(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0155390
(43) 공개일자 2024년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70503 (2013.01)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7030609
(22) 출원일자(국제) 2023년02월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/013364
(87) 국제공개번호 WO 2023/158836
국제공개일자 2023년08월24일
(30) 우선권주장
63/311,143 2022년02월17일 미국(US)

(71) 출원인
사나 바이오테크놀로지, 인크.
미국 워싱턴 (우편번호 98102) 시애틀 이스트 블래인 스트리트 188 스위트 400
(72) 발명자
존슨, 아담 제임스
미국 98102 워싱턴 시애틀 이스트 블래인 스트리트 188 스위트 400 사나 바이오테크놀로지, 인크. 내
다우들, 윌리엄
미국 98102 워싱턴 시애틀 이스트 블래인 스트리트 188 스위트 400 사나 바이오테크놀로지, 인크. 내
킵니스, 네이쓴 힐튼
미국 98102 워싱턴 시애틀 이스트 블래인 스트리트 188 스위트 400 사나 바이오테크놀로지, 인크. 내
(74) 대리인
양영준, 이상남

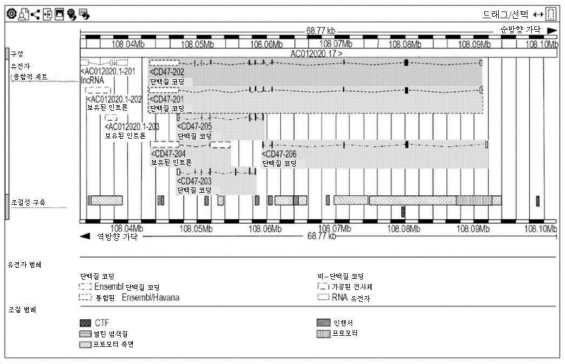
전체 청구항 수 : 총 812 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 CD47 단백질 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시는 조작된 CD47 단백질 및 이의 용도를 제공한다. 또한, 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 조작된 단백질 및/또는 벡터를 포함하는 세포, 및 조작된 CD47 단백질을 포함하는 조성물이 개시된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/4637 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/4703 (2013.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

조작된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물로서,

(a) 하나 이상의 세포외 도메인, 및

(b) 하나 이상의 막 테더(tether)를 포함하되,

상기 하나 이상의 세포외 도메인은 신호 조절 단백질 알파[signal-regulatory protein alpha, SIRPα] 상호작용 모티프를 포함하고,

상기 핵산 작제물은 하나 이상의 전장 CD47 세포내 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하지 않는, 핵산 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SIRPα 상호작용 모티프는 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 CD47 면역글로불린 가변[immunoglobulin variable, IgV] 유사 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 세포외 도메인인, 핵산 작제물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 52와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 6

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 53과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 7

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 8

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 SIRPα 상호작용 모티프는 SIRPα 항체 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD47 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 54와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 14

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 15

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 58과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 16

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 17

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 18

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 19

제10항, 제11항, 또는 제18항에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 69와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 20

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 21

제10항, 제11항 또는 제20항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 71과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 22

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 PDGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 23

제10항, 제11항 또는 제22항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 73과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 24

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 막 테더는 글리코실포스파티딜이노시톨[glycosylphosphatidylinositol, GPI] 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻, TRAILR3 GPI 닻, 또는 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DAF/CD55 GPI 닻은 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 28

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 GPI 닻은 TRAILR3 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 29

제24항, 제25항 또는 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 30

제24항, 제25항 또는 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 31

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 GPI 닻은 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 32

제24항, 제25항 또는 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD59 GPI 닻은 서열 번호 68과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 33

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 제어 서열을 더 포함하는 핵산 작제물.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 하나 이상의 제어 서열은 세포외 신호 펩티드를 암호화하는, 핵산 작제물.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 세포외 신호 펩티드는 서열 번호 51과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 36

제33항에 있어서, 상기 하나 이상의 제어 서열은 프로모터를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 프로모터는 항구적 프로모터 또는 유도성 프로모터인, 핵산 작제물.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 프로모터는 자연 발생 프로모터, 혼성 프로모터, 또는 합성 프로모터인, 핵산 작제물.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, CAG 프로모터, 유비퀴틴/S27a 프로모터, SV40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, RSV 프로모터, MMTV 프로모터, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 긴 말단 반복 영역, CMV 프로모터, 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 열충격 프로모터, 폴리오마 바이러스 프로모터, 계두 바이러스 프로모터, 소 유두종 바이러스 프로모터, 조류 육종 바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터, B형 간염 바이러스 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[mouse mammary tumor virus, MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus, EBV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스[Rous sarcoma virus, RSV] 프로모터, U6 프로모터, 또는 UBC 프로모터거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 40

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 CAG 프로모터거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 서열 번호 49와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 42

제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 EF1α 프로모터거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 43

제36항 내지 제40항, 또는 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 서열 번호 50과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 44

제33항에 있어서, 상기 하나 이상의 제어 서열은 리보솜 결합 부위, 인핸서 요소, 활성자 요소, 번역 개시 서열, 번역 종결 서열, 전사 개시 서열, 전사 종결 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 복제 요소, RNA 처리 및 유출 요소, 전위인자 서열, 전위효소 서열, 절연체 서열, 내부 리보솜 진입 부위[internal ribosome entry site, IRES], 5'UTR, 3'UTR, mRNA 3' 말단 처리 서열, 경계 요소, 좌위 조절 영역[locus control region, LCR], 기질 부착 영역[matrix attachment region, MAR], 재조합 또는 카세트 교환 서열, 링커 서열, 분비 신호, 내성 마커, 고정 펩티드, 국재화 신호, 융합 태그, 친화도 태그, 샤페로닌, 단백질분해효소 또는 이들의 조합을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포외 도메인은 세포외 힌지 도메인을 더 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지, CD8a 힌지, CD28 힌지, PDGFR 힌지, 또는 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은, CD47 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 75와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 49

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD8a 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 50

제45항, 제46항 또는 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 76과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 51

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD28 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 52

제45항, 제46항 또는 7f51 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 77과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 53

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 PDGFR 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 54

제45항, 제46항 또는 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 78과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 55

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 56

제45항, 제46항 또는 제55항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 79와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 더 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD47 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 60

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 61

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 63과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 62

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 64와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 63

제57항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD8a 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 64

제57항 또는 제63항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 65

제57항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 66

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 67

제57항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 PDGFR 세포내 도메인 또는 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 68

제57항 또는 제67항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

청구항 69

제57항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 70

제57항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 결실을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 71

제57항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 삽입을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 72

제57항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 변경된 기능을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 73

제57항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 감소된 기능을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 74

제57항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 CD47 세포내 신호전달을 감소된 수준으로 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 75

제57항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 비기능성 세포내 도메인을 포함하는, 핵산 작제물.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 표 31에서 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 78

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 79

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 80

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 133과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 81

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 134와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 82

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 135와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 83

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 136과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 84

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 137과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 85

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 138과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 86

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 139와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는

핵산 작제물.

청구항 87

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 140과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 88

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 141과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 89

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 142와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 90

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 143과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 91

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 144와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 92

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 145와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 93

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 146과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 94

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 147과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 95

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 148과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 96

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 149와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 97

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 150과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 98

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 151과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 99

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 152와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 100

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 153과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 101

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 154와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 102

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 155와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 103

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 156과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 104

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 157과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 105

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 158과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 106

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 159와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 107

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 160과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 108

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 161과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 109

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 162와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 110

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 163과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 111

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 164와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 112

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 165와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 113

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 166과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 114

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 167과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 115

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 168과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 116

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 169와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 117

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 170과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 118

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 171과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 119

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 172와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 120

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 173과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 121

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 174와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 122

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 175와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 123

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 176과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는

핵산 작제물.

청구항 124

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 177과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 125

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 178과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 126

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 179와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 127

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 180과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 128

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 181과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 129

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 182와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 130

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 183과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 131

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 184와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 132

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 185와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 133

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 341과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 134

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 342와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 135

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 표 33에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 136

제1항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 표 33 및/또는 표 31에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 137

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 138

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 139

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 140

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 141

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 142

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 143

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 및 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 144

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55 및 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 145

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54 및 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 146

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61 및 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 147

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60 및 서열 번호 61과 적어도 80% 동일한 하나

이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 148

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59 및 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 149

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58 및 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 150

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 151

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 53 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 152

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 153

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 154

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 155

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 156

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 157

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 53, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 158

제1항 내지 8k항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 159

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 53, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 160

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 161

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 162

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 163

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 164

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 165

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 166

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 167

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 168

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 169

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 170

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 171

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적

어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 172

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 173

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 174

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 175

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 176

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 177

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 50 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 178

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 179

제1항 내지 제178 중 어느 한 항의 핵산 작제물을 포함하는 벡터.

청구항 180

제179항에 있어서, 상기 벡터는 다중시스트론성 벡터인 벡터.

청구항 181

제180항에 있어서, 상기 다중시스트론성 벡터는 이중시스트론성 또는 삼중시스트론성 벡터인, 벡터.

청구항 182

제179항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 183

제182항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 위형[pseudotyped]의, 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 184

제1항 내지 제178항 중 어느 한 항의 핵산 작제물에 의해 암호화되는 조작된 단백질.

청구항 185

조작된 단백질로서,

(a) 하나 이상의 세포외 도메인, 및

(b) 하나 이상의 막 테더를 포함하되,

상기 하나 이상의 세포외 도메인은 신호 조절 단백질 알파[SIRPα] 상호작용 모티프를 포함하고,

상기 조작된 단백질은 하나 이상의 전장 CD47 세포내 도메인을 포함하지 않는, 조작된 단백질.

청구항 186

제185항에 있어서, 상기 SIRPα 상호작용 모티프는 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 187

제186항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 CD47 면역글로불린 가변[IgV]유사 도메인인, 조작된 단백질.

청구항 188

제185항 또는 제186항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 세포외 도메인인, 조작된 단백질.

청구항 189

제186항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 21과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 190

제186항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 22와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 191

제186항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 26과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 192

제186항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 30과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 193

제185항에 있어서, 상기 SIRPα 상호작용 모티프는 SIRPα 항체 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 194

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 186과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 195

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 187과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 196

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 188과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 197

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 189와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 198

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 190과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 199

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 191과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 200

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 192와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 201

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 193과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 202

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 194와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 203

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 195와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 204

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 196과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 205

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 197과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 206

제193항에 있어서, 상기 SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 198과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 207

제185항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 208

제207항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 209

제207항 또는 제208항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD47 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 210

제207항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 23과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 211

제207항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 25와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 212

제207항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 27과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 213

제207항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 29와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 214

제207항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 31과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 215

제207항 또는 제208항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 216

제207항, 제208항 또는 제215항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 38과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 217

제207항 또는 제208항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 218

제207항, 제208항 또는 제217항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 40과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 219

제207항 또는 제208항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 PDGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 220

제207항, 제208항 또는 제219항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 42와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 221

제85항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 막 테더는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 222

제221항에 있어서, 상기 GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻, TRAILR3 GPI 닻, 또는 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 223

제221항 또는 제222항에 있어서, 상기 GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 224

제221항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DAF/CD55 GPI 닻은 서열 번호 34와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 225

제221항 또는 제222항에 있어서, 상기 GPI 닻은 TRAILR3 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 226

제221항, 제222항 또는 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 35와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 227

제221항, 제222항 또는 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 36과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 228

제221항 또는 제222항에 있어서, 상기 GPI 닻은 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 229

제221항, 제222항 또는 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD59 GPI 닻은 서열 번호 37과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 230

제185항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 신호 펩티드를 더 포함하는 조작된 단백질.

청구항 231

제230항에 있어서, 상기 세포외 신호 펩티드는 서열 번호 20과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 조작된 단백질.

청구항 232

제185항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포외 도메인은 세포외 힌지 도메인을 더 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 233

제232항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지, CD8a 힌지, CD28 힌지, PDGFR 힌지, 또는 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 234

제232항 또는 17a에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 235

제232항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 44와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 236

제232항 또는 제233항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD8a 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 237

제232항, 제233항 또는 제236항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 45와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 238

제232항 또는 제233항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD28 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 239

제232항, 제233항 또는 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 46과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 240

제232항 또는 제233항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 PDGFR 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 241

제232항, 제233항 또는 제240항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 47과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 242

제232항 또는 제233항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 243

제232항, 제233항 또는 제242항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 48과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 244

제1항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인을 더 포함하는 조작된 단백질.

청구항 245

제244항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD47 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 246

제244항 또는 제245항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 24와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 247

제244항 또는 제245항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 28과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 248

제244항 또는 제245항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 32와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 249

제244항 또는 제245항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 33과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 250

제244항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD8a 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 251

제244항 또는 제250항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 252

제244항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 253

제244항 또는 제245항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질 작제물.

청구항 254

제244항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 PDGFR 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 255

제244항 또는 제254항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 43과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 256

제244항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 257

제244항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 결실을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 258

제244항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 삽입을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 259

제244항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 변경된 기능을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 260

제244항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 감소

된 기능을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 261

제244항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 CD47 세포내 신호전달을 감소된 수준으로 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 262

제244항 내지 제261항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 비기능성 세포내 도메인을 포함하는, 조작된 단백질.

청구항 263

제185항 내지 제262항 중 어느 한 항에 있어서, 표 30에서 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 264

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 1과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 265

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 2와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 266

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 6과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 267

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 80과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 268

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 81과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 269

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 82와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 270

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 83과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 271

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 84와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 272

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 85와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 273

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 86과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 274

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 87과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 275

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 88과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 276

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 89와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 277

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 90과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 278

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 91과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 279

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 92와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 280

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 93과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 281

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 94와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 282

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 95와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 283

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 96과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 284

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 97과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 285

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 98과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 286

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 99와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 287

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 100과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 288

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 101과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 289

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 102와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 290

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 103과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 291

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 104와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 292

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 105와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 293

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 106과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 294

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 107과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 295

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 108과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 296

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 109와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 297

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 110과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함

하는 핵산 작제물.

청구항 298

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 111과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 299

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 112와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 300

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 113과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 301

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 114와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 302

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 115와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 303

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 116과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 304

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 117과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 305

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 118과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 306

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 119와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 307

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 120과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 308

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 121과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 309

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 122와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 310

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 123과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 311

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 124와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 312

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 125와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 313

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 126과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 314

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 127과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 315

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 128과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 316

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 129와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 317

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 130과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 318

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 131과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 319

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 132와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 320

제185항 내지 제263항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 340과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

청구항 321

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 표 32에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 322

제1항 내지 제321항 중 어느 한 항에 있어서, 표 32 및/또는 표 30에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 323

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 및 서열 번호 26과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 324

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 및 서열 번호 25와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 325

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23 및 서열 번호 24와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 326

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 서열 번호 30 및 서열 번호 31과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 327

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 서열 번호 29 및 서열 번호 30과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 328

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28 및 서열 번호 29와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 329

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27 및 서열 번호 28과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 330

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22 및 서열 번호 34와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 331

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22 및 서열 번호 35와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 332

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22 및 서열 번호 36과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 333

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동

일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 334

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 335

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22, 서열 번호 42 및 서열 번호 43과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 336

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 47, 서열 번호 42 및 서열 번호 43과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 337

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 48, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 338

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 48, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 339

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 46, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 340

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 46, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 341

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 45, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 342

제185항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 45, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

청구항 343

제185항 내지 제342항 중 어느 한 항에 있어서, 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형 부위를 포함하는 조작된 단백질.

청구항 344

제343항에 있어서, N206 글리코실화 부위를 포함하지 않는 조작된 단백질.

청구항 345

제185항 내지 제344항 중 어느 한 항의 조작된 단백질을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 346

조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자를 포함하는 유전자 조작된 세포로서, 상기 조작된 단백질은

(a) 하나 이상의 세포외 도메인, 및

(b) 하나 이상의 막 테더를 포함하되,

상기 하나 이상의 세포외 도메인은 신호 조절 단백질 알파[SIRPα] 상호작용 모티프를 포함하고,

상기 조작된 단백질은 하나 이상의 전장 CD47 세포내 도메인을 포함하지 않는, 유전자 조작된 세포.

청구항 347

제346항에 있어서, 상기 SIRPα 상호작용 모티프는 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 348

제347항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 CD47 면역글로불린 가변[IgV] 유사 도메인인, 유전자 조작된 세포.

청구항 349

제23항 또는 제347항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 세포외 도메인인, 유전자 조작된 세포.

청구항 350

제347항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 351

제347항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 352

제347항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 353

제347항 내지 제349항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 354

제346항에 있어서, 상기 SIRPα 상호작용 모티프는 SIRPα 항체 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 355

제346항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 356

제355항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 357

제355항 또는 제356항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD47 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작

된 세포.

청구항 358

제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 54와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 359

제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 360

제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 58과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 361

제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 362

제355항 내지 제357항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 363

제355항 또는 제356항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 364

제355항, 제356항 또는 제363항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 69와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 365

제355항 또는 제356항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 366

제355항, 제356항 또는 제365항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 71과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 367

제355항 또는 제356항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 PDGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 368

제355항, 제356항 또는 제367항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 73과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 369

제346항 내지 제354항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 막 테더는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 370

제369항에 있어서, 상기 GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻, TRAILR3 GPI 닻, 또는 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 371

제369항 또는 제370항에 있어서, 상기 GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 372

제369항 내지 제371항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DAF/CD55 GPI 닻은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 373

제369항 또는 제370항에 있어서, 상기 GPI 닻은 TRAILR3 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 374

제369항, 제370항 또는 제373항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TRAILR3 GPI 닻은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 375

제369항, 제370항 또는 제373항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TRAILR3 GPI 닻은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 376

제369항 또는 제370항에 있어서, 상기 GPI 닻은 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 377

제369항, 제370항 또는 제376항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD59 GPI 닻은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 68과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 378

제346항 내지 제369항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 제어 서열을 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 379

제378항에 있어서, 상기 하나 이상의 제어 서열은 세포외 신호 펩티드를 암호화하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 380

제378항 또는 제379항에 있어서, 상기 세포외 신호 펩티드는 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 381

제378항에 있어서, 상기 하나 이상의 제어 서열은 프로모터를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 382

제381항에 있어서, 상기 프로모터는 항구적 프로모터 또는 유도성 프로모터인, 유전자 조작된 세포.

