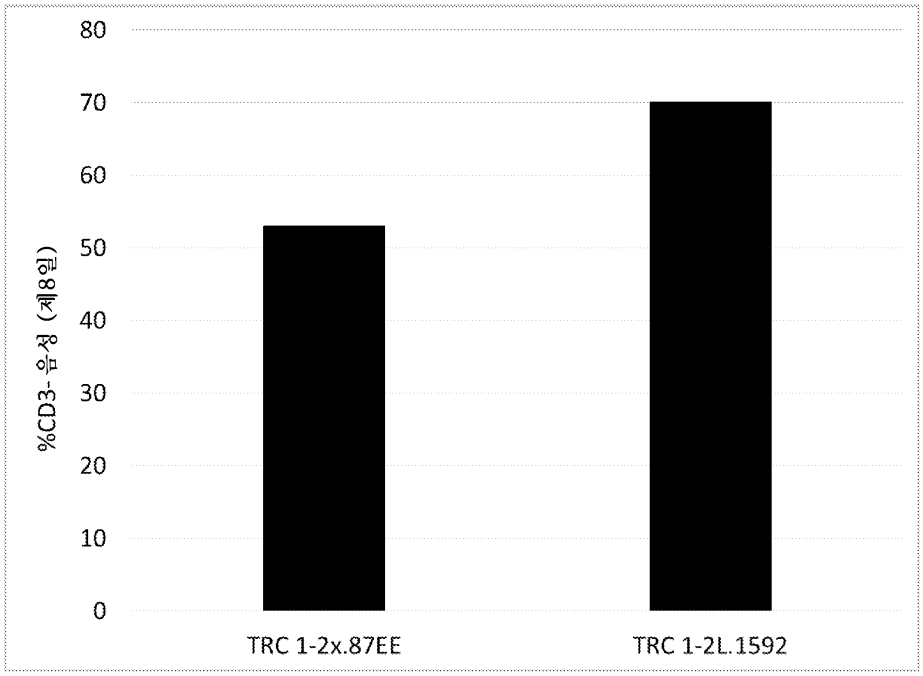
도면17


L.1592
x.87EE
모의
6hr
24hr
48hr
제4일
제7일
6hr
24hr
48hr
제4일
제7일
I-CreI
액틴

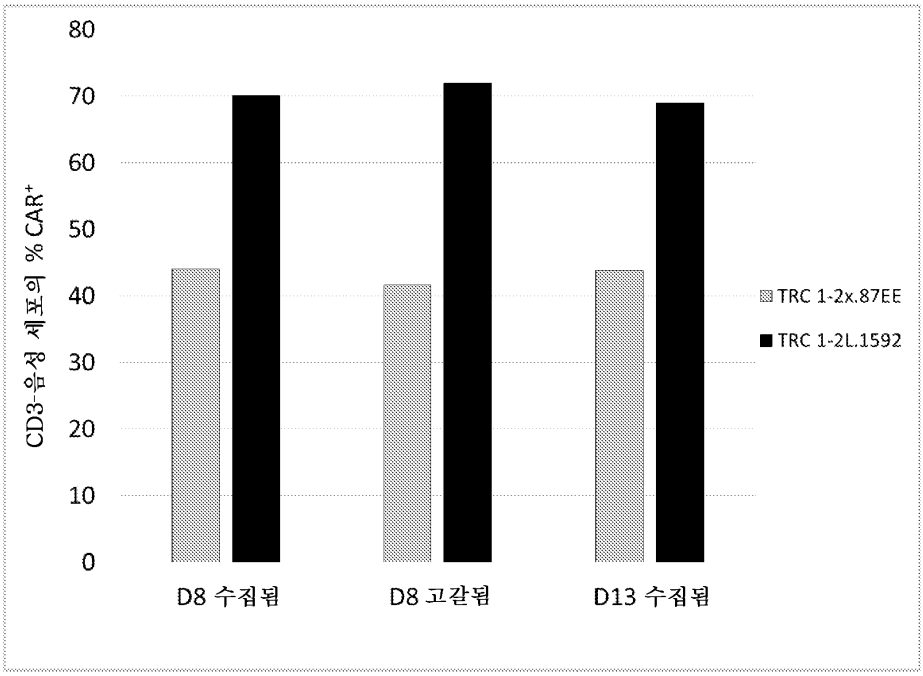
도면18


45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
총 생존 세포 (e9)
D0 활성화됨
D3 수집됨
D3 형질도입됨
D8 수집됨
D8 고갈됨
D13 수집됨
D13 DS
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1592

도면19


80
70
60
50
40
30
20
10
0
%CD3- 음성 (제8일)
TRC 1-2x.87EE
TRC 1-2L.1592

도면20



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Precision BioSciences, Inc.