청구항 383

제381항 또는 제382항에 있어서, 상기 프로모터는 자연 발생 프로모터, 혼성 프로모터, 또는 합성 프로모터인, 유전자 조작된 세포.

청구항 384

제381항 내지 제383항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, CAG 프로모터, 유비퀴틴/S27a 프로모터, SV40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, RSV 프로모터, MMTV 프로모터, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 긴 말단 반복 영역, CMV 프로모터, 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 열충격 프로모터, 폴리오마 바이러스 프로모터, 계두 바이러스 프로모터, 소 유두종 바이러스 프로모터, 조류 육종 바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터, B형 간염 바이러스 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[EBV] 프로모터, 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터, 또는 UBC 프로모터거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 385

제381항 내지 제384항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 CAG 프로모터거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 386

제381항 내지 제385항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 프로모터를 포함하고, 상기 프로모터는 서열 번호 49와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 387

제381항 내지 제384항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터는 EF1α 프로모터거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 388

제381항 내지 제385항 또는 제387항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 프로모터를 포함하고, 상기 프로모터는 서열 번호 50과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 389

제378항에 있어서, 상기 하나 이상의 제어 서열은 리보솜 결합 부위, 인핸서 요소, 활성자 요소, 번역 개시 서열, 번역 종결 서열, 전사 개시 서열, 전사 종결 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 복제 요소, RNA 처리 및 유출 요소, 전위인자 서열, 전위효소 서열, 절연체 서열, 내부 리보솜 진입 부위[IRES], 5'UTR, 3'UTR, mRNA 3' 말단 처리 서열, 경계 요소, 좌위 조절 영역[LCR], 기질 부착 영역[MAR], 재조합 또는 카세트 교환 서열, 링커 서열, 분비 신호, 내성 마커, 고정 펩티드, 국재화 신호, 융합 태그, 친화도 태그, 샤페로닌, 단백질분해효소 또는 이들의 조합을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 390

제346항 내지 제389항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포외 도메인은 세포외 힌지 도메인를 더 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 391

제390항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지, CD8a 힌지, CD28 힌지, PDGFR 힌지, 또는 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 392

제390항 또는 제391항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 393

제390항 내지 제392항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 75와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 394

제390항 또는 제391항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD8a 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 395

제390항, 제391항 또는 제394항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 76과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 396

제390항 또는 제391항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 CD28 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 397

제390항, 제391항 또는 제396항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 77과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 398

제390항 또는 제391항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 PDGFR 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 399

제390항, 제391항 또는 제398항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 78과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 400

제390항 또는 제391항에 있어서, 상기 상기 세포외 힌지 도메인은 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 401

제390항, 제391항 또는 제400항에 있어서, 상기 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 79와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 402

제346항 내지 제401항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 세포내 도메인을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 더 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 403

제402항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD47 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 404

제402항 또는 제403항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 405

제402항 또는 제403항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 406

제402항 또는 제403항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 63과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 407

제402항 또는 제403항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 64와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 408

제402항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD8a 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 409

제402항 또는 제408항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 410

제402항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 411

제402항 또는 제403항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 412

제402항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 PDGFR 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 413

제402항 또는 제412항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 상기 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 414

제402항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 415

제402항 내지 제414항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 결실을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 416

제402항 내지 제414항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 삽입을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 417

제402항 내지 제416항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 변경

된 기능을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 418

제402항 내지 제417항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 감소된 기능을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 419

제402항 내지 제418항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 CD47 세포내 신호전달을 감소된 수준으로 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 420

제402항 내지 제419항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포내 도메인은 비기능성 세포내 도메인을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 421

제346항 내지 제420항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 표 31에서 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 422

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 423

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 424

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 425

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 133과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 426

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 134와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 427

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 135와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 428

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 136과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 429

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 137과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 430

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 138과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 431

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 139와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 432

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 140과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 433

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 141과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 434

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 142와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 435

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 143과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 436

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 144와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 437

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 145와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 438

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 146과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 439

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 147과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 440

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 148과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 441

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 149와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 442

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 150과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 443

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 151과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 444

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 152와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 445

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 153과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 446

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 154와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 447

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 155와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 448

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 156과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 449

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 157과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 450

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 158과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 451

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 159와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 452

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 160과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 453

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 161과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 454

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 162와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함

하는 유전자 조작된 세포.

청구항 455

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 163과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 456

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 164와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 457

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 165와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 458

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 166과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 459

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 167과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 460

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 168과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 461

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 169와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 462

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 170과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 463

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 171과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 464

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 172와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 465

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 173과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 466

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 174와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 467

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 175와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 468

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 176과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 469

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 177과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 470

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 178과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 471

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 179와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 472

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 180과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 473

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 181과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 474

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 182와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 475

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 183과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 476

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 184와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 477

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 185와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 478

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 341과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 479

제346항 내지 제421항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 342와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 480

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 표 33에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 481

제346항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 표 33 및/또는 표 31에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 482

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 483

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 484

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 485

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 486

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 487

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 488

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56 및 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 489

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55 및 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 490

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54 및 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 491

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61 및 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 492

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60 및 서열 번호 61과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 493

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59 및 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 494

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58 및 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 495

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 496

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 497

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 498

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 499

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 500

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 501

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 502

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 503

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 504

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 505

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 506

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 507

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 508

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 509

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 510

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 511

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 512

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 513

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세

포.

청구항 514

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 515

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 516

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 517

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 518

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 519

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 520

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 521

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 522

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 50 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 523

제346항 내지 제413항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 524

제346항 내지 제523항 중 어느 한 항에 있어서, 그의 유전체 내 제1 삽입 부위에서 제1 이식유전자를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 525

제524항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 T-세포 수용체[T-cell receptor, TCR] 좌위인, 유전자 조작된 세포.

청구항 526

제525항에 있어서, 상기 TCR 좌위는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, 또는 TRBC2 좌위거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 527

제525항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 β2 마이크로글로불린(β2 microglobulin, B2M) 좌위인, 유전자 조작된 세포.

청구항 528

제525항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 클래스 II 전사활성자[class II transactvator, CIITA] 좌위인, 유전자 조작된 세포.

청구항 529

제525항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 피난항[safe harbor] 좌위인, 유전자 조작된 세포.

청구항 530

제529항에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 유전자 조작된 세포.

청구항 531

제525항 내지 제530항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 엑손인, 유전자 조작된 세포.

청구항 532

제525항 내지 제530항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 인트론인, 유전자 조작된 세포.

청구항 533

제525항 내지 제530항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 인트론과 엑손 사이에 존재하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 534

제525항 내지 제530항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 조절 영역에 존재하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 535

제346항 내지 제534항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 조작된 단백질이 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

청구항 536

제346항 내지 제535항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되지 않은 비교 세포에 비해 TCR의 세포 표면 발현이 감소된 유전자 조작된 세포.

청구항 537

제346항 내지 제536항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되지 않은 비교 세포에 비해 B2M의 세포 표면 발현이 감소된 유전자 조작된 세포.

청구항 538

제346항 내지 제537항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되지 않은 비교 세포에 비해 CIITA의 세포 표면 발현이 감소된 유전자 조작된 세포.

청구항 539

제346항 내지 제538항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 TCR 좌위, B2M 좌위, TAP I 좌위, NLRC5 좌위, CIITA 좌위, HLA-A 좌위, HLA-B 좌위, HLA-C 좌위, HLA-DP 좌위, HLA-DM 좌위, HLA-DOA 좌위, HLA-DOB 좌위, HLA-DQ 좌위, HLA-DR 좌위, RFX5 좌위, RFXANK 좌위, RFXAP 좌위, NFY-A 좌위, NFY-B 좌위, NFY-C 좌위, 또는 이들의 조합에서의 변형을 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 540

제346항 내지 제539항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되어 HLA-A 좌위, HLA-B 좌위, HLA-C 좌위, 또는 이들의 조합을 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

청구항 541

제346항 내지 제539항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되어 HLA-DM 좌위, HLA-DO 좌위, HLA-DP 좌위, HLA-DQ 좌위, HLA-DR 좌위, 또는 이들의 조합을 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

청구항 542

제346항 내지 제541항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되어 TCR 좌위를 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

청구항 543

제346항 내지 제542항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되어 B2M 좌위를 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

청구항 544

제346항 내지 제543항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 유전자 조작되어 CIITA 좌위를 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

청구항 545

제346항 내지 제544항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는,

(a) 하나 이상의 주조직적합성 복합체[MHC] 클래스 I 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및/또는

(b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 546

제346항 내지 제545항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 547

제346항 내지 제546항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 548

제346항 내지 제547항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는,

(a) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및

(b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 549

제346항 내지 제548항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

청구항 550

제346항 내지 제549항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 이동[trafficking]을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

청구항 551

제346항 내지 제550항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 기능을 감소시키며, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 유전자 조작된 세포.

청구항 552

제346항 내지 제551항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[human leukocyte antigen, HLA] 클래스 I 분자인, 유전자 조작된 세포.

청구항 553

제552항에 있어서, 상기 하나 이상의 HLA 클래스 I 분자는 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 554

제346항 내지 제551항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 상기 하나 이상의 분자는 B2M, NLRC5 및 TAP1로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 555

제346항 내지 제554항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

청구항 556

제346항 내지 제555항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 이동을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

청구항 557

제346항 내지 제556항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 기능을 감소시키고, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 유전자 조작된 세포.

청구항 558

제346항 내지 제557항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 II 분자인, 유전자 조작된 세포.

청구항 559

제558항에 있어서, 상기 하나 이상의 HLA 클래스 II 분자는 HLA-DP, HLA-DQ, 및/또는 HLA-DR로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 560

제346항 내지 제557항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자는 CIITA 및 CD74로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 561

제346항 내지 제547항 중 어느 한 항에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 562

제561항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 또는 Serpinb9거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 563

제561항 또는 제562항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 TCR 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 564

제561항 또는 제562항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 B2M 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 565

제561항 또는 제562항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 CIITA 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 566

제561항 또는 제562항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 피난항 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 567

제566항에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 유전자 조작된 세포.

청구항 568

제561항 내지 제565항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 관용원성 인자가 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

청구항 569

제346항 내지 제568항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항원 수용체[chimeric antigen receptor, CAR]을 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 570

제569항에 있어서, 상기 CAR은 CD5-특이적 CAR, CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD23-특이적 CAR, CD30-특이적 CAR, CD33-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD70-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-

특이적 CAR, 카파, 람다, B 세포 성숙화제[B cell maturation agent, BCMA]-특이적 CAR, G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[G-protein coupled receptor family C group 5 member D, GPRC5D]-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, LeY-특이적 CAR, NKG2D 리간드-특이적 CAR, WT1-특이적 CAR, GD2-특이적 CAR, HER2-특이적 CAR, EGFR-특이적 CAR, EGFRvIII-특이적 CAR, B7H3-특이적 CAR, PSMA-특이적 CAR, PSCA-특이적 CAR, CAIX-특이적 CAR, CD171-특이적 CAR, CEA-특이적 CAR, CSPG4-특이적 CAR, EPHA2-특이적 CAR, FAP-특이적 CAR, FRα-특이적 CAR, IL-13Rα-특이적 CAR, 메소텔린-특이적 CAR, MUC1-특이적 CAR, MUC16-특이적 CAR, ROR1-특이적 CAR, C-Met-특이적 CAR, CD133-특이적 CAR, Ep-CAM-특이적 CAR, GPC3-특이적 CAR, HPV16-E6-특이적 CAR, IL13Ra2-특이적 CAR, MAGEA3-특이적 CAR, MAGEA4-특이적 CAR, MART1-특이적 CAR, NY-ESO-1-특이적 CAR, VEGFR2-특이적 CAR, α-폴레이트 수용체-특이적 CAR, CD24-특이적 CAR, CD44v7/8-특이적 CAR, EGP-2-특이적 CAR, EGP-40-특이적 CAR, erb-B2-특이적 CAR, erb-B2,3,4-특이적 CAR, FBP-특이적 CAR, 태아 아세틸콜린 e 수용체-특이적 CAR, G_{D2}-특이적 CAR, G_{D3}-특이적 CAR, HMW-MAA-특이적 CAR, IL-11Rα-특이적 CAR, KDR-특이적 CAR, 루이스 Y-특이적 CAR, L1-세포 접착 분자-특이적 CAR, MAGE-A1-특이적 CAR, 종양태아성 항원(h5T4)-특이적 CAR, TAG-72-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 571

제569항 또는 제570항에 있어서, 상기 CAR은 CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, BCMA-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 572

제569항 내지 제571항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 상기 CAR이 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

청구항 573

제346항 내지 제567항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 자가 항원 수용체[chimeric auto antigen receptor, CAAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 574

제573항에 있어서, 상기 CAAR은 췌장 β-세포 항원, 활막 관절 항원, 수초 염기성 단백질, 단백지방 단백질, 수초 올리고수지상 당단백질, MuSK, 각질형성세포 접착 단백질 데스모글레인 3(desmoglein, Dsg3), Ro-RNP 복합체, La 항원, 골수세포형 과산화효소, 단백질 가수분해효소 3, 카르디오리핀, 시트룰린화 단백질, 카르바밀화 단백질, 및 기저막 콜라겐의 α3 사슬로 이루어진 군에서 선택된 항원을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 575

제573항 또는 제574항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 상기 CAAR이 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

청구항 576

제346항 내지 제567항 중 어느 한 항에 있어서, B-세포 자가항체 수용체[B-cell autoantibody receptor, BAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

청구항 577

제576항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 상기 BAR이 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

청구항 578

제569항 내지 제577항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 이식유전자는 피난항 좌위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 579

제569항 내지 제578항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 이식유전자는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, MICA 좌위, MICB 좌위 또는 피난항 좌위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 580

제569항 내지 제579항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 이식유전자는 AAVS1 좌위, ABO 좌위, CCR5 좌위, CLYBL 좌위, CXCR4 좌위, F3 좌위, FUT1 좌위, HMGB1 좌위, KDM5D 좌위, LRP1 좌위, RHD 좌위, ROSA26 좌위 또는 SHS231 좌위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 581

제346항 내지 제566항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자 및 상기 제2 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 582

제346항 내지 제566항 또는 제576항 내지 제580항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자 및 상기 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 583

제561항 내지 제580항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 이식유전자 및 상기 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 584

제346항 내지 제580항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 585

제346항 내지 제584항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 세 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 586

제346항 내지 제584항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 두 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 587

제346항 내지 제584항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 다중시스트론성 작제물에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 588

제346항 내지 제587항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자 및/또는 상기 제2 이식유전자 및/또는 상기 제3 이식유전자는 유전체 편집 복합체를 암호화하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 589

제588항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 유전체 표적화 엔티티(entity) 및 유전체 변형 엔티티를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 590

제589항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티는 핵산 안내[nucleic acid-guided] 표적화 엔티티인, 유전자 조작된 세포.

청구항 591

제589항 또는 제590항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[ribonucleoprotein, RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게[zinc finger, ZF] 핵산분해효소 핵산 결합 물질, 전사 활성자 유사 효과기[transcription activator-like effector, TALE] 핵산 결합 물질, 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, 귀소 핵산내부분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CRISPR-associated transposase, CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 592

제589항 내지 제591항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, dCas(D10A), dCas(H840A), dCas13a, dCas13b, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 593

제589항 내지 제592항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는 표적 좌위를 절단, 탈아미노화, 틈내기, 중합, 조사[interrogate], 통합, 절개, 풀기, 끊기, 변경, 메틸화, 탈메틸화하거나 아니면, 유전자 조작된 세포.

청구항 594

제589항 내지 제593항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는 재조합효소, 통합효소, 전위효소, 핵산내부분해효소, 핵산말단분해효소, 틈내기효소, 나선효소, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 역전사효소, 탈아미노효소, 플립파제(flippase), 메틸화효소, 탈메틸화효소, 아세틸화효소, 핵산 변형 단백질, RNA 변형 단백질, DNA 변형 단백질, 아르고노트(Argonaute) 단백질, 후성적 변형 단백질, 히스톤 변형 단백질, 또는 이들의 기능적 부분을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 595

제589항 내지 제594항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, 상기 gRNA 및 상기 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, TnpB 핵산분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 염기 편집, 프라임 편집, 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[programmable addition via site-specific targeting element, PASTE], 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 596

제589항 내지 제595항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9,

CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, FokI, dCas (D10A), dCas (H840A), dCas13a, dCas13b, 염기 편집기, 프라임 편집기, 표적-프라임화된 역전사[target-primed reverse transcription, TPRT] 편집기, APOBEC1, 시티딘 탈아미노효소, 아데노신 탈아미노효소, 우라실 당화효소 억제제[UGI], 아데닌 염기 편집기[ABE], 시토신 염기 편집기[CBE], 역전사효소, 세린 통합효소, 재조합효소, 전위효소, 중합효소, 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기, 10-11 전좌 메틸시토신 이산소화효소[translocation methylcytosine dioxygenase, TET], TET1, TET3, TET1CD, 히스톤 아세틸기전달효소 p300, 히스톤 메틸기전달효소 SMYD3, 히스톤 메틸기전달효소 PRDM9, H3K79 메틸기전달효소 DOT1L, 전사 억제자, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 597

제589항 내지 제596항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티 및 상기 유전체 변형 엔티티는 단일 폴리펩티드의 상이한 도메인인, 유전자 조작된 세포.

청구항 598

제589항 내지 제597항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티 및 상기 유전체 변형 엔티티는 함께 작동 가능한 상태로 연결된 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 유전자 조작된 세포.

청구항 599

제589항 내지 제597항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티 및 상기 유전체 변형 엔티티는 서로 연결되지 않은 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 유전자 조작된 세포.

청구항 600

제589항 내지 제599항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 적어도 하나의 표적 좌위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 안내 핵산을 포함하고, 임의로 상기 안내 핵산은 안내 RNA[guide RNA, gRNA]인, 유전자 조작된 세포.

청구항 601

제588항 내지 제598항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 RNA-안내 핵산분해효소를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 602

제601항에 있어서, 상기 RNA-안내 핵산분해효소는 Cas 핵산분해효소를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 603

제602항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 상기 Cas 핵산분해효소 및 상기 gRNA를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

청구항 604

제602항 또는 제603항에 있어서, 상기 Cas 핵산분해효소는 II형 또는 V형 Cas 단백질인, 유전자 조작된 세포.

청구항 605

제602항 내지 제604항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 핵산분해효소는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3 및 Mad7로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 606

제346항 내지 제587항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 인간 세포 또는 비-인간 동물 세포

인 유전자 조작된 세포.

청구항 607

제606항에 있어서, 상기 비-인간 동물 세포는 돼지, 소 또는 양인, 유전자 조작된 세포.

청구항 608

제606항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 인간 세포인 유전자 조작된 세포.

청구항 609

제346항 내지 608항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 줄기 세포 또는 전구세포에서 유래한 분화된 세포인 유전자 조작된 세포.

청구항 610

제609항에 있어서, 상기 줄기 세포는 만능 줄기 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 611

제610항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[induced pluripotent stem cell, iPSC]인, 유전자 조작된 세포.

청구항 612

제610항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포[embryonic stem cell, ESC]인, 유전자 조작된 세포.

청구항 613

제346항 내지 제612항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 공여자에게서 단리된 일차 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 614

제613항에 있어서, 상기 공여자는, 상기 일차 세포가 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하고/하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 유전자 조작된 세포.

청구항 615

제346항 내지 제614항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 다수의 공여자에게서 단리된 일차 세포 집단의 일부인, 유전자 조작된 세포.

청구항 616

제346항 내지 제615항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다수의 공여자는, 상기 일차 세포가 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하고/하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 유전자 조작된 세포.

청구항 617

제346항 내지 제616항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[natural killer, NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식 세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[mesenchymal stem cell, MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 혈액 세포, 또는 이들의 조합인, 유전자 조작된 세포.

청구항 618

제346항 내지 제617항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 619

제618항에 있어서, 상기 T 세포는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CDS+ T 세포, 미감작[naive] T 세포, 조절 T[regulatory T, Treg] 세포, 비조절 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, T-여포 헬퍼[T-follicular helper, Tfh] 세포, 세포독성 T 림프구[cytotoxic T lymphocyte, CTL], 효과기 T[effector T, Teff] 세포, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, CD45RA를 발현하는 효과기 기억 T 세포[effector memory T cell expressing CD45RA, TEMRA 세포], 조직-상주 기억[tissue-resident memory, Trm] 세포, 가상 기억 T 세포, 선천적 기억 T 세포, 기억 줄기 세포(Tse), γδ T 세포, 또는 이들의 조합인, 유전자 조작된 세포.

청구항 620

제618항 또는 제619항에 있어서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 종양 침윤 림프구, 또는 이들의 조합인, 유전자 조작된 세포.

청구항 621

제618항 내지 제620항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 622

제618항 내지 제621항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 자가 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 623

제618항 내지 제621항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 동종이계 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 624

제623항에 있어서, 상기 동종이계 T 세포는 일차 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

청구항 625

제623항 또는 제624항에 있어서, 상기 동종이계 T 세포는 배아 줄기 세포[ESC] 또는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]에서 분화된, 유전자 조작된 세포.

청구항 626

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 25배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 150배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 1100배, 1200배, 1300배, 1400배, 1500배, 2000배, 2500배, 3000배, 3500배, 4000배, 4500배, 또는 5000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 627

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배 내지 적어도 약 15배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 628

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배 내지 적어도 약 10배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 629

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배 내지 적어도

약 5배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 630

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 3배 내지 적어도 약 4배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 631

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 3배 내지 적어도 약 10배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 632

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 4배 내지 적어도 약 10배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 633

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 500배 내지 적어도 약 2000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 634

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 500배 내지 적어도 약 1500배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 635

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 900배 내지 적어도 약 1000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 636

제346항 내지 제625항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 단백질은 상기 유전자 조작된 세포에서, 상기 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

청구항 637

제345항 내지 제636항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 세포를 포함하는 조성물.

청구항 638

(i) 제345항 내지 제636항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 세포 및 (ii) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 639

제345항 내지 제636항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 세포, 제637항의 조성물 또는 제638항의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 640

제639항에 있어서, 상기 방법은 대상에서 질환을 치료하는 방법.

청구항 641

대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한 제345항 내지 제636항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 세포를 포함하는 세포 집단.

청구항 642

대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한 제637항의 조성물.

청구항 643

대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한 제638항의 약학 조성물.

청구항 644

대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한, 제345항 내지 제636항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 세포, 제56항의 세포 집단, 제54항 또는 제56a항의 조성물, 또는 제54a항 또는 제54b항의 약학 조성물의 용도.

청구항 645

제345항 내지 제636항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 세포, 제56항의 세포 집단, 제54항 또는 제56a항의 조성물, 또는 제54a항 또는 제54b항의 약학 조성물의 질환 치료용 의약 제조에서의 용도.

청구항 646

제1항 내지 제645항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 암인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 647

제1항 내지 제646항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD70, 카파, 람다, B 세포 성숙화제[BCMA], G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[GPRC5D], CD123, LeY, NKG2D 리간드, WT1, GD2, HER2, EGFR, EGFRvIII, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FRα, IL-13Rα, 메소텔린, MUC1, MUC16, ROR1, C-Met, CD133, Ep-CAM, GPC3, HPV16-E6, IL13Ra2, MAGEA3, MAGEA4, MART1, NY-ESO-1, VEGFR2, α-폴레이트 수용체, CD24, CD44v7/8, EGP-2, EGP-40, erb-B2, erb-B 2,3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, G_{D2}, G_{D3}, HMW-MAA, IL-11Rα, KDR, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자, MAGE-A1, 종양태아성 항원(h5T4), 및/또는 TAG-72 발현과 연관되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 648

제1항 내지 제647항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 혈액암인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 649

제1항 내지 제648항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액암은 골수성 신생물, 골수형성 이상증후군[myelodysplastic syndrome, MDS], 골수증식성/골수형성 이상증후군, 급성 림프구성 백혈병[acute lymphoblastic leukemia, ALL], 만성 림프구성 백혈병[chronic lymphocytic leukemia, CLL], 급성 골수성 백혈병[acute myeloid leukemia, AML], 만성 골수성 백혈병[chronic myelogenous leukemia, CML], 모세포 위기 만성 골수성 백혈병[blast crisis chronic myelogenous leukemia, bcCML], B 세포 급성 림프구성 백혈병[B-cell acute lymphoid leukemia, B-ALL], T 세포 급성 림프구성 백혈병[T-cell acute lymphoid leukemia, T-ALL], T 세포 림프종 및 B 세포 림프종으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 650

제1항 내지 제649항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 고형암인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약

학 조성물 또는 용도.

청구항 651

제1항 내지 제650항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고형암은 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 상피암, 신장 세포 암종, 췌장 선암종, 자궁경부 암종, 결장직장암, 교모세포종, 횡문근육종, 신경모세포종, 흑색종, 유잉 육종, 골육종, 중피종 및 선암종에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 652

제1항 내지 제651항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 자가면역 질환인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 653

제1항 내지 제652항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자가면역질환은 루푸스, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 건선, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 궤양성 대장염, 애디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염 및 셀리악병으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 654

제1항 내지 제653항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 당뇨병인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 655

제1항 내지 제654항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 전당뇨병, 및 임신성 당뇨병으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 656

제1항 내지 제655항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환은 신경 질환인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 657

제1항 내지 제656항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경 질환은 강경증, 뇌전증, 뇌염, 뇌수막염, 편두통, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 펠리제우스-메르츠바하(Pelizaeus-Merzbacher)병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

청구항 658

핵산 작제물을 포함하는 유전자 조작된 세포의 제조 방법으로서, 제1항 내지 제184항 중 어느 한 항의 핵산 작제물을 세포에 전달하여 유전자 조작된 세포를 제조하는 방법.

청구항 659

제658항에 있어서, 상기 핵산 작제물은 상기 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자를 포함하는, 방법.

청구항 660

제658항 또는 제659항에 있어서, 상기 방법은 상기 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자를 상기 세포의 유전체 내의 제1 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 661

제660항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 T-세포 수용체[TCR] 좌위인, 방법.

청구항 662

제661항에 있어서, 상기 TCR 좌위는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, 또는 TRBC2 좌위거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 663

제661항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 β2 마이크로글로불린(B2M) 좌위인, 방법.

청구항 664

제661항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 클래스 II 전사활성자[CIITA] 좌위인, 방법.

청구항 665

제661항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 피난항 좌위인, 방법.

청구항 666

제665항에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

청구항 667

제660항 내지 제664항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 엑손인, 방법.

청구항 668

제660항 내지 제664항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 인트론인, 방법.

청구항 669

제660항 내지 제664항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 인트론과 엑손 사이에 존재하는, 방법.

청구항 670

제660항 내지 제664항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 조절 영역에 존재하는, 방법.

청구항 671

제660항 내지 제670항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 유전자 치료 벡터, 전위효소, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스, 퓨조좀, 피기백(PiggyBac) 전위인자, 슬리핑뷰티(Sleeping Beauty) (SB11) 전위인자, Mos1 전위인자, 또는 Tol2 전위인자를 이용한 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 672

제660항 내지 제671항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 렌티바이러스 벡터를 이용한 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 673

제660항 내지 제670항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 유전체 변형 단백질을 이용한 상동성 유도 복구[homology-directed repair, HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 674

제658항 내지 제673항 중 어느 한 항에 있어서, 유전체 편집 복합체를 세포 내로 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 675

제674항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티를 포함하는, 방법.

청구항 676

제675항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티는 상기 유전체 편집 복합체를 피난항 부위로 국재화시키고, 임의

로, 상기 유전체 표적화 엔티티는 핵산 안내 표적화 엔티티인, 방법.

청구항 677

제675항 또는 제676항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZF] 핵산 결합 물질, 전사 활성자 유사 효과기[TALE] 핵산 결합 물질, 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, 귀소 핵산내부분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 678

제675항 내지 제677항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, dCas(D10A), dCas (H840A), dCas13a, dCas13b, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 679

제675항 내지 제678항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는 표적 좌위를 절단, 탈아미노화, 틈내기, 중합, 조사, 통합, 절개, 풀기, 끊기, 변경, 메틸화, 탈메틸화하거나 아니면, 불안정화하는, 방법.

청구항 680

제675항 내지 제679항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는 재조합효소, 통합효소, 전위효소, 핵산내부분해효소, 핵산말단분해효소, 틈내기효소, 나선효소, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 역전사효소, 탈아미노효소, 플립파제, 메틸화효소, 탈메틸화효소, 아세틸화효소, 핵산 변형 단백질, RNA 변형 단백질, DNA 변형 단백질, 아르고노트 단백질, 후성적 변형 단백질, 히스톤 변형 단백질, 또는 이들의 기능적 부분을 포함하는, 방법.

청구항 681

제675항 내지 제680항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, TnpB 핵산분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 염기 편집, 프라임 편집, 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE], 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 682

제675항 내지 제681항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 변형 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9,

SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, FokI, dCas (D10A), dCas(H840A), dCas13a, dCas13b, 염기 편집기, 프라임 편집기, 표적-프라임화된 역전사[TPRT] 편집기, APOBEC1, 시티딘 탈아미노효소, 아데노신 탈아미노효소, 우라실 당화효소 억제제[UGI], 아데닌 염기 편집기[ABE], 시토신 염기 편집기[CBE], 역전사효소, 세린 통합효소, 재조합효소, 전위효소, 중합효소, 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기, 10-11 전좌 메틸시토신 이산소화효소[TET], TET1, TET3, TET1CD, 히스톤 아세틸기전달효소 p300, 히스톤 메틸기전달효소 SMYD3, 히스톤 메틸기전달효소 PRDM9, H3K79 메틸기전달효소 DOT1L, 전사 억제자, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 683

제675항 내지 제682항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티 및 상기 유전체 변형 엔티티는 단일 폴리펩티드의 상이한 도메인인, 방법.

청구항 684

제675항 내지 제683항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티 및 상기 유전체 변형 엔티티는 함께 작동 가능한 상태로 연결된 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 방법.

청구항 685

제675항 내지 제683항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 표적화 엔티티 및 상기 유전체 변형 엔티티는 서로 연결되지 않은 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 방법.

청구항 686

제674항 내지 제685항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 유전체 피난항 부위 내 적어도 하나의 서열에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 안내 핵산을 포함하고, 임의로 상기 안내 핵산은 안내 RNA[gRNA]인, 방법.

청구항 687

제674항 내지 제686항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 RNA-안내 핵산분해효소를 포함하는, 방법.

청구항 688

제687항에 있어서, 상기 RNA-안내 핵산분해효소는 Cas 핵산분해효소를 포함하는, 방법.

청구항 689

제688항에 있어서, 상기 유전체 편집 복합체는 Cas 핵산분해효소 및 gRNA를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체를 포함하는, 방법.

청구항 690

제688항 또는 제689항에 있어서, 상기 Cas 핵산분해효소는 II형 또는 V형 Cas 단백질인, 방법.

청구항 691

제688항 내지 제690항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 핵산분해효소는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3 및 Mad7로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 692

제678항에 있어서, 상기 gRNA는 상보적 영역을 포함하되, 상기 상보적 영역은 유전자좌 내 표적 핵산 서열에 대

해 상보적인 핵산 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산 서열은 삽입 부위를 포함하는, 방법.

청구항 693

제692항에 있어서, 상기 유전자좌는 TCR 좌위인, 방법.

청구항 694

제692항에 있어서, 상기 유전자좌는 B2M 좌위인, 방법.

청구항 695

제692항에 있어서, 상기 유전자좌는 CIITA 좌위인, 방법.

청구항 696

제690항 내지 제695항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 프로토스페이서 인접 모티프[protospacer adjacent motif, PAM] 서열에서부터 25 개 이하의 뉴클레오티드이며, 상기 PAM 서열은 ngg, nag, ngrrt, ngrrn, nnnngatt, nnnnryac, nnagaaw, naaaac, tttv, ttn, attn, tttn, gttn, 또는 yttn이며, 여기서

(i) r = a 또는 g,

(ii) y = c 또는 t,

(iii) w = a 또는 t,

(iv) v = a 또는 c 또는 g, 및

(v) n = a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 697

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 SpCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 ngg 또는 nag이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 698

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 SaCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 ngrrt 또는 ngrrn이며, 여기서

(i) r = a 또는 g, 및

(ii) n = a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 699

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 NmeCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 nnnngatt이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 700

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 CjCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 nnnnryac이며, 여기서

(i) r = a 또는 g,

(ii) y = c 또는 t, 및

(iii) n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 701

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 StCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 nnagaaw이며, 여기서

(i) w = a 또는 t, 및

(ii) n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 702

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TdCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 naaaac이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 703

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 LbCas12a를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 tttv이며, 여기서 v = a 또는 c 또는 g인, 방법.

청구항 704

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 AsCas12a를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 tttv이며, 여기서 v = a 또는 c 또는 g인, 방법.

청구항 705

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 AacCas12b를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 ttn이며, 여기서 n = a, c, t 또는 g인, 방법.

청구항 706

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 BhCas12b를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 attn., tttn, 또는 gttn이며, 여기서 n = a, c, t 또는 g인, 방법.

청구항 707

제660항 내지 제696항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 MAD7(ErCas12a)을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 PAM은 yttn이며, 여기서,

(i) y= c 또는 t, 및

(ii) n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 708

제660항, 제678항 또는 제697항 내지 제707항 중 어느 한 항에 있어서, 부위-유도[site-directed] 핵산분해효소를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입은 렌티바이러스를 이용하는 HDR 삽입 이상의 HDR 효율로 수행되는, 방법.

청구항 709

제660항 내지 제673항, 제675항, 제676항, 또는 제677항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 ZFN을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 710

제660항 내지 제673항, 제675항, 제676항, 제677항, 또는 제709항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위는 아연 집게 결합 서열에서부터 25개 이하의 뉴클레오티드인, 방법.

청구항 711

제660항 내지 제673항, 제675항, 제676항, 또는 제677항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TALEN을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 712

제660항 내지 제673항, 제675항, 제676항, 제677항, 또는 제711항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 삽입 부위

는 전사 활성자 유사 효과기[TALE] 핵산분해효소 결합 서열에서부터 25개 이하의 뉴클레오티드인, 방법.

청구항 713

제660항 내지 제675항, 또는 제677항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 안내 RNA[gRNA] 및 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 714

제713항에 있어서, 상기 gRNA는 상보적 영역을 포함하되, 상기 상보적 영역은 유전자좌 내의 표적 핵산 서열에 대해 상보적인 핵산 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산 서열은 삽입 부위를 포함하는, 방법.

청구항 715

제714항에 있어서, 상기 유전자좌는 TCR 좌위인, 방법.

청구항 716

제714항에 있어서, 상기 유전자좌는 B2M 좌위인, 방법.

청구항 717

제714항에 있어서, 상기 유전자좌는 CIITA 좌위인, 방법.

청구항 718

제714항에 있어서, 상기 유전자좌는 피난항 좌위인, 방법.

청구항 719

제718항에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

청구항 720

제713항 내지 제719항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입 부위는 표적 인접 모티프[target adjacent motif, TAM] 서열에서부터 25개 이하의 뉴클레오티드이되, 상기 TAM 서열은 tca, tcac, tcag, tcat, tcaa, ttcan, ttcaa, ttcag, 또는 ttgat이고, 여기서, (i) n = a, c, t 또는 g인, 방법.

청구항 721

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tca인, 방법.

청구항 722

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcac인, 방법.

청구항 723

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcag인, 방법.

청구항 724

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcat인, 방법.

청구항 725

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도

복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcaa인, 방법.

청구항 726

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttcan이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

청구항 727

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttcaa인, 방법.

청구항 728

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttcag인, 방법.

청구항 729

제713항 내지 제720항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttgat인, 방법.

청구항 730

제658항 또는 제659항에 있어서, 상기 핵산 작제물을 상기 세포에 전달하는 단계는 레트로바이러스 또는 아데노-연관 바이러스[adeno-associated virus, AAV] 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 포함하는, 방법.