<120> OPTIMIZED ENGINEERED NUCLEASES HAVING SPECIFICITY FOR THE HUMAN T CELL RECEPTOR ALPHA CONSTANT REGION GENE

<130> P1090.70028WO00

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/656,809

<151> 2018-04-12

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 163

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 1

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
20 25 30
Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys
35 40 45
Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60
Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu
100 105 110
Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125
Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
145 150 155 160
Ser Ser Pro

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Chlamydomonas reinhardtii
<400> 2
Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
1 5
<210> 3
<211> 4627
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3

atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60

ctgtctgcct attcaccgat tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg 120

atgtgtatat cacagacaaa actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca 180

gtgctgtggc ctggagcaac aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca 240

ttattccaga agacaccttc ttccccagcc caggtaaggg cagctttggt gccttcgcag 300

gctgtttcct tgcttcagga atggccaggt tctgcccaga gctctggtca atgatgtcta 360

aaactcctct gattggtggt ctcggcctta tccattgcca ccaaaaccct ctttttacta 420

agaaacagtg agccttgttc tggcagtcca gagaatgaca cgggaaaaaa gcagatgaag 480

agaaggtggc aggagagggc acgtggccca gcctcagtct ctccaactga gttcctgcct 540

gcctgccttt gctcagactg tttgcccctt actgctcttc taggcctcat tctaagcccc 600

ttctccaagt tgcctctcct tatttctccc tgtctgccaa aaaatctttc ccagctcact 660

aagtcagtct cacgcagtca ctcattaacc caccaatcac tgattgtgcc ggcacatgaa 720

tgcaccaggt gttgaagtgg aggaattaaa aagtcagatg aggggtgtgc ccagaggaag 780

caccattcta gttgggggag cccatctgtc agctgggaaa agtccaaata acttcagatt 840

ggaatgtgtt ttaactcagg gttgagaaaa cagctacctt caggacaaaa gtcagggaag 900

ggctctctga agaaatgcta cttgaagata ccagccctac caagggcagg gagaggaccc 960

tatagaggcc tgggacagga gctcaatgag aaaggagaag agcagcaggc atgagttgaa 1020

tgaaggaggc agggccgggt cacagggcct tctaggccat gagagggtag acagtattct 1080

aaggacgcca gaaagctgtt gatcggcttc aagcagggga gggacaccta atttgctttt 1140

ctttttttt ttttttttt ttttttttt tgagatggag ttttgctctt gttgcccagg 1200

ctggagtgca atggtgcatc ttggctcact gcaacctccg cctcccaggt tcaagtgatt 1260

ctcctgcctc agcctcccga gtagctgaga ttacaggcac ccgccaccat gcctggctaa 1320

ttttttgtat ttttagtaga gacagggttt cactatgttg gccaggctgg tctcgaactc 1380

ctgacctcag gtgatccacc cgcttcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggcgtgagc 1440

caccacaccc ggcctgcttt tcttaaagat caatctgagt gctgtacgga gagtgggttg 1500

taagccaaga gtagaagcag aaagggagca gttgcagcag agagatgatg gaggcctggg 1560

cagggtggtg gcagggaggt aaccaacacc attcaggttt caaaggtaga accatgcagg 1620

gatgagaaag caaagagggg atcaaggaag gcagctggat tttggcctga gcagctgagt 1680

caatgatagt gccgtttact aagaagaaac caaggaaaaa atttggggtg cagggatcaa 1740

aacttttttgg aacatatgaa agtacgtgtt tatactcttt atggcccttg tcactatgta 1800

tgcctcgctg cctccattgg actctagaat gaagccaggc aagagcaggg tctatgtgtg 1860

atggcacatg tggccagggt catgcaacat gtactttgta caaacagtgt atattgagta 1920

aatagaaatg gtgtccagga gccgaggtat cggtcctgcc agggccaggg gctctcccta 1980

gcaggtgctc atatgctgta agttccctcc agatctctcc acaaggaggc atggaaaggc 2040

tgtagttgtt cacctgccca agaactagga ggtctggggt gggagagtca gcctgctctg 2100

gatgctgaaa gaatgtctgt ttttccttttt agaaagttcc tgtgatgtca agctggtcga 2160

gaaaagcttt gaaacaggta agacaggggt ctagcctggg tttgcacagg attgcggaag 2220

tgatgaaccc gcaataaccc tgcctggatg agggagtggg aagaaattag tagatgtggg 2280

aatgaatgat gaggaatgga aacagcggtt caagacctgc ccagagctgg gtggggtctc 2340

tcctgaatcc ctctcaccat ctctgacttt ccattctaag cactttgagg atgagtttct 2400

agcttcaata gaccaaggac tctctcctag gcctctgtat tcctttcaac agctccactg 2460

tcaagagagc cagagagagc ttctgggtgg cccagctgtg aaatttctga gtcccttagg 2520

gatagcccta aacgaaccag atcatcctga ggacagccaa gaggttttgc cttctttcaa 2580

gacaagcaac agtactcaca taggctgtgg gcaatggtcc tgtctctcaa gaatcccctg 2640

ccactcctca cacccaccct gggcccatat tcatttccat ttgagttgtt cttattgagt 2700

catccttcct gtggtagcgg aactcactaa ggggcccatc tggacccgag gtattgtgat 2760

gataaattct gagcacctac cccatcccca gaagggctca gaaataaaat aagagccaag 2820

tctagtcggt gtttcctgtc ttgaaacaca atactgttgg ccctggaaga atgcacagaa 2880

tctgtttgta aggggatatg cacagaagct gcaagggaca ggaggtgcag gagctgcagg 2940

cctcccccac ccagcctgct ctgccttggg gaaaaccgtg ggtgtgtcct gcaggccatg 3000

caggcctggg acatgcaagc ccataaccgc tgtggcctct tggttttaca gatacgaacc 3060

taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct cctcctgaaa gtggccgggt 3120