청구항 731

제730항에 있어서, 상기 레트로바이러스는, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스[Moloney murine leukemia virus, M-MuLV], 몰로니 쥐 육종 바이러스[Moloney murine sarcoma virus, MoMSV], 하베이 쥐 육종 바이러스[Harvey murine sarcoma virus, HaMuSV], 쥣과 유방 종양 바이러스[murine mammary tumor virus, MuMTV], 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스[gibbon ape leukemia virus, GaLV], 고양이 백혈병 바이러스[feline leukemia virus, FLV], 스푸마바이러스, 프리엔드(Friend) 쥐 백혈병 바이러스, 쥣과 줄기 세포 바이러스[Murine Stem Cell Virus, MSCV] 및 라우스 육종 바이러스[RSV], 렌티바이러스, 감마레트로바이러스, 엡실론레트로바이러스, 알파레트로바이러스, 베타레트로바이러스, 델타레트로바이러스, 또는 스푸마레트로바이러스이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 732

제730항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV6 벡터 또는 AAV9 벡터인, 방법.

청구항 733

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항 중 어느 한 항에 있어서, TCR 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 TCR의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 734

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제733항 중 어느 한 항에 있어서, TCR 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 TCR의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 735

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항 중 어느 한 항에 있어서, B2M 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 B2M의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 736

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항 또는 제735항 중 어느 한 항에 있어서, B2M 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 MHC I 분자의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 737

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항, 제735항 또는 제736항 중 어느 한 항에 있어서, B2M 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 B2M의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 738

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항 또는 제735항 내지 제737항 중 어느 한 항에 있어서, B2M 유전자좌에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 MHC I 분자의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 739

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항 중 어느 한 항에 있어서, CIITA 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 CIITA의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 740

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항, 또는 제739항 중 어느 한 항에 있어서, CIITA 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 MHC II 분자의 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 741

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항, 또는 제739항 내지 제740항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상기 CIITA 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 CIITA의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 742

제660항, 제661항, 제662항, 제673항 내지 제693항, 제696항 내지 제715항, 또는 제720항 내지 제732항, 또는 제739항 내지 제741항 중 어느 한 항에 있어서, CIITA 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능적 MHC II 분자의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 743

제658항 내지 제742항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는,

(a) 하나 이상의 주조직적합성 복합체[MHC] 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및/또는

(b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 744

제658항 내지 제743항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 745

제658항 내지 제744항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 746

제658항 내지 제745항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는,

(a) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및

(b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

청구항 747

제743항 내지 제746항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 748

제743항 내지 제747항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 이동을 감소시키는, 방법.

청구항 749

제743항 내지 제748항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 기능을 감소시키며, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 방법.

청구항 750

제743항 내지 제749항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 I 분자인, v.

청구항 751

제750항에 있어서, 상기 하나 이상의 HLA 클래스 I 분자는 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 752

제743항 내지 제751항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 상기 하나 이상의 분자는 B2M, NLRC5 및 TAP1로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 753

제743항 내지 제752항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 방법.

청구항 754

제743항 내지 제753항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 이동을 감소시키는, 방법.

청구항 755

제743항 내지 제754항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 변형은 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 기능을 감소시키고, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 방법.

청구항 756

제743항 내지 제755항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 II 분자인, 방법.

청구항 757

제756항에 있어서, 상기 하나 이상의 HLA 클래스 II 분자는 HLA-DP, HLA-DQ, 및/또는 HLA-DR로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 758

제743항 내지 제757항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 상기 하나 이상의 분자는 CIITA 및 CD74로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 759

제660항 내지 제758항 중 어느 한 항에 있어서, 피난항 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능성 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, 또는 SHS231의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 760

제660항 내지 제758항 중 어느 한 항에 있어서, 피난항 좌위에서의 상기 삽입 부위에서 상기 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능성 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, 또는 SHS231 분자의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 761

제658항 내지 제760항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 상기 조작된 단백질이 세포 표면에 발현된, 방법.

청구항 762

제658항 내지 제761항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 작제물은 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

청구항 763

제762항에 있어서, 상기 방법은 상기 세포의 유전체 내 제2 삽입 부위 내로 상기 제2 이식유전자를 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 764

제762항에 있어서, 상기 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 또는 Serpinb9거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 765

제762항 내지 제764항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 TCR 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는, 방법.

청구항 766

제762항 내지 제764항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 B2M 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는, 방법.

청구항 767

제762항 내지 121b제764항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 CIITA 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는, 방법.

청구항 768

제762항 내지 제764항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 피난항 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는, 방법.

청구항 769

제768항에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

청구항 770

제762항 내지 제769항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 관용원성 인자가 세포 표면에 발현된, 방법.

청구항 771

제658항 내지 제770항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 작제물은 키메라 항원 수용체[CAR]을 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

청구항 772

제771항에 있어서, 상기 방법은 상기 제3 이식유전자를 상기 세포의 유전체 내의 제3 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 773

제771항에 있어서, 상기 CAR은 CD5-특이적 CAR, CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD23-특이적 CAR, CD30-특이적 CAR, CD33-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD70-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, 카파, 람다, B 세포 성숙화제[BCMA]-특이적 CAR, G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[GPRC5D]-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, LeY-특이적 CAR, NKG2D 리간드-특이적 CAR, WT1-특이적 CAR, GD2-특이적 CAR, HER2-특이적 CAR, EGFR-특이적 CAR, EGFRvIII-특이적 CAR, B7H3-특이적 CAR, PSMA-특이적 CAR, PSCA-특이적 CAR, CAIX-특이적 CAR, CD171-특이적 CAR, CEA-특이적 CAR, CSPG4-특이적 CAR, EPHA2-특이적 CAR, FAP-특이적 CAR, FRα-특이적 CAR, IL-13Rα-특이적 CAR, 메소텔린-특이적 CAR, MUC1-특이적 CAR, MUC16-특이적 CAR, ROR1-특이적 CAR, C-Met-특이적 CAR, CD133-특이적 CAR, Ep-CAM-특이적 CAR, GPC3-특이적 CAR, HPV16-E6-특이적 CAR, IL13Ra2-특이적 CAR, MAGEA3-특이적 CAR, MAGEA4-특이적 CAR, MART1-특이적 CAR, NY-ESO-1-특이적 CAR, VEGFR2-특이적 CAR, α-폴레이트 수용체-특이적 CAR, CD24-특이적 CAR, CD44v7/8-특이적 CAR, EGP-2-특이적 CAR, EGP-40-특이적 CAR, erb-B2-특이적 CAR, erb-B 2,3,4-특이적 CAR, FBP-특이적 CAR, 태아 아세틸콜린 e 수용체-특이적 CAR, G_{D2}-특이적 CAR, G_{D3}-특이적 CAR, HMW-MAA-특이적 CAR, IL-11Rα-특이적 CAR, KDR-특이적 CAR, 루이스 Y-특이적 CAR, L1-세포 접착 분자-특이적 CAR, MAGE-A1-특이적 CAR, 종양태아성 항원(h5T4)-특이적 CAR, TAG-72-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 774

제771항 내지 제773항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, BCMA-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 775

제771항 내지 제774항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 상기 CAR이 세포 표면에 발현된, 방법.

청구항 776

제658항 내지 제770항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 작제물은 키메라 자가 항원 수용체[CAAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

청구항 777

제776항에 있어서, 상기 방법은 상기 제3 이식유전자를 상기 세포의 유전체 내의 제3 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 778

제776항에 있어서, 상기 CAAR은 췌장 β-세포 항원, 활막 관절 항원, 수초 염기성 단백질, 단백지방 단백질, 수초 올리고수지상 당단백질, MuSK, 각질형성세포 접착 단백질 데스모글레인 3(Dsg3), Ro-RNP 복합체, La 항원, 골수세포형 과산화효소, 단백질 가수분해효소 3, 카르디오리핀, 시트룰린화 단백질, 카르바밀화 단백질, 및 기저막 콜라겐의 α3 사슬로 이루어진 군에서 선택된 항원을 포함하는, 방법.

청구항 779

제776항 내지 제778항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 CAAR이 세포 표면에 발현된, 방법.

청구항 780

제658항 내지 제770항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 작제물은 B-세포 자가항체 수용체[BAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

청구항 781

제780항에 있어서, 상기 제3 이식유전자를 상기 세포의 유전체 내의 제3 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 782

제780항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 상기 BAR의 세포 표면에 발현을 갖는, 방법.

청구항 783

제771항 내지 제782항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 이식유전자는 피난항 좌위에 삽입되는, 방법.

청구항 784

제771항 내지 제783항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 이식유전자는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, MICA 좌위, MICB 좌위 또는 피난항 좌위에 삽입되는, 방법.

청구항 785

제771항 내지 제784항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 이식유전자는 AAVS1 좌위, ABO 좌위, CCR5 좌위, CLYBL 좌위, CXCR4 좌위, F3 좌위, FUT1 좌위, HMGB1 좌위, KDM5D 좌위, LRP1 좌위, RHD 좌위, ROSA26 좌위, 또는 SHS231 좌위에 삽입되는, 방법.

청구항 786

제658항 내지 제785항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 및 상기 제2 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

청구항 787

제658항 내지 제768항 또는 제780항 내지 제785항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자 및 상기 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

청구항 788

제762항 내지 제785항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 이식유전자 및 상기 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부

위에 삽입되는, 방법.

청구항 789

제658항 내지 제785항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

청구항 790

제658항 내지 제789항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 세 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 791

제658항 내지 제789항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 두 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 792

제658항 내지 제789항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이식유전자, 상기 제2 이식유전자, 및 상기 제3 이식유전자는 다중시스트론성 작제물에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 793

제658항 내지 제792항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 인간 세포 또는 비-인간 동물 세포인, 방법.

청구항 794

제793항에 있어서, 상기 비-인간 동물 세포는 돼지, 소, 또는 양 세포인, 방법.

청구항 795

제793항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 796

제658항 내지 제795항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 줄기 세포 또는 전구세포에서 유래한 분화된 세포인, 방법.

청구항 797

제658항 내지 제796항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포 또는 전구세포인, 방법.

청구항 798

제658항 내지 제796항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포 또는 전구세포에서 유래한 분화된 세포인, 방법.

청구항 799

제796항에 있어서, 상기 줄기 세포는 만능 줄기 세포인, 방법.

청구항 800

제799항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]를 포함하는, 방법.

청구항 801

제799항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포[ESC]인, 방법.

청구항 802

제658항 내지 제801항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 공여자에게서 단리된 일차 세포인, 방법.

청구항 803

제802항에 있어서, 상기 공여자는, 상기 일차 세포가 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하고/하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 방법.

청구항 804

제658항 내지 제803항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식 세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 혈액 세포, 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 805

제658항 내지 제804항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 방법.

청구항 806

제805항에 있어서, 상기 T 세포는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CDS+ T 세포, 미감작 T 세포, 조절 T[Treg] 세포, 비조절 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, T-여포 헬퍼[Tfh] 세포, 세포독성 T 림프구[CTL], 효과기 T[Teff] 세포, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, CD45RA를 발현하는 효과기 기억 T 세포[TEMRA 세포], 조직-상주 기억[Trm] 세포, 가상 기억 T 세포, 선천적 기억 T 세포, 기억 줄기 세포(Tsc), γδ T 세포, 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 807

제805항 또는 제806항에 있어서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 종양 침윤 림프구, 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 808

제805항 내지 제807항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 T 세포인, 방법.

청구항 809

제805항 내지 제808항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 자가 T 세포인, 방법.

청구항 810

제805항 내지 제808항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 동종이계 T 세포인, 방법.

청구항 811

제810항에 있어서, 상기 동종이계 T 세포는 일차 T 세포인, 방법.

청구항 812

제810항 또는 제811항에 있어서, 상기 동종이계 T 세포는 배아 줄기 세포[ESC] 또는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]에서 분화된, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 본원에 참조로 포함되는 2022년 2월 17일에 출원된 미국 가출원 제63/311,143호에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시는 일반적으로, 조작된 CD47 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다. 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 조작된 단백질 및/또는 벡터를 포함하는 세포, 및 조작된 CD47 단백질을 포함하는 조성물이 또한 개시된다.

[0005] 국제 출원 제PCT/US2021/065157호 및 미국 출원 제63/282,961호, 제63/270,956호 및 제63/222,954호는 그 전체가 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0006] CD47은, 인간에서, CD47 유전자에 의해 암호화되는 막관통 단백질이다(도 1). 이는 면역글로불린[immunoglobulin, Ig] 초족의 구성원이다. CD47은 분자량이 약 50 kDa이다. 이는 글리코실화되고, 인간 신체에서 사실상 모든 세포에 의해 편재하여 발현된다(도 2). 이는 N-말단에 단일 IgV-유사 도메인, 막에 걸쳐 있는[membrane-spanning] 5개의 절편이 있는 매우 소수성인 구간, 및 C-말단에 선택적 스플라이싱된[alternative spliced] 세포질 꼬리를 갖는다(도 4). 추가로, 이는 이웃하는 막에 걸쳐 있는 절편 사이에 두 개의 세포내 영역 및 두 개의 세포외 영역을 갖는다. 신호 펩티드는, CD47 동형체상에 존재할 때, IgV-유사 도메인의 N-말단에 위치된다. 인간 CD47 유전자는 여섯 개의 자연 발생 전사체를 갖고, 이 중 다섯 개는 각각 CD47 단백질 동형체를 암호화한다(문헌[Ensembl, Gene: CD47]). 이와 같이, 인간 CD47에 대한 다섯 개의 단백질 동형체가 존재하며, 이들 각각은 다양한 세포 및 조직 유형에 걸쳐 차등 발현된다.

[0007] CD47은 세포자멸사, 증식, 접착 및 이동을 비롯하여, 다양한 세포 과정에 관련된다. CD47은 Tsp-1, 인테그린, 기타 CD47 단백질 및 SIRPα와 같은 다수의 세포외 리간드와 상호작용한다. CD47/SIRPα 상호작용은 많은 신체계[body system], 예컨대, 림프구 항상성, 수지상 세포[dendritic cell, DC] 성숙 및 활성화, 이차 림프구 기관에서의 특정 DC 소집단의 적절한 국재화 및 세포 이행[transmigration]을 조절하는 면역계에서, 다수의 세포내 상호작용을 조절한다. 이식 또는 세포 치료법 적용과 관련하여 공여자 세포를 비롯한, 세포상에서의 CD47은, '자기 마커'로서 기능할 수 있고, 억제성인 '나를 죽이지 말라'는 신호를 전달하기 위해 순환 면역 세포 표면상에서 SIRPα에 결합함으로써 식세포 작용을 조절한다. CD47-SIRPα 결합은 SIRPα상에서 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프[immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM]의 인산화를 일으키는데, 이는 SHP1 및 SHP2 Src 상동성 인산염분해효소의 유인[recruitment]을 촉발시킨다. 이러한 인산염분해효소는 결과적으로 식세포 시냅스에서 미오신 II의 축적을 억제하여, 식세포 작용을 방지한다(문헌[Fujioka et al., 1996]). 대식세포에 의한 표적 세포의 식세포 작용은 본질적으로 활성화 신호(예를 들어, FcγR, CRT, LRP-1)와 억제 신호(예를 들어, SIRPα-CD47)의 균형에 의해 조절된다. CD47의 증가된 발현은 세포가 면역 감시, 후속 파괴 및 선천성 면역 세포 사멸을 회피하는 것을 도울 수 있다. 따라서, 다른 정상 면역 반응의 병적 활성화 또는 바람직하지 않은 활성화가 있을 때, CD47은 면역관용을 유도하기 위해 관용원성 인자로서 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어, 환자가 동종이계 이식 또는 동종이계 세포 치료법을 받은 후에 공여자 항원에 대해 면역 반응을 일으킬 때, 또는 신체가 자가면역질환에 관계된 자기 항원에 부적절하게 반응할 때, 일어날 수 있다. 그러나, 당업계에서는 CD47의 이러한 용도를 개선할 필요가 있다.

발명의 내용

[0008] 본 개시는 일 양태에서, 야생형 전장 인간 CD47 단백질보다 더 적은 아미노산을 갖는 조작된 CD47 단백질을 제공한다. 이러한 조작된 단백질은 유전자 치료법 벡터의 통합을 통한 전달을 포함하여, 보다 효율적인 세포 조작 접근법을 제공한다.

[0009] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공하며, 여기서 결실은 18개 아미노산의 C-말단 결실이 아니다.

[0010] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공한다.

[0011] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 한 개 및 다섯 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부(들), 및 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인

의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공한다.

[0012] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 신호 펩티드를 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공하며, 여기서 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0013] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인, 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공하며, 여기서 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0014] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 한 개 및 다섯 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부(들)을 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공하며, 여기서 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0015] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, 세포내 도메인이 없거나, 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인을 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공하며, 여기서 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 1 및 서열 번호 6과 최대 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0016] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 야생형 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형 부위를 포함한다.

[0017] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형을 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 두 개 미만의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 설페이트 글리코사미노글리칸 변형 부위를 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 두 개 미만의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 설페이트 글리코사미노글리칸 사슬을 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 다섯 개 미만의 N-글리코실화 변형 부위를 포함한다.

[0021] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 네 개 미만의 N-글리코실화 변형 사슬을 포함한다.

[0022] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질에서의 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부는 야생형 인간 CD47 단백질과 비교하여 하나 이상의 트롬보스폰딘-1 결합 부위(들)이 결여되어 있다.

[0023] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부는 야생형 인간 CD47 단백질과 비교하여 하나 이상의 인테그린 결합 부위(들)을 결여한다. 일부 구현예에서, 인테그린은 αvβ3 인테그린, αIIbβ3 인테그린, α2β1 인테그린, α4β1 인테그린, α6β1 인테그린, 및 α5 인테그린으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0024] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질에서의 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부는 적어도 하나의 SIRPα 상호작용 모티프를 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부 내에 있는 시스테인과 인간 CD47 막관통 도메인(들) 내에 또는 사이에 있는 시스테인 사이의 이황화 결합을 포함한다.

[0026] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 관용원성 인자이다.

[0027] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 막관통 단백질이다.

[0028] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질에서의 인간 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 19-141과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질에서의 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 중 어느 하나는, 서열 번호 2의 아미노산 142-162와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열 번호 2의 아미노산 177-197과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 서열 번호 2의 아미노산 208-228과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 236-257과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 서열 번호 2의 아미노산 269-289와 적어도

80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질의 인간 CD47 세포내 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 서열 290-323과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0032] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0037] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 인간 CD47 단백질, 조작된 인간화된 CD47 단백질, 또는 조작된 부분적 인간화 CD47 단백질이다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0039] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 위형[pseudotyped]의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 다중시스트론성[polycistronic] 벡터이다. 일부 구현예에서, 다중시스트론성 벡터는 이중시스트론성 벡터 또는 삼중시스트론성 벡터이다.

[0040] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및/또는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0041] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 포함하는 세포를 제공한다.

[0042] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 줄기 세포이다.

[0043] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 만능 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[induced pluripotent stem cell, iPSC] 또는 배아 줄기 세포이다.

[0044] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 췌장 섬 세포이다.

[0045] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 일차 췌장 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 췌장 섬 세포는 만능 줄기 세포에서 분화된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 iPSC 또는 ESC이다.

[0046] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 T 세포이다.

[0047] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 일차 T 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는 T 세포이다. 일부 구현예에서, T 세포는 CAR-T 세포이다. 일부 구현예에서, T 세포는 만능 줄기 세포에서 분화된다. 일부 구현예에서, PSC는 iPSC 또는 ESC이다.

[0048] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 줄기 세포, 췌장 섬 세포, T 세포, CAR-T 세포, 심장 세포, 심장 전구세포, 신경 세포, 신경아교 전구세포, 내피 세포, B 세포, 망막 색소 상피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 혈액 세포, 형질 세포, 혈소판, 신장 세포, 상피 세포, 자연 살해 세포[NK 세포], 및 CAR-NK 세포로 이루어진 세포들의 군에서 선택된다.

[0049] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 일차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 분화된 세포이다.

[0050] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 저면역원성[hypoimmunogenic] 세포이다.

[0051] 일부 구현예에서, 하나 이상의 주조직적합성[MHC] 클래스 I 단백질 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 단백질의 발현은 야생형 또는 대조군 세포에 비교하여 감소된다. 일부 구현예에서, 야생형 또는 대조군 세포는 출발 재료이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포는 하나 이상의 주조직적합성[MHC] 클래스 I 단백질 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 단백질을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, MHC 단백질은 HLA 단백질이다.

[0052] 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 단백질의 발현은 본원에 기재된 세포에서 녹아웃(knock-out)시키거나 B2M의 발현을 감소시킴으로써 감소된다.

[0053] 일부 구현예에서, MHC 클래스 II 단백질의 발현은 본원에 기재된 세포에서 녹아웃시키거나 CIITA의 발현을 감소시킴으로써 감소된다.

[0054] 일부 구현예에서, TRAC 및/또는 TRBC는 본원에 기재된 세포에서 녹아웃되거나 이들의 발현은 감소된다.

[0055] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0057] **도 1**은 인간 CD47 유전자의 지도를 제공하고, 단백질 코딩인 인간 CD47 유전자의 영역을 예시한다. 이 맵은 Ensembl 유전체 데이터베이스에서 유래한 것이다.

도 2a 및 **도 2b**는 CD47 ENSG00000196776.14 CD47 분자의 동형체 발현을 제공하고(출처: HGNC 기호; Acc:HGNC:1682), 다양한 인간 조직 및 인간 세포 유형에서 각각의 동형체의 발현을 예시한다. 이 데이터는 유전자형-조직 발현[Genotype-Tissue Expression, GTEx] 프로젝트 데이터베이스에서 유래한 것이다.

도 3은 예측된 CD47 막관통 도메인과 인간 CD47 단백질 위상을 제공한다. 구체적으로, 도 3은 인간 CD47 단백질에서 다양한 도메인의 예측된 위치를 제공한다. 이 예측은 연합 단백질 자원[Universal Protein Resource, UniProt]에서 유래한 것이다.

도 4는 알파폴드 단백질 구조 데이터베이스[AlphaFold Protein Structure Database]에서 예측된 인간 CD47 3차 구조를 제공한다.

도 5a, 도 5b, 도 5c, 및 **도 5d**는 인간 CD47 단백질의 동형체 201, 동형체 202, 동형체 203, 동형체 205, 및 동형체 206의 서열 정렬을 제공한다.

도 6은 예시적인 CD47의 절두된[truncated] 변이체를 포함하는 LVV의 바이러스 역가를 보여주는 예시적인 그래프를 제공하며, 이는 Ella 자동화 면역분석 시스템으로 분석된 것이다.

도 7은 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다. GPI 닻(anchor)을 포함하는 몇 가지를 비롯한 다양한 CD47 변이체를 시험하였다.

도 8은 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다. 절두된 세포내 도메인 및 대안적인 힌지 도메인을 포함하는 것들을 비롯한 다양한 CD47 변이체를 시험하였다.

도 9는 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다. 절두된 세포내 도메인 및 대안적인 힌지 도메인을 포함하는 것들을 비롯한 다양한 CD47 변이체를 시험하였다.

도 10은 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다. 절두된 세포내 도메인 및 대안적인 힌지 도메인을 포함하는 것들을 비롯한 다양한 CD47 변이체를 시험하였다.

도 11은 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다. 절두된 세포내 도메인 및 대안적인 힌

지 도메인을 포함하는 것들을 비롯한 다양한 CD47 변이체를 시험하였다.

도 12a, 도 12b, 도 12c, 도 12d, 및 **도 12e**는 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 13은 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 14는 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 15는 (SIRPα-FC 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 16은 (SIRPα-FC 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 17은 (SIRPα-FC 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 18a는 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

도 18b는 (SIRPα-FC 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 보여주는 예시적인 그래프를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] **I. 정의**

[0059] 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 공보, 특허 또는 특허 출원이 그 전문이 참고로 포함된 것으로, 구체적으로 및 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0060] 본 개시에서 사용되는 과학 및 기술 용어들은 다르게 정의되지 않는 한, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가진다. 본원에서 설명된 것들과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 본원에 설명된다. 따라서, 본원에서 정의되는 용어는 본 명세서를 전체로서 참조할 때 더욱 완전하게 설명된다.

[0061] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수 용어는 문맥에서 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수의 지칭을 포함한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, '및/또는'은 연관된 열거된 항목들 중 하나 이상의 임의의 그리고 모든 가능한 조합들뿐만 아니라, 대안('또는')으로 해석되는 경우, 조합들의 결여를 지칭하고 포괄한다. 또한, 본 발명은, 본 발명의 일부 구현예에서 본원에 기재된 임의의 특징 또는 특징들의 조합이 배제되거나 생략될 수 있다는 것을 또한 고려한다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '약'이 서열 길이 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭할 때, 특정된 양의 5%, 1%, 0.5%, 또는 심지어 0.1%의 변동을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0064] 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 용어들 '포함한다', 포함하다', 및 '포함하는', 또는 유사한 용어들은 배타적이지 않은 포함을 의미하도록 의도되어, 요소 또는 특징의 열거된 목록은 언급된 요소 또는 열거된 요소만을 포함하지 않고, 열거되지 않거나 언급되지 않은 다른 요소 또는 특징을 포함할 수 있다.

[0065] 달리 명시되지 않는 한, 핵산은 5'에서 3' 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 기록되고, 아미노산 서열은 아미노에서 카르복시 방향으로, 왼쪽에서 오른쪽으로 각각 기록된다.

[0066] 당업자에 의해 사용되는 문맥에 따라 달라질 수 있기 때문에, 본 개시는 설명된 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

[0067] '친화도'는 분자(예컨대, 수용체)의 단일 결합 부위와 이의 결합 상대(예컨대, 리간드) 사이에 비공유결합적 상호작용의 총합의 강도를 지칭한다. 분자의 그 상대에 대한 친화도는 일반적으로 평형 해리 상수(K_D) (또는 이의 반대인 평형 결합 상수, K_A)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 포함하여, 당 분야에서 알려진 공

통의 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Pope M.E., Soste M.V., Eyford B.A., Anderson N.L., Pearson T.W., (2009) J. Immunol. Methods. 341(1-2):86-96] 및 이에 기재된 방법을 참고한다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 서열에 적용된, 용어 '동일성 퍼센트' 및 '동일성 %'는 표준화된 알고리즘을 사용하여 정렬된 적어도 두 개의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 잔기 일치의 백분율을 지칭한다. 이러한 알고리즘은, 표준화되고 재현 가능한 방식으로 비교되는 서열에서의 간극[gap]을 삽입할 수 있어서, 두 서열 사이의 정렬을 최적화하고, 따라서 두 서열의 보다 의미있는 비교를 달성한다.

[0069] 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 서열 사이의 동일성 퍼센트는 미국 매릴랜드주 베데스다 소재의 NCBI를 비롯한 몇몇 공급원으로부터 입수 가능하고, 인터넷상에서 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ 페이지를 통해 입수 가능한, 미국 국립생물공학정보센터[National Center for Biotechnology Information, NCBI] 기본 국소 정렬 검색 도구[Basic Local Alignment Search Tool, BLAST] (문헌[Altschul, S. F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410])에 의해 제공되는 통상적으로 사용되고 자유롭게 입수 가능한 서열 비교 알고리즘의 모음을 사용하여 결정될 수 있다.

[0070] 높은 정도의 동일성을 나타내지 않는 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 그럼에도 불구하고 유전 암호의 축퇴성으로 인해 유사한 아미노산 서열을 암호화할 수 있다. 핵산 서열의 변화는 모두 실질적으로 동일한 단백질을 암호화하는 다수의 핵산 서열을 생성하기 위해 이러한 축퇴성을 사용하여 이루어질 수 있는 것으로 이해된다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(문헌[Batzer et al. (1991) Nucleic Acid Res 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) J Biol Chem 260:2605-2608; Cassol et al. (1992); Rossolini et al. (1994) Mol Cell Probes 8:91-98]). 용어 '핵산'은 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 및 이의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사작용하는 천연 뉴클레오티드의 알려진 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 용어 핵산은 폴리뉴클레오티드, 및 (적절한 문맥에서) 유전자, cDNA, 및 유전자에 의해 암호화된 mRNA와 상호 교환적으로 사용된다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같이, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 서열에 대한 '퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성'은, 필요한 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 간극을 도입한 후, 다른 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되며, 서열 동일성의 부분으로서 임의의 보존적 치환은 고려하지 않는다. 본 개시에서 아미노산 서열 동일성 퍼센트는 BLAST 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐서 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0072] 아미노산 치환은 폴리펩티드 내에서 하나의 아미노산의 다른 아미노산으로의 대체를 지칭한다. 예시적 치환을 표 1에 나타낸다. 아미노산 치환은 관심 단백질 내로 도입될 수 있고, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어, 보유된/개선된 생물학적 활성에 대해 선별된다.

[0073] [표 1] 예시적인 아미노산 치환

원래 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르루신
Leu (L)	노르루신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르루신

[0074]

[0075] 아미노산은 공통의 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:

[0076] (1) 소수성: 노르루신, Met, Ala, Val, Leu, Ile,

[0077] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,

[0078] (3) 산성: Asp, Glu,

[0079] (4) 염기성: His, Lys, Arg,

[0080] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro,

[0081] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0082] 비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다. 서열 목록에 기재된 것과 같은 서열의 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치와 관련하여, 용어 '상응하는'은 GAP 알고리즘과 같은 표준 정렬 알고리즘을 사용하거나 구조적 서열 정렬에 기반하여 표적 서열과의 정렬시 식별되는 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치를 지칭한다. 예를 들어, 유사한 서열(예를 들어 단편 또는 종 변이체)의 상응하는 잔기는 구조적 정렬 방법에 의해 참조 서열에 대한 정렬로 결정될 수 있다. 서열을 정렬함으로써, 당업자는 예를 들어, 보존되고 동일한 아미노산 잔기를 지침으로서 사용하여 상응하는 잔기를 식별할 수 있다.

[0083] 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 CD47 단백질의 동형체는 인간 CD47 유전자에서부터 번역되고, 선택적 스플라이싱에 의해 처리되는 단백질을 지칭한다.

[0084] 본원에서 사용된 바와 같이, 야생형 인간 CD47 단백질은 생체내에서 자연 발생하는 인간 CD47 단백질, 예컨대 인간 유전체에서/유전체에 의해 암호화되는 야생형 인간 CD47 단백질을 지칭한다. 야생형 인간 CD47 단백질은 자연 발생 인간 CD47 단백질의 동형체 중 임의의 것일 수 있다. 현재 알려진 CD47의 다섯 개의 자연 발생 동형체(동형체 201, 202, 203, 205, 206)의 아미노산 서열은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4 내지 서열 번호 5에 기재되어 있다. 동형체 CD47-202(서열 번호 2)는 번역된 바와 같이 그의 신호 서열을 함유하는 전장 야생형 인간 CD47 단백질이다. 그의 신호 서열을 결여한 성숙한 CD47-202 동형체의 서열은 서열 번호 3에 기재되어 있다. 야생형 인간 CD47 단백질은 그것이 발현될 때 신호 펩티드를 가질 수 있거나 또는 갖지 않을 수 있다. 예를 들어, CD47-206은 번역될 때 신호 펩티드를 결여한다. 야생형 인간 CD47 단백질은 글리코실화될 수 있거나 글리코실화되지 않을 수 있다. 야생형 인간 CD47 단백질은 프로테오글리칸일 수 있다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같이, 조작된 CD47 단백질은 임의의 종에서 자연 발생하지 않는 CD47 단백질을 지칭한다. 즉, 조작된 CD47 단백질은 임의의 종에서 야생형 CD47 단백질이 아니다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 인간 CD47 단백질인데, 이는 인간 야생형 CD47 단백질을 출발 재료로서 사용하고 본원에 기재된 하나 이상의 변형을 만듦으로써 조작됨을 의미한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 인간화 CD47 단백질이며, 이는 비-인간(예를 들어, 쥐) CD47 단백질을 출발 재료로서 사용하고, 본원에 기재된 변형들 중 하나 이상을 만드는 것에 추가하여, 비-인간 CD47 서열을 인간화하여 조작됨을 의미한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 부분적 인간화 CD47 단백질이며, 이는 비-인간(예를 들어, 쥐) CD47 단백질을 출발 재료로서 사용하고, 본원에 기재된 변형들 중 하나 이상을 만드는 것에 추가하여, 비-인간 CD47 서열의 일부를 인간화하여 조작됨을 의미한다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같이, 조작된 CD47 단백질은 천연 유전체 내에서/에 의해 암호화되는 CD47 단백질이 아닌, 예를 들어, 야생형 CD47 단백질이 아닌 단백질을 지칭한다. 조작된 CD47 단백질의 비제한적 예는 (i) 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 18개 아미노산의 C-말단 결실이 아닌, 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부, (ii) 인간 CD47 세포외 도메인의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부, (iii) 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 한 개 및 다섯 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부(들), 및 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부, (iv) 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 신호 펩티드(여기서 조작된 CD 47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않음), (v) 인간 CD47 세포외 도메인, 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부(여기서, 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않음), (vi) 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 한 개 또는 다섯 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부(들)(여기서, 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않음), (vii) 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, 세포내 도메인이 없거나, 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인(여기서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 1 및 서열 번호 6에 대해 최대 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가짐)을 포함한다.

[0087] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '외인성'은, 발현되는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 맥락에서, 참조된 분자 또는 참조된 폴리펩티드가 관심 세포 내에 도입된다는 것을 의미하는 것으로 의도된다. 폴리펩티드는 예를 들어, 암호화 핵산을 세포의 유전 물질[genetic material] 내로 도입함으로써, 예컨대 염색체 내로 또는 플라스미드 또는 발현 벡터와 같은 비염색체성 유전 물질로서 도입함으로써, 도입될 수 있다. 따라서, 암호화 핵산의 발현과 관련하여 사용될 때, 이 용어는 발현 가능한 형태의 암호화 핵산의 세포 내로의 도입을 지칭한다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화되고, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입을 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 렌티바이러스계 바이러스 벡터를 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포의 적어도 하나의 대립유전자의 표적 좌위 내로 삽입된다.

[0088] '외인성' 분자는 정상적으로는 세포에 존재하지 않지만 하나 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있는 분자, 작제물 및 인자 등이다. '세포에서 정상적 존재'는 세포의 특정 발달 단계 및 환경적 조건과 관련하여 결정된다. 따라서, 예를 들어, 신경세포의 배아 발달 동안에만 존재하는 분자는 성체 신경세포에 대해 외인성 분자이다. 외인성 분자는 예를 들어, 기능부전 내인성 분자의 기능하는 형태 또는 정상적으로 기능하는 내인성 분자의 기능부전 형태를 포함할 수 있다.

[0089] 외인성 분자 또는 인자는 그 중에서도, 조합적 화학 과정에 의해 생성된 것과 같은 소분자, 또는 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지질단백질, 다당류, 상기 분자의 임의의 변형된 유도체, 또는 상기 분자 중 하나 이상을 포함하는 임의의 복합체와 같은 거대분자일 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하고; 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있고; 임의의 길이의 것일 수 있다. 핵산은 이중나선을 형성할 수 있는 것들뿐만 아니라 삼중나선 형성 핵산을 포함한다. 예를 들면, 미국 특허 제5,176,996호 및 제5,422,251호 참조. 단백질은 DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 재형성 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 중합효소, 메틸화효소, 탈메틸화효소, 아세틸화효소, 탈아세틸화효소, 키나제, 인산염분해효소, 통합효소, 재조합

효소, 리가제, 토포아이소머라제, 자이레이스(gyrase) 및 나선효소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 외인성 분자 또는 작제물은 내인성 분자와 동일한 유형의 분자, 예를 들어, 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 이러한 경우에, 외인성 분자는 세포 내 내인성 분자의 농도보다 더 큰 농도로 세포 내에 도입된다. 일부 경우에서, 외인성 핵산은 감염 바이러스 유전체, 세포 내로 도입된 플라스미드 또는 에피솜, 또는 세포에 정상적으로 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 세포 내로 외인성 분자를 도입하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 지질-매개 전달(즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함하는, 리포솜), 전기천공, 직접 주입, 세포 융합, 입자 충돌, 인산칼슘 공침, DEAE-덱스트란-매개 전달 및 바이러스 벡터-매개 전달을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 본원에 사용된 바와 같은 용어 '유전자 변형' 및 이의 문법적 등가물은 핵산, 예컨대, 생물의 유전체 내의 핵산의 하나 이상의 변경을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 유전자 변형은 유전자 또는 유전자의 일부 또는 다른 핵산 서열의 변경, 부가 및/또는 결실을 지칭할 수 있다. 유전자 변형된 세포는 또한 유전자 또는 유전자의 일부가 부가, 결실 및/또는 변경된 세포를 지칭할 수 있다. 유전자 변형된 세포는 또한 유전자 또는 유전자 일부가 아닌, 부가된 핵산 서열을 갖는 세포를 지칭할 수 있다. 유전자 변형은, 예를 들어, 일시적인 녹인(knock-in) 또는 녹다운(knock-down) 메커니즘, 및 표적 유전자 또는 유전자의 일부 또는 핵산 서열의 영구적인 녹인, 녹다운, 또는 녹아웃을 일으키는 메커니즘을 모두 포함한다. 유전자 변형은, 예를 들어, 일시적인 녹인 및 핵산 서열의 영구적인 녹인을 일으키는 메커니즘 모두를 포함한다. 유전자 변형은 또한, 예를 들어, 감소되거나 증가된 전사, 감소되거나 증가된 mRNA 안정성, 감소되거나 증가된 번역, 및 감소되거나 증가된 단백질 안정성을 포함한다.