ttaatctgct catgacgctg cggctgtggt ccagctgagg tgaggggcct tgaagctggg 3180

agtggggttt agggacgcgg gtctctgggt gcatcctaag ctctgagagc aaacctccct 3240

gcagggtctt gcttttaagt ccaaagcctg agcccaccaa actctcctac ttcttcctgt 3300

tacaaattcc tcttgtgcaa taataatggc ctgaaacgct gtaaaatatc ctcatttcag 3360

ccgcctcagt tgcacttctc ccctatgagg taggaagaac agttgtttag aaacgaagaa 3420

actgaggccc cacagctaat gagtggagga agagagacac ttgtgtacac cacatgcctt 3480

gtgttgtact tctctcaccg tgtaacctcc tcatgtcctc tctccccagt acggctctct 3540

tagctcagta gaaagaagac attacactca tattacaccc caatcctggc tagagtctcc 3600

gcaccctcct cccccagggt ccccagtcgt cttgctgaca actgcatcct gttccatcac 3660

catcaaaaaa aaactccagg ctgggtgcgg gggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 3720

gaggcagagg caggaggagc acaggagctg gagaccagcc tgggcaacac agggagaccc 3780

cgcctctaca aaaagtgaaa aaattaacca ggtgtggtgc tgcacacctg tagtcccagc 3840

tacttaagag gctgagatgg gaggatcgct tgagccctgg aatgttgagg ctacaatgag 3900

ctgtgattgc gtcactgcac tccagcctgg aagacaaagc aagatcctgt ctcaaataat 3960

aaaaaaaata agaactccag ggtacatttg ctcctagaac tctaccacat agccccaaac 4020

agagccatca ccatcacatc cctaacagtc ctgggtcttc ctcagtgtcc agcctgactt 4080

ctgttcttcc tcattccaga tctgcaagat tgtaagacag cctgtgctcc ctcgctcctt 4140

cctctgcatt gcccctcttc tccctctcca aacagaggga actctcctac ccccaaggag 4200

gtgaaagctg ctaccacctc tgtgcccccc cggcaatgcc accaactgga tcctacccga 4260

atttatgatt aagattgctg aagagctgcc aaacactgct gccacccccc ctgttccctt 4320

attgctgctt gtcactgcct gacattcacg gcagaggcaa ggctgctgca gcctcccctg 4380

gctgtgcaca ttccctcctg ctccccagag actgcctccg ccatcccaca gatgatggat 4440

cttcagtggg ttctcttggg ctctaggtcc tgcagaatgt tgtgaggggt ttatttttt 4500

ttaatagtgt tcataaagaa atacatagta ttcttcttct caagacgtgg ggggaaatta 4560

tctcattatc gaggccctgc tatgctgtgt atctgggcgt gttgtatgtc ctgctgccga 4620

tgccttc 4627

<210> 4

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
1 5 10 15

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
20 25 30

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val

50 55 60

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

Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135 140

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
tggcctggag caacaaatct ga 22

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
accggacctc gttgtttaga ct 22

<210> 7
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 7
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

1 5 10 15
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Val Ile Tyr Pro His Gln Arg

20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Leu Phe Thr Val Ser Gln Ser

35 40 45

Thr Lys Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Leu Pro Arg Thr Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Arg Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Thr Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285
Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300
Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320
Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335
Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350
Ser Pro

<210> 8
<211> 354
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 8
Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15
Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro His Gln Arg

20 25 30
Ala Lys Phe Lys His Leu Leu Lys Leu Val Phe Ala Val His Gln Arg
35 40 45
Thr Thr Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60
Gly Tyr Val Tyr Asp Ile Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80
Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys

85 90 95
Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp

115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr

130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser

180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 9

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 9

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser

210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr

225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile

260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu

275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val

305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser

325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340 345 350

Ser Pro

<210> 10

<211> 147

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 10

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Arg Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Thr Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 11

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 11

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 12

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 12

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg

20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 13

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 13

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Tyr Ala Val Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Leu Phe Thr Val Ser Gln Ser Thr Lys Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Leu

50 55 60

Pro Arg Thr Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 14

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 14

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Leu
20 25 30

Leu Lys Leu Val Phe Ala Val His Gln Arg Thr Thr Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ile

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 15

<211> 147

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 15

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser

50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala

85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala

115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala

130 135 140

Val Leu Asp

145

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

tggcctggag aaacagtgta aa 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

cggcctgtag tacaggacct ga 22

<210> 18

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 18

Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala

20 25 30

Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly Thr Gly

35 40