[0092] 본원에서 사용된 바와 같이, 펩티드의 일부는 참조 펩티드보다 더 적은 아미노산을 갖고, 그 펩티드 유래의 적어도 하나의 아미노산을 갖는다.

[0093] 본원에서 사용된 바와 같이, 조성물은 세포를 비롯하여, 둘 이상의 생성물, 물질, 또는 화합물의 임의의 혼합물을 지칭한다.

[0094] **II. CD47 단백질**

[0095] **CD47 단백질 개요**

[0096] 본 개시는 조작된 CD47 단백질 및 그의 용도에 관한 것이다.

[0097] 인테그린-관련 단백질[IAP] 또는 MER6으로도 알려진 CD47은, 인간에서 인간 CD47 유전자(서열 번호 19)에 의해 암호화되는 막관통 단백질이다(도 1). CD47은 면역글로불린[Ig] 초족의 구성원으로, 세포자멸사, 증식, 접착 및 이동을 포함하는 다양한 세포 과정에 관련된다.

[0098] 인간 CD47은 약 ~50 kDa이다. 이는 글리코실화되고, 인간 신체에서 사실상 모든 세포에 의해 편재하여 발현된다(도 2). 과거의 문헌은 동형체 202(즉, CD47-202, 서열 번호 2)가 뇌에서 주로 발현되지만, 최근의 GTEx 발현 데이터는 이러한 결론을 지지하지 않는다(도 2). 본원의 실시예 1에 나타낸 바와 같이, 동형체 CD47-202(서열 번호 2, 서열 번호 14) 및 동형체 CD47-201(서열 번호 1, 서열 번호 13)은 Gibco 및 Rues2 인간 줄기 세포주에서 비교적 동일한 수준으로 발현된다. 동형체 CD47-206(서열 번호 6, 서열 번호 18), 205(서열 번호 5, 서열 번호 17), 204(서열 번호 16) 또한 이들 줄기 세포주에서 고도로 발현되는 것으로 나타난다. 줄기 세포주에서 동형체 CD47-203(서열 4, 서열 번호 15)의 증거는 검출되지 않았다.

[0099] 인간 CD47은 이의 N-말단에, 막에 걸친 다섯 개의 절편이 있는 매우 소수성인 구간인, 단일 IgV-유사 도메인, 및 이의 C-말단에 선택적으로 스플라이싱된 세포질 꼬리를 갖는다(도 4). 추가적으로, 이는 이웃하는 막에 걸친 절편 사이에서 두 개의 세포내 영역 및 두 개의 세포외 영역을 갖는다. CD47 동형체상에 존재할 때, 신호 펩티드는 IgV-유사 도메인의 N-말단에 위치된다.

[0100] 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 단백질의 N-말단의 IgV-유사 도메인을 지칭한다. 구조적으로, 인간 CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 단백질이 세포막에 고정될 때 세포 외부에 위치하는 인간 CD47 단백질의 N-말단 부분이다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 19-141에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 19-141과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 19-141에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 19-141과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성을 갖는 아미

노산 서열을 갖는다.

[0101] 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 CD47 세포내 도메인은 인간 CD47 단백질의 C-말단에 있는 세포질 꼬리를 지칭한다. 구조적으로, 인간 CD47 세포내 도메인은 인간 CD47 단백질이 세포막에 고정될 때 세포 내부에 위치하는 인간 CD47 단백질의 C-말단 부분이다. 인간 CD47 세포내 도메인은 생체내에서 선택적으로 스플라이싱된다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 세포내 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 290-323에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 290-323과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 세포내 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 290-323에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 290-323과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0102] 본원에서 사용된 바와 같이, 인간 CD47 막관통 도메인은 인간 CD47 단백질의 막에 걸친 절편 중 하나를 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 막관통 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 또는 269-289에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 또는 269-289와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 막관통 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 또는 269-289에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 또는 269-289와 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0103] 본원에서 사용된 바와 같이, 신호 펩티드는 단백질이 처음 번역될 때 CD47 단백질의 N-말단에 존재하는 짧은 펩티드를 지칭한다. 신호 펩티드는 일반적으로 세포막에 삽입되는 동안 또는 삽입 직후에 신호 펩티다제에 의해 단백질로부터 절단된다. 신호 펩티드는 세포가 단백질을, 일반적으로 원형질막으로 전위시키도록 촉진하는 기능을 한다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 단백질에 대한 신호 펩티드는 서열 번호 2의 아미노산 1-18에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 1-18과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 인간 CD47 단백질에 대한 신호 펩티드는 서열 번호 2의 아미노산 1-18에 상응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 2의 아미노산 1-18과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0104] 인간 CD47 유전자는 여섯 개의 전사체를 갖는데, 이 중 다섯 개는 CD47의 단백질 동형체를 암호화한다(Ensembl, Gene: CD47). 여섯 개의 전사체는 CD47-201, CD47-202, CD47-203, CD47-204, CD47-205 및 CD47-206으로 명명된다(Ensembl, Gene: CD47, ENSG00000196776). 여섯 개의 전사체의 코딩 DNA 서열[CDS]은 각각 서열 번호 13 내지 서열 번호 18에 기재된 바와 같다. 다섯 개의 단백질 동형체의 아미노산 서열은 각각 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6에 기재된 바와 같다(표 2).

[0105] 전사체 CD47-202(서열 번호 14)는 323개의 아미노산을 갖는 동형체 CD47-202(서열 번호 2)를 암호화한다. CD47-202는 인간 CD47 유전자 중 가장 긴 전사체이다. 이는 Ensembl 데이터베이스에서 대표 전사체로 지정된다. 대표 전사체를 식별함에 있어서, Ensembl은, 모든 것을 감안할 때 보존된 엑손의 가장 큰 범위, 가장 큰 발현, 가장 긴 코딩 서열을 갖고, NCBI 및 UniProt와 같은 다른 주요 자원에서 나타나는 전사체를 확인하는 것을 목적으로 한다. CD47-202 전사체의 모든 스플라이스 접합은 적어도 하나의 의심되지 않는[non-suspect] mRNA에 의해 지지된다.

[0106] 전사체 CD47-201(서열 번호 13)은 305개의 아미노산을 갖는 동형체 CD47-201(서열 번호 1)을 암호화한다. 동형체 CD47-201은 동형체 CD47-202에서부터의 18개의 아미노산의 C-말단의 절단을 갖는다. CD47-201 전사체의 모든 스플라이스 접합은 적어도 하나의 의심되지 않는 mRNA에 의해 지지된다.

[0107] 전사체 CD47-203(서열 번호 15)는 86개의 아미노산을 갖는 동형체 CD47-203(서열 번호 4)를 암호화한다. 이 전사체 모델에 대한 유일한 지지는 단일 발현 서열 태그[EST]에서 유래된다.

[0108] 전사체 CD47-204(서열 번호 16)은 단백질을 암호화하지 않는다. 이 전사체의 모든 스플라이스 접합은 적어도 하나의 의심되지 않는 mRNA에 의해 지지된다.

[0109] 전사체 CD47-205(서열 번호 17)은 109개의 아미노산을 갖는 동형체 CD47-205(서열 번호 5)를 암호화한다. 동형체 205는 동형체 CD47-202(서열 번호 2)에서부터의 절두된 세포내 도메인 및 3개의 막관통 도메인을 포함한다. 이 전사체 모델에 대한 최선의 지지 mRNA는 의심으로 표시되거나, 또는 지지는 다수의 EST에서 유래된다.

[0110] 전사체 CD47-206(서열 번호 18)은 183개의 아미노산을 갖는 동형체 CD47-206(서열 번호 6)을 암호화한다. 동형

체 206은 동형체 CD47-202(서열 번호 2)에서부터의 절두된 세포외 도메인 및 5개의 막관통 도메인을 포함한다.

[0111] 다섯 개의 동형체의 아미노산 서열이 표 2에 열거된다. 인간 CD47 단백질에서 다양한 도메인에 상응하는 아미노산도 표 2에서 확인되고, 도 5에 표시된다. '세포내 연결'은 이웃하는 막관통 도메인을 연결하는 세포내 영역을 지칭하며, 이는 세포의 내부에 위치하지만(즉, 세포 외부에 있지 않고 세포막 내에 있지 않음) 조작된 CD47 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 위치하지 않는다. '세포외 연결'은 이웃하는 막관통 도메인을 연결하는 세포외 영역을 지칭하며, 이는 세포 외부에 위치한다(즉, 세포 내부가 아니고 세포막 내부가 아님). 본원에서 사용된 바와 같이, CD47 '세포내 도메인'은 세포내 연결을 포함하지 않는다. 또한 본원에서 사용된 바와 같이, CD47 '세포외 도메인'은 세포외 연결을 포함하지 않는다.

[0112] [표 2] CD47 도메인에 대한 아미노산 서열 번호

	CD47-201 서열번호 1	CD47-202 서열번호 2	CD47-203 서열번호 4	CD47-205 서열번호 5	CD47-206 서열번호 6
신호 펩티드	1-18	1-18	해당없음	해당없음	해당없음
세포외 도메인	19-141	19-141			1-96
막관통 도메인 1	142-162	142-162			97-117
세포내 연결 1	163-176	163-176			118-131
막관통 도메인 2	177-197	177-197			132-152
세포외 연결 1	198-207	198-207		1-4	153-162
막관통 도메인 3	208-228	208-228		5-25	163-183
세포내 연결 2	229-235	229-235		26-32	
막관통 도메인 4	236-256	236-256		33-53	
세포외 연결 2	257-268	257-268		54-65	
막관통 도메인 5	269-289	269-289		66-86	
세포내 도메인	290-305	290-323		87-109	

[0113]

[0114] **조작된 CD47 단백질**

[0115] 본 개시는 야생형 전장 인간 CD47 단백질보다 더 적은 아미노산을 갖는 조작된 CD47 단백질을 제공한다. 이러한 조작된 단백질은 유전자 치료법 벡터의 통합을 통한 전달을 비롯하여, 보다 효율적인 세포 조작 접근법을 제공한다.

[0116] 본원에서 사용된 바와 같이, 야생형 전장 인간 CD47 단백질은 본 특허 출원의 출원 일자로 Ensembl 데이터베이

스에 개시된 바와 같은 동형체 CD47-202를 지칭한다. 야생형 전장 인간 CD47 단백질은 서열 번호 2의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 아미노산 1-18은 신호 펩티드이고, 아미노산 19-141은 세포외 도메인이고, 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 269-289는 다섯 개의 막관통 도메인이고(도 3), 아미노산 290-323은 세포내 도메인이다. 아미노산 163-176 및 229-235는 막관통 도메인 사이의 두 개의 세포내 연결이고, 아미노산 198-207 및 257-268은 막관통 도메인 사이의 두 개의 세포외 연결이다(도 3).

[0117] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 동형체 202(서열 번호 2)의 C-말단 절두된 형태이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, C-말단 절두는 연속적이고, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 또는 161개 아미노산(들) 길이이다. 바람직하게는, C-말단 절두는 158, 123, 92, 64, 31, 또는 95개 아미노산 길이이며, 그 결과 각각 서열 번호 7 내지 서열 번호 12에 대해 설정된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 조작된 CD47 단백질을 생성한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 2의 C-말단 절두를 갖는 조작된 CD47 단백질은 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 또는 140개의 연속된 아미노산(들)의 N-말단 절두를 더 갖는다.

[0118] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 동형체 201(서열 번호 1)의 C-말단 절두된 형태이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, C-말단 절두는 연속적이고, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 또는 143개 아미노산(들) 길이이다. 일부 구현예에서, 서열 번호 1의 C-말단 절단을 갖는 조작된 CD47 단백질은 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95개의 연속된 아미노산(들)의 N-말단 절단을 더 갖는다.

[0119] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 동형체 206(서열 번호 6)의 C-말단 절단된 형태이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, C-말단 절단은 연속적이고, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 또는 66개 아미노산(들) 길이이다. 일부 구현예에서, 서열 번호 6의 C-말단 절단을 갖는 조작된 CD47 단백질은 1, 2, 3, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 또는 140개의 연속된 아미노산(들)의 N-말단 절단을 더 갖는다.

[0120] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 최소 세포내 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 최소 세

포내 도메인은 조작된 CD47 단백질의 SIRPα 결합을 보존하기 위해 필요한 아미노산의 최소 수를 갖는 세포내 도메인을 지칭한다.

[0121] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 최소 세포외 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 최소 세포외 도메인은 조작된 CD47 단백질이 SIRPα에 결합하는데 필요한 아미노산의 최소 수를 갖는 세포외 도메인을 지칭한다.

[0122] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인을 포함하는 조작된 CD47 단백질을 제공하며, 여기서 세포내 도메인이 존재할 때, 이는 적어도 하나의 아미노산이 결실된 인간 CD47 세포내 도메인이다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에 하나 초과의 막관통 도메인이 있을 때, 각각의 막관통 도메인은 세포내 및/또는 세포외 연결(들)과 상호연결된다.

[0123] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인으로 본질적으로 이루어지는 조작된 CD47 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에 하나 초과의 막관통 도메인이 있을 때, 각각의 막관통 도메인은 세포내 및/또는 세포외 연결(들)과 상호연결된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '본질적으로 이루어지는'은 특정된 요소 및 조작된 CD47 단백질의 SIRPα 결합을 방해하지 않는 임의의 추가 요소를 포함한다.

[0124] 일 양태에서, 본 개시는 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인으로 이루어지는 조작된 CD47 단백질을 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에 하나 초과의 막관통 도메인이 있을 때, 각각의 막관통 도메인은 세포내 및/또는 세포외 연결(들)과 상호연결된다.

[0125] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함하며, 여기서 결실은 18 개 아미노산의 C-말단 결실이 아니다.

[0126] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 한 개 및 다섯 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부(들), 및 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함한다.

[0128] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및 신호 펩티드를 포함하고, 여기서 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0129] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인, 및 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, 여기서 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0130] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및 적어도 한 개 및 다섯 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부(들)을 포함하고, 여기서 조작된 CD47 단백질은 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0131] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인, 다섯 개의 인간 CD47 막관통 도메인 및 18개 아미노산의 C-말단 결실을 갖는 인간 CD47 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 CD47 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 1이 아니다.

[0132] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 및 다섯 개의 인간 CD47 막관통 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 CD47 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 6이 아니다.

[0133] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, 세포내 도메인이 없거나, 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인을 포함하며, 여기서 조작된 CD47 단백질의 아미노산 서열은 서열 번호 1 및 서열 번호 6과 최대 99%의 동일성을 갖는다. 즉, 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부를 포함하고, 및 세포내 도메인이 없거나 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 CD47 단백질의

아미노산 서열은 서열 번호 1에 대해 99% 이하의 동일성을 갖고, 서열 번호 6에 대해 99% 이하의 동일성을 갖는다.

[0134] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포외 도메인은 야생형 인간 CD47 세포외 도메인이다. 일부 구현예에서, 야생형 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 19-141, 또는 서열 번호 6의 아미노산 1-96에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0135] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 19-141, 또는 서열 번호 6의 아미노산 1-96과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 19-141, 또는 서열 번호 6의 아미노산 1-96과 적어도 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0136] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포외 도메인은 야생형 인간 CD47 세포외 도메인과 구조적으로 동등하다.

[0137] 본원에서 사용된 바와 같이, '구조적으로 동등한'은 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 두 개의 아미노산 서열을 지칭한다. 바람직하게는, 서열 변이는 조작된 CD47 단백질의 생물학적 활성을 변화시키지 않는다. 일부 구현예에서, 서열 변이는 조작된 인간 단백질이 SIRPα에 결합하는 것을 방지하지 않는다. 일부 구현예에서, 서열 변이는 조작된 인간 단백질이 관용원성 인자가 되는 것을 방지하지 않는다. 일부 구현예에서, 서열 변이의 적어도 일부는 보존적 아미노산 치환(들)을 통해 발생할 수 있다.

[0138] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 조작된 단백질은 하나 이상의 막 테더를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은, 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 1A[5-hydroxytryptamine receptor 1A, HTR1A], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 1B[HTR1B], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 1D[HTR1D], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 1E[HTR1E], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 1F[HTR1F], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 2A[HTR2A], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 2B[HTR2B], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 2C[HTR2C], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 4[HTR4], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 5A[HTR5A], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 5B[HTR5BP], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 6[HTR6], 5-히드록시트립타민(세로토닌) 수용체 7, 연결된 아데닐산염 고리화효소[HTR7], 무스카린성 콜린 수용체 1[cholinergic receptor, muscarinic 1, CHRM1], 무스카린성 콜린 수용체 2[CHRM2], 무스카린성 콜린 수용체 3[CHRM3], 무스카린성 콜린 수용체 4[CHRM4], 무스카린성 콜린 수용체 5[CHRM5], 아데노신 A1 수용체[adenosine A1 receptor, ADORA1], 아데노신 A2a 수용체[ADORA2A], 아데노신 A2b 수용체[ADORA2B], 아데노신 A3 수용체[ADORA3], 접착 G 단백질 연결 수용체 A1[adhesion G protein-coupled receptor A1, ADGRA1], 접착 G 단백질 연결 수용체 A2[ADGRA2], 접착 G 단백질 연결 수용체 A3[ADGRA3], 접착 G 단백질 연결 수용체 B1[ADGRB1], 접착 G 단백질 연결 수용체 B2[ADGRB2], 접착 G 단백질 연결 수용체 B3[ADGRB3], 카드헤린 EGF LAG 7-통과 G형 수용체 1[cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 , CELSR1], 카드헤린 EGF LAG 7-통과 G형 수용체 2[CELSR2], 카드헤린 EGF 7-통과 G형 수용체 3[CELSR3], 접착 G 단백질 연결 수용체 D1[ADGRD1], 접착 G 단백질 연결 수용체 D2[ADGRD2], 접착 G 단백질 연결 수용체 E1[ADGRE1], 접착 G 단백질 연결 수용체 E2[ADGRE2], 접착 G 단백질 연결 수용체 E3[ADGRE3], 접착 G 단백질 연결 수용체 E4[ADGRE4P], 접착 G 단백질 연결 수용체 E5[ADGRE5], 접착 G 단백질 연결 수용체 F1[ADGRF1], 접착 G 단백질 연결 수용체 F2[ADGRF2], 접착 G 단백질 연결 수용체 F3[ADGRF3], 접착 G 단백질 연결 수용체 F4[ADGRF4], 접착 G 단백질 연결 수용체 F5[ADGRF5], 접착 G 단백질 연결 수용체 G1[ADGRG1], 접착 G 단백질 연결 수용체 G2[ADGRG2], 접착 G 단백질 연결 수용체 G3[ADGRG3], 접착 G 단백질 연결 수용체 G4[ADGRG4], 접착 G 단백질 연결 수용체 G5[ADGRG5], 접착 G 단백질 연결 수용체 G6[ADGRG6], 접착 G 단백질 연결 수용체 G7[ADGRG7], 접착 G 단백질 연결 수용체 L1[ADGRL1], 접착 G 단백질 연결 수용체 L2[ADGRL2], 접착 G 단백질 연결 수용체 L3[ADGRL3], 접착 G 단백질 연결 수용체 L4[ADGRL4], 접착 G 단백질 연결 수용체 V1[ADGRV1], 아드레날린수용체 알파 1A[adrenoceptor alpha 1D, ADRA1A], 아드레날린수용체 알파 1B[ADRA1B], 아드레날린수용체 알파 1D[ADRA1D], 아드레날린수용체 알파 2A[ADRA2A], 아드레날린수용체 알파 2B[ADRA2B], 아드레날린수용체 알파 2C[ADRA2C], 아드레날린수용체 베타 1[ADRB1], 아드레날린수용체 베타 2[ADRB2], 아드레날린수용체 베타 3[ADRB3], 안지오텐신 II 수용체 1형[angiotensin II receptor type 1, AGTR1], 안지오텐신 II 수용체 2형[AGTR2], 아펠린 수용체[apelin receptor, APLNR], G 단백질 연결 담즙산 수용체 1[G protein-coupled bile acid receptor 1, GPBAR1], 뉴로메딘 B 수용체[neuromedin B receptor,

NMBR], 가스트린 방출 펩티드 수용체[gastrin releasing peptide receptor, GRPR], 봄베신 유사 수용체 3[bombesin like receptor 3, BRS3], 브래디키닌 수용체 B1[bradykinin receptor B1, BDKRB1], 브래디키닌 수용체 B2[BDKRB2], 칼시토닌 수용체[calcitonin receptor, CALCR], 칼시토닌 수용체 유사 수용체[CALCRL], 칼슘 감지 수용체[calcium sensing receptor, CASR], G 단백질 연결 수용체, 클래스 C[G protein-coupled receptor, class C, GPRC6A], 카나비노이드 수용체 1 (뇌)[cannabinoid receptor 1, CNR1], 카나비노이드 수용체 2[CNR2], 케메린 케모카인-유사 수용체 1[chemerin chemokine- like receptor 1, CMKLR1], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 1[chemokine (C－C motif) receptor 1, CCR1], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 2[CCR2], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 3[CCR3], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 4[CCR4], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 5(유전자/위유전자[pseudogene])[CCR5], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 6[CCR6], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 7[CCR7], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 8[CCR8], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 9[CCR9], 케모카인(C-C 모티프) 수용체 10[CCR10], 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 1[chemokine (C－X－C motif) receptor 1, CXCR1], 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 2[CXCR2], 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 3[CXCR3], 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 4[CXCR4], 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 5[CXCR5], 케모카인(C-X-C 모티프) 수용체 6[CXCR6], 케모카인(C-X3-C 모티프) 수용체 1[CX3CR1], 케모카인(C 모티프) 수용체 1[XCR1], 비전형성 케모카인 수용체 1(더피(Duffy)식 혈액군)[ACKR1], 비전형성 케모카인 수용체 2[ACKR2], 비전형성 케모카인 수용체 3[ACKR3], 비전형성 케모카인 수용체 4[ACKR4], 케모카인(C-C 모티프) 수용체-유사 2[CCRL2], 콜레시스토키닌 A 수용체[cholecystokinin A receptor, CCKAR], 콜레시스토키닌 B 수용체[CCKBR], G 단백질 연결 수용체 1[G protein-coupled receptor 1, GPR1], 봄베신 유사 수용체 3[BRS3], G 단백질 연결 수용체 3[GPR3], G 단백질 연결 수용체 4[GPR4], G 단백질 연결 수용체 6[GPR6], G 단백질 연결 수용체 12[GPR12], G 단백질 연결 수용체 15[GPR15], G 단백질 연결 수용체 17[GPR17], G 단백질 연결 수용체 18[GPR18], G 단백질 연결 수용체 19[GPR19], G 단백질 연결 수용체 20[GPR20], G 단백질 연결 수용체 21[GPR21], G 단백질 연결 수용체 22[GPR22], G 단백질 연결 수용체 25[GPR25], G 단백질 연결 수용체 26[GPR26], G 단백질 연결 수용체 27[GPR27], G 단백질 연결 수용체 31[GPR31], G 단백질 연결 수용체 32[GPR32], G 단백질 연결 수용체 33(유전자/위유전자)[GPR33], G 단백질 연결 수용체 34[GPR34], G 단백질 연결 수용체 35[GPR35], G 단백질 연결 수용체 37(엔도텔린 수용체 B-유사 유형)[GPR37], G 단백질 연결 수용체 37 유사 1[GPR37L1], G 단백질 연결 수용체 39[GPR39], G 단백질 연결 수용체 42(유전자/위유전자)[GPR42], G 단백질 연결 수용체 45[GPR45], G 단백질 연결 수용체 50[GPR50], G 단백질 연결 수용체 52[GPR52], G 단백질 연결 수용체 55[GPR55], G 단백질 연결 수용체 61[GPR61], G 단백질 연결 수용체 62[GPR62], G 단백질 연결 수용체 63[GPR63], G 단백질 연결 수용체 65[GPR65], G 단백질 연결 수용체 68[GPR68], G 단백질 연결 수용체 75[GPR75], G 단백질 연결 수용체 78[GPR78], G 단백질 연결 수용체 79[GPR79], G 단백질 연결 수용체 82[GPR82], G 단백질 연결 수용체 83[GPR83], G 단백질 연결 수용체 84[GPR84], G 단백질 연결 수용체 85[GPR85], G 단백질 연결 수용체 87[GPR87], G 단백질 연결 수용체 88[GPR88], G 단백질 연결 수용체 101[GPR101], G 단백질 연결 수용체 119[GPR119], G 단백질 연결 수용체 132[GPR132], G 단백질 연결 수용체 135[GPR135], G 단백질 연결 수용체 139[GPR139], G 단백질 연결 수용체 141[GPR141], G 단백질 연결 수용체 142[GPR142], G 단백질 연결 수용체 146[GPR146], G 단백질 연결 수용체 148[GPR148], G 단백질 연결 수용체 149[GPR149], G 단백질 연결 수용체 150[GPR150], G 단백질 연결 수용체 151[GPR151], G 단백질 연결 수용체 152[GPR152], G 단백질 연결 수용체 153[GPR153], G 단백질 연결 수용체 160[GPR160], G 단백질 연결 수용체 161[GPR161], G 단백질 연결 수용체 162[GPR162], G 단백질 연결 수용체 171[GPR171], G 단백질 연결 수용체 173[GPR173], G 단백질 연결 수용체 174[GPR174], G 단백질 연결 수용체 176[GPR176], G 단백질 연결 수용체 182[GPR182], G 단백질 연결 수용체 183[GPR183], G 단백질 연결 수용체 4를 함유하는 루신-풍부 반복부[leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4, LGR4], G 단백질 연결 수용체 5를 함유하는 루신-풍부 반복부[LGR5], G 단백질 연결 수용체 6을 함유하는 루신-풍부 반복부[LGR6], MAS1 원종양유전자[proto-oncogene][MAS1], MAS1 원종양유전자 유사물[MAS1L], MAS 관련 GPR족 D원[MAS related GPR family member D, MRGPRD], MAS 관련 GPR족 E원[MRGPRE], MAS 관련 GPR족 F원[MRGPRF], MAS 관련 GPR족 G원[MRGPRG], MAS 관련 GPR족 X1원[MRGPRX1) MAS 관련 GPR족 X2원[MRGPRX2], MAS 관련 GPR족 X3원[MRGPRX3], MAS 관련 GPR족 X4원[MRGPRX4], 옵신 3[opsin 3, OPN3], 옵신 4[OPN4], 옵신 5[OPN5], 푸린 수용체 P2Y[purinergic receptor P2Y, P2RY8], 푸린 수용체 P2Y[P2RY10], 미량 아민 연관 수용체 2[trace amine associated receptor 2, TAAR2], 미량 아민 연관 수용체 3(유전자/위유전자)[TAAR3], 미량 아민 연관 수용체 4[TAAR4P], 미량 아민 연관 수용체 5[TAAR5], 미량 아민 연관 수용체 6[TAAR6], 미량 아민 연관 수용체 8[TAAR8], 미량 아민 연관 수용체 9(유전자/위유전자)[TAAR9], G 단백질 연결 수용체 156[GPR156], G 단백질 연결 수용체 158[GPR158], G 단백질 연결 수용체 179[GPR179], G 단백질 연결 수용체, 클래스 C[GPRC5A], G 단백질 연결 수용체, 클래스 C[GPRC5B], G 단백질 연결 수용체, 클래스

C[GPRC5C], G 단백질 연결 수용체, 클래스 C[GPRC5D], 프리즐드 클래스 수용체 1[frizzled class receptor 1, FZD1], 프리즐드 클래스 수용체 2[FZD2], 프리즐드 클래스 수용체 3[FZD3], 프리즐드 클래스 수용체 4[FZD4], 프리즐드 클래스 수용체 5[FZD5], 프리즐드 클래스 수용체 6[FZD6], 프리즐드 클래스 수용체 7[FZD7], 프리즐드 클래스 수용체 8[FZD8], 프리즐드 클래스 수용체 9[FZD9], 프리즐드 클래스 수용체 10[FZD10], 평활화된(smoothened) 프리즐드 클래스 수용체[SMO], 보체 성분 3a 수용체 1[complement component 3a receptor 1, C3AR1], 보체 성분 5a 수용체 1[C5AR1], 보체 성분 5a 수용체 2[C5AR2], 코르티코트로핀 방출 호르몬 수용체 1[corticotropin releasing hormone receptor 1, CRHR1], 코르티코트로핀 방출 호르몬 수용체 2[CRHR2], 도파민 수용체 D1[dopamine receptor D1, DRD1], 도파민 수용체 D2[DRD2], 도파민 수용체 D3[DRD3], 도파민 수용체 D4[DRD4], 도파민 수용체 D5[DRD5], 엔도텔린 수용체 A형[endothelin receptor type A, EDNRA], 엔도텔린 수용체 B형[EDNRB], 포르밀 펩티드 수용체 1[formyl peptide receptor 1, FPR1], 포르밀 펩티드 수용체 2[FPR2], 포르밀 펩티드 수용체 3[FPR3], 유리 지방산 수용체 1[free fatty acid receptor 1, FFAR1], 유리 지방산 수용체 2[FFAR2], 유리 지방산 수용체 3[FFAR3], 유리 지방산 수용체 4[FFAR4], G 단백질 연결 수용체 42 (유전자/위유전자)[GPR42], 감마-아미노부티르산(GABA) B 수용체, 1[gamma-aminobutyric acid B receptor, 1, GABBR1], 감마-아미노부티르산(GABA) B 수용체, 2[GABBR2], 갈라닌 수용체 1[galanin receptor 1, GALR1], 갈라닌 수용체 2[GALR2], 갈라닌 수용체 3[GALR3], 성장 호르몬 분비촉진제 수용체[growth hormone secretagogue receptor, GHSR], 성장 호르몬 방출 수용체[growth hormone releasing hormone receptor, GHRHR], 위 억제 폴리펩티드 수용체[gastric inhibitory polypeptide receptor, GIPR], 글루카곤 유사 펩티드 1 수용체[glucagon like peptide 1 receptor, GLP1R], 글루카곤 유사 펩티드 2 수용체[GLP2R], 글루카곤 수용체[glucagon receptor, GCGR], 세크레틴 수용체[secretin receptor, SCTR], 여포자극 호르몬 수용체[follicle stimulating hormone receptor, FSHR], 황체형성 호르몬/융모생식샘자극호르몬 수용체[luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, LHCGR], 갑상선 자극 호르몬 수용체[thyroid stimulating hormone receptor, TSHR], 생식샘자극호르몬 방출 호르몬 수용체[gonadotropin releasing hormone receptor, GNRHR], 생식샘자극호르몬 방출 호르몬 수용체 2(위유전자)[GNRHR2], G 단백질 연결 수용체 18[GPR18], G 단백질 연결 수용체 55[GPR55], G 단백질 연결 수용체 119[GPR119], G 단백질 연결 에스트로겐 수용체 1[G protein-coupled estrogen receptor 1 GPER1], 히스타민 수용체 H1[histamine receptor H1, HRH1], 히스타민 수용체 H2[HRH2], 히스타민 수용체 H3[HRH3], 히스타민 수용체 H4[HRH4], 히드록시카르복실산 수용체 1[hydroxycarboxylic acid receptor 1, HCAR1], 히드록시카르복실산 수용체 2[HCAR2], 히드록시카르복실산 수용체 3[HCAR3], KISS1 수용체[KISS1 receptor, KISS1R], 류코트리엔 B4 수용체[leukotriene B4 receptor, LTB4R], 류코트리엔 수용체 2[LTB4R2], 시스테닐 류코트리엔 수용체 1[cysteinyl leukotriene receptor 1, CYSTR1], 시스테닐 류코트리엔 수용체 2[CYSTR2], 옥소아코사노이드(OXE) 수용체 1[oxoeicosanoid (OXE) receptor 1, OXER1], 포르밀 펩티드 수용체 2[FPR2], 리소포스파티드산 수용체 1[lysophosphatidic acid receptor 1, LPAR1], 리소포스파티드산 수용체 2[LPAR2], 리소포스파티드산 수용체 3[LPAR3], 리소포스파티드산 수용체 4[LPAR4], 리소포스파티드산 수용체 5[LPAR5], 리소포스파티드산 수용체 6[LPAR6], 스핑고신-1-인산염 수용체 1[sphingosine-1-phosphate receptor 1, S1PR1], 스핑고신-1-인산염 수용체 2[S1PR2], 스핑고신-1-인산염 수용체 3[S1PR3], 스핑고신-1-인산염 수용체 4[S1PR4], 스핑고신-1-인산염 수용체 5[S1PR5], 멜라닌 농축 호르몬 수용체 1[melanin concentrating hormone receptor 1, MCHR1], 멜라닌 농축 호르몬 수용체 2[MCHR2], 멜라노코르틴 1 수용체(알파 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체)[melanocortin 1 receptor, MC1R], 멜라노코르틴 2 수용체(아드레노코르티코트로픽 호르몬)[MC2R], 멜라노코르틴 3 수용체[MC3R], 멜라노코르틴 4 수용체[MC4R], 멜라노코르틴 5 수용체[MC5R], 멜라토닌 수용체 1A[MTNR1A], 멜라토닌 수용체 1B[MTNR1B], 대사형 글루탐산 수용체 1[glutamate receptor, metabotropic 1, GRM1], 대사형 글루탐산 수용체 2[GRM2], 대사형 글루탐산 수용체 3[GRM3], 대사형 글루탐산 수용체 4[GRM4], 대사형 글루탐산 수용체 5[GRM5], 대사형 글루탐산 수용체 6[GRM6], 대사형 글루탐산 수용체 7[GRM7], 대사형 글루탐산 수용체 8[GRM8], 모틸린 수용체[motilin receptor, MLNR], 뉴로메딘 U 수용체 1[neuromedin U receptor 1, NMUR1], 뉴로메딘 U 수용체 2[NMUR2], 뉴로펩티드 FF 수용체 1[neuropeptide FF receptor 1, NPFFR1], 뉴로펩티드 FF 수용체 2[NPFFR2], 뉴로펩티드 S 수용체 1[NPSR1], 뉴로펩티드 B/W 수용체 1[NPBWR1], 뉴로펩티드 B/W 수용체 2[NPBWR2], 뉴로펩티드 Y 수용체 Y1[NPY1R], 뉴로펩티드 Y 수용체 Y2[NPY2R], 뉴로펩티드 Y 수용체 Y4[NPY4R], 뉴로펩티드 Y 수용체 Y5[NPY5R], 뉴로펩티드 Y 수용체 Y6 (위유전자)[NPY6R], 뉴로텐신 수용체 1 (고친화도)[neurotensin receptor 1, NTSR1], 뉴로텐신 수용체 2[NTSR2], 아편유사제 수용체, 델타 1[opioid receptor, delta 1, OPRD1], 아편유사제 수용체, 카파 1[OPRK1], 아편유사제 수용체, mu 1[OPRM1], 아편 수용체-유사 1[OPRL1], 하이포크레틴(오렉신) 수용체 1[hypocretin receptor 1, HCRTR1], 하이포크레틴(오렉신) 수용체 2[HCRTR2], G 단백질 연결 수용체 107[GPR107], G 단백질 연결 수용체 137[GPR137], 후각수용체 51족 E아족 1원[olfactory receptor family 51 subfamily E member 1, OR51E1], 지방

세포 연관된 막관통 단백질 1[transmembrane protein, adipocyte associated 1, TPRA1], G 단백질 연결 수용체 143[GPR143], G 단백질 연결 수용체 157[GPR157], 옥소글루타레이트(알파-케토글루타레이트) 수용체 1[oxoglutarate receptor 1, OXGR1], 푸린 수용체 P2Y[purinergic receptor P2Y, P2RY1], 푸린 수용체 P2Y[P2RY2], 피리미딘성 수용체 P2Y[pyrimidinergic receptor P2Y, P2RY4], 피리미딘성 수용체 P2Y[P2RY6], 푸린 수용체 P2Y[P2RY11], 푸린 수용체 P2Y[P2RY12], 푸린 수용체 P2Y[P2RY13], 푸린 수용체 P2Y[P2RY14], 부갑상선 호르몬 1 수용체[parathyroid hormone 1 receptor, PTH1R], 부갑상선 호르몬 2 수용체[PTH2R], 혈소판-활성화 인자 수용체[platelet-activating factor receptor, PTAFR], 프로키네티신 수용체 1[prokineticin receptor 1, PROKR1], 프로키네티신 수용체 2[PROKR2], 프로락틴 방출 호르몬 수용체[prolactin releasing hormone receptor, PRLHR], 프로스타글란딘 D2 수용체(DP)[prostaglandin D2 receptor, PTGDR], 프로스타글린딘 D2 수용체 2[PTGDR2], 프로스타글린딘 E 수용체 1[PTGER1], 프로스타글란딘 E 수용체 2[PTGER2], 프로스타글란딘 E 수용체 3[PTGER3], 프로스타글란딘 E 수용체 4[PTGER4], 프로스타글란딘 F 수용체[PTGFR], 프로스타글란딘 12(프로스타시클린) 수용체 (IP)[PTGIR], 트롬복산 A2 수용체[thromboxane A2 receptor, TBXA2R], 응고인자 II 트롬빈 수용체[coagulation factor II thrombin receptor, F2R], F2R 유사 트립신 수용체 1[F2R like trypsin receptor 1, F2RL1], 응고인자 II 트롬빈 수용체 유사 2[F2RL2], F2R 유사 트롬빈/트립신 수용체 3[F2RL3], 피로글루타밀화 RF아미드 펩티드 수용체[pyroglutamylated RFamide peptide receptor, QRFPR], 릴랙신/인슐린-유사 족 펩티드 수용체 1[relaxin/insulin-like family peptide receptor 1, RXFP1], 릴랙신/인슐린-유사 족 펩티드 수용체 2[RXFP2], 릴랙신/인슐린-유사 족 펩티드 수용체 3[RXFP3], 릴랙신/인슐린-유사 족 펩티드 수용체 4[RXFP4], 소마토스타틴 수용체 1[somatostatin receptor 1, SSTR1], 소마토스타틴 수용체 2[SSTR2], 소마토스타틴 수용체 3[SSTR3], 소마토스타틴 수용체 4[SSTR4], 소마토스타틴 수용체 5[SSTR5], 숙신산염 수용체 1[succinate receptor 1, SUCNR1], 타키키닌 수용체 1[tachykinin receptor 1, TACR1], 타키키닌 수용체 2[TACR2], 타키키닌 수용체 3[TACR3], 맛 1 수용체 1원[taste 1 receptor member 1, TAS1R1], 맛 1 수용체 2원[TAS1R2], 맛 1 수용체 3원[TAS1R3], 맛 2 수용체 1원[TAS2R1], 맛 2 수용체 3원[TAS2R3], 맛 2 수용체 4원[TAS2R4], 맛 2 수용체 5원[TAS2R5], 맛 2 수용체 7원[TAS2R7], 맛 2 수용체 8원[TAS2R8], 맛 2 수용체 9원[TAS2R9], 맛 2 수용체 10원[TAS2R10], 맛 2 수용체 13원[TAS2R13], 맛 2 수용체 14원[TAS2R14], 맛 2 수용체 16원[TAS2R16], 맛 2 수용체 19원[TAS2R19], 맛 2 수용체 20원[TAS2R20], 맛 2 수용체 30원[TAS2R30], 맛 2 수용체 31원[TAS2R31], 맛 2 수용체 38원[TAS2R38], 맛 2 수용체 39원[TAS2R39], 맛 2 수용체 40원[TAS2R40], 맛 2 수용체 41원[TAS2R41], 맛 2 수용체 42원[TAS2R42], 맛 2 수용체 43원[TAS2R43], 맛 2 수용체 45원[TAS2R45], 맛 2 수용체 46원[TAS2R46], 맛 2 수용체 50원[TAS2R50], 맛 2 수용체 60원[TAS2R60], 갑상선 자극호르몬 방출 호르몬 수용체[thyrotropin- releasing hormone receptor, TRHR], 미량 아민 연관 수용체 1[trace amine associated receptor 1, TAAR1], 우로텐신 2 수용체[urotensin 2 receptor, UTS2R], 아르기닌 바소프레신 수용체 1A[arginine vasopressin receptor 1A, AVPR1A], 아르기닌 바소프레신 수용체 1B[AVPR1B], 아르기닌 바소프레신 수용체 2[AVPR2], 옥시토신 수용체[oxytocin receptor, OXTR], 아데닐산염 고리화효소 활성화 폴리펩티드 1(뇌하수체) 수용체 I형[adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I, ADCYAP1R1], 혈관작용성 장 펩티드 수용체 1[vasoactive intestinal peptide receptor 1, VIPR1], 혈관작용성 장 펩티드 수용체 2[VIPR2], 및 이들의 임의의 변이체로 이루어진 군에서 선택된 GPCR 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인을 포함한다.

[0139] 원형질막 단백질은 말초막에 부착되거나 일체형 막 단백질일 수 있다. 예를 들어, 문헌[Komath SS, Fujita M, Hart GW, et al. Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 12]에서의 개관 참조. GPI 고정은 번역후 변형 동안 글리코실포스파티딜이노시톨, 또는 GPI의 단백질의 C-말단으로의 부착을 지칭한다. 일부 구현예에서, 이종성 막 부착 서열은 GPI 닻 부착 서열이다. 그의 C-말단을 통해 GPI 닻에 부착되는 단백질은 전형적으로 외측의 지방 이중층에서 발견된다. GPI 닻은 I형 내재성 막 단백질의 단일 막관통 도메인에 대한 대안이다.

[0140] 이종성 GPI 닻 부착 서열은 임의의 알려진 GPI-고정된 단백질에서 유래될 수 있다(문헌[Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 11]에 개관되어 있음). 일부 구현예에서, 이종성 GPI 닻 부착 서열 CD14, CD16, CD48, DAF/CD55, CD59, CD80, CD87, 또는 TRAIL-R3에서 유래한 GPI 닻 부착 서열이다. 일부 구현예에서,

이종성 GPI 닻 부착 서열은 DAF/CD55에서 유래된다. 일부 구현예에서, 이종성 GPI 닻 부착 서열은 CD59에서 유래된다. 일부 구현예에서, 이종성 GPI 닻 부착 서열은 TRAIL-R3에서 유래된다. 예시적인 구현예에서, 이종성 GPI 닻 부착 서열은 DAF/CD55, CD59, 또는 TRAIL-R3에서 유래된다. 일부 구현예에서, 활성화 요소들 중 하나 또는 둘 모두는 이종 신호 서열을 포함하여, 세포 막에 대한 활성화 요소의 직접 발현을 돕는다. 패키징(packaging) 세포주에서 활성인 임의의 신호 서열이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 DAF/CD55 신호 서열이다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 CD59 신호 서열이다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 TRAIL-R3 신호 서열이다.

[0141] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 하나 이상의 야생형 인간 CD47 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 야생형 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 또는 269-289에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0142] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 막관통 도메인과 구조적으로 동등한 하나 이상의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 2의 아미노산 142-162, 177-197, 208-228, 236-257, 또는 269-289와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 막관통 도메인을 포함한다.

[0143] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포내 도메인은 야생형 인간 CD47 세포내 도메인이다. 일부 구현예에서, 야생형 세포내 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 290-323에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0144] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포내 도메인은 야생형 인간 CD47 세포내 도메인과 구조적으로 동등하다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질에서 인간 CD47 세포내 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 290-323과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0145] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0146] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0147] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0148] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0149] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0150] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0151] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 막관통 단백질이다. 막관통 단백질은 세포 막 전체에 걸쳐있고, 세포내 및 세포외 부분을 모두 갖는 내재성 막 단백질이다. 본원에서 사용된 바와 같이, '세포내 부분'은 CD47 세포내 도메인 및 분자에 존재하는 경우, 세포내 연결을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, '세포외 부분'은 CD47 세포외 도메인 및 분자에 존재하는 경우 세포외 연결을 포함할 수 있다.

[0152] 본원에서 사용된 바와 같이, 야생형 인간 CD47 세포외 도메인은 야생형 인간 CD47 단백질 동형체 중 임의의 하나의 세포외 도메인을 지칭한다. 야생형 인간 CD47 막관통 도메인은 야생형 인간 CD47 단백질 동형체 중 임의의 하나의 막관통 도메인을 지칭한다. 야생형 인간 CD47 세포내 도메인은 야생형 인간 CD47 단백질 동형체 중 임의의 하나의 세포내 도메인을 지칭한다.

[0153] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 인간 CD47 단백질, 조작된 인간화 CD47 단백질, 또는 조작된 부분적 인간화 CD47 단백질이다.

[0154] 본원에서 사용된 바와 같이, '인간화된' 또는 '인간화'는 조작된 CD47 단백질의 아미노산 서열이 인간에서 그의 면역원성을 감소시키도록 변형되는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '부분적으로 인간화된' 또는 '부분적 인간화'는 조작된 CD47 단백질의 아미노산 서열의 일부가 인간에서, 조작된 CD47 단백질의 면역원성을 감소시키도록 변형되는 것을 의미한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질의 세포외 도메인은 인

간에서 조작된 CD47 단백질의 면역원성을 감소시키도록 변형된다. 인간화는 일반적으로 비-인간 공급원에서 유래한 단백질 서열을, 자연 생성되는 이의 상대 단백질에 대한 유사성을 증가시키도록 변형함으로써 달성된다. 단백질을 인간화하기 위한 두 개의 주요 방법, 이론적 설계 및 경험적 방법이 사용되어 왔다. 이론적 설계 방법은, 단백질의 몇 가지 변이체를 생성하고 이들의 결합 또는 관심 대상의 임의의 다른 특성을 평가하는 단백질 구조 모델링으로 특징된다. 이론적 설계 방법과 대조적으로, 경험적 방법은 단백질의 구조 정보를 필요로 하지 않는다. 이 방법은 거대 조합 라이브러리의 생성 및 파지, 리보솜 또는 효모 디스플레이와 같은 풍부화 기술 또는 고속 대량 선별 기술에 의한 원하는 변이체들의 선발에 따라 달라진다. 이들 방법은 단백질 구조에서 돌연변이의 효과를 추정하기보다는 선발에 의존한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질의 인간화는 조작된 CD47 단백질 내 SIRPα 결합 영역의 인간 CD47 단백질상에서의 그래프팅(grafting)을 포함한다. 다른 구현예에서, 조작된 CD47 단백질의 인간화는 조작된 CD47 단백질에 하나 이상의 점 돌연변이를 도입하는 것을 포함하여, 조작된 CD47 단백질 내 하나 이상의 잔기(들)이 인간 CD47 단백질 내에서 상응하는 잔기로 치환되도록 한다.

[0155] 일부 구현예에서, 본 개시의 조작된 단백질은 SIRPα 항체를 포함하는 SIRPα 상호작용 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, SIRPα 항체는 표 3에서 선택된다.

[0156] [표 3] SIRPα 항체

[0157]

명칭	연관된 특허	비특허 문헌	회사/기관
ADU-1805	2020 US20220135671 2018 US20180312587 2018 US10851164	2019 Functional characterization of the selective pan-allele anti-SIRPα antibody ADU-1805 that blocks the SIRPα-CD47 innate immune checkpoint.	Aduro

Alector 특허 항-SIRPA	2022 US20220289844 2019 US20210277113 2019 US20190359707 2019 WO2019226973 2019 US11319373 2017 WO2018107058 2017 US20190275150		Alector
ALX Oncology 특허 항-SIRPα	2022 US20220242928 2022 US20220324996 2021 US20210363269 2021 US20220002434 2021 US11242404 2021 US20230018821 2021 WO2021247430 2020 US20200392199 2020 US20210070838 2020 US11208459 2019 US20190352419 2019 US11292850 2017 US20180105600 2017 US11401338		ALX Oncology

[0158]

Apexigen 특허 항-SIRPA	2021 WO2021174127		Apexigen
Arch Oncology 특허 항-SIRPA	2021 US20220226469 2021 WO2021222746 2019 WO2020102422 2019 US20200297842 2019 US11202828	2021 Novel SIRPα Antibodies That Induce Single-Agent Phagocytosis of Tumor Cells while Preserving T Cells.	Arch Oncology
BI 765063	2022 WO2022254379 2022 US20230012273 2022 US20220281991 2019 WO2019175218 2018 WO2019073080 2018 US20210179728 2017 WO2017178653 2017 US20190127477 2017 US11279766	2022 NCT05249426 Phase 1 A Study to Test Whether Different Combinations of BI 765063, Ezabenlimab, Chemotherapy, Cetuximab, and BI 836880 Help People With Head and Neck Cancer or Liver Cancer 2020 NCT04653142 Phase 1 A Study to Test Different Doses of BI 765063 Alone and in Combination With BI 754091 in Japanese Patients With Different Types of Advanced Cancer (Solid Tumors)	Boehringer OSE Immunotherapeutics
Bio-Thera 특허 항-SIRPA	2022 WO2022247933		Bio-Thera Solutions

[0159]

[0160]

Bioray Pharma 특허 항-SIRPA	2021 WO2022121980		Bioray Pharma Zheijang Hisun
Byondis 특허 항-SIRPA	2022 US20220195063 2019 US20210388107 2018 US20210070874 2018 US11274159		Byondis
CC-95251	2019 WO2020068752	2022 NCT05168202 Phase 1 A Study to Assess the Effect of CC-95251 in Participants With Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes 2019 NCT03783403 Phase 1 A Study of CC-95251, a Monoclonal Antibody Directed Against SIRPα, With Cetuximab in Subjects With Advanced Solid Cancers 2019 NCT03816254 Phase 1 A Study of CC-95251, a Monoclonal Antibody Directed Against SIRPα, With Cetuximab in Subjects With Advanced Solid Cancers	Celgene

ES004	2020 WO2021032078 2020 US20210347908		Elpiscience
Hospital for Sick Children 특허 항-SIRPA	2012 WO2013056352 2012 US20140242095		Toronto Hospital for Sick Children
Kobe U. 항-SIRPA	2021 WO2022102634 2019 WO2020013170 2019 US20210155707	2022 Anticancer efficacy of monotherapy with antibodies to SIRPα/SIRPβ1 mediated by induction of antitumorigenic macrophages. 2018 Anti-human SIRPα antibody is a new tool for cancer immunotherapy.	Daiichi Sankyo Kobe University
L & L Biopharma 특허 항-SIRPA알파	2021 WO2021185273		L&L Biopharma
Lanova 특허 항-SIRPA	2021 US20220169726 2020 WO2021129697		Lanova
Qure 특허 항-SIRPA	2021 WO2022110922		QureBio
Sairopa 특허 항-SIRPA	2022 US20220135677		Sairopa
Sound Biologics 특허 항-SIRPA	2020 WO2020180811 2020 US20220235144		Sound Biologics

[0161]

Stanford U. 특허 항-SIRPA	2021 US20210171654 2020 WO2021011912 2020 US20200262918 2018 US10487150 2018 WO2019023347 2018 US20190119396 2018 US10961318 2018 US20180319883 2018 US10781256 2017 US20180037652 2017 US10611842 2016 WO2016205042 2016 US20180171030 2016 US10618976 2015 WO2015138600 2015 US20170073414 2015 US10081680	2017 Anti-SIRPα antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity.	Forty Seven Stanford
Synthon 특허 항-SIRPA	2018 WO2018210795 2018 WO2018210793		Synthon
Electra 특허 항-SIRPA/SIRPB	2021 WO2021226576 2021 WO2021226591		Electra
Forty Seven 특허 항-SIRPA/ SIGLEC-10	2020 WO2020198353		Fort Seven
IMM2902		2022 NCT05076591 Phase 1 IMM2902, a HER2/SIRPα Bispecific mAb-Trap Antibody-receptor Fusion Protein, in Patients With HER2-expressing Advanced Solid Tumors	ImmuneOnco
Lanova 특허 항-SIRPA PD-L1	2021 WO2022127901		Lanova
OSE 특허 항-PD-1/ SIRPA	2019 US20220056135		OSE Immunotherapeutics

[0162]

[0163]

[0164] **글리코실화**

[0165] 인간 CD47 단백질은 글리코실화된다. 단백질 글리코실화는 글리칸(탄수화물, 사카라이드류, 또는 당류로도 명명

됨)의 단백질로의 공유결합 부착을 포함한다. 글리칸이 연결되는 아미노산 측쇄 원자를 기준으로, 대부분의 단백질 글리코실화는 N-연결 글리코실화 및 O-연결 글리코실화의 두 개의 범주에 속한다. N-연결 글리코실화에서, 글리칸은 보존된 공통 서열 Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa ≠ Pro)에서 아스파라긴의 측쇄 질소 원자에 부착되는 반면, O-연결 글리코실화에서, 글리칸은 히드록실 아미노산, 주로 세린 및 트레오닌 잔기의 측쇄 산소 원자에 부착된다.

[0166] 야생형 인간 CD47 단백질의 IgV 도메인은 N-글리코실화되어 있고, O-연결 글리코사미노글리칸으로 변형된다. 인간 CD47 단백질은 250kDa 초과(>250kDa)의 분자량을 갖는 프로테오글리칸으로서 발현될 수 있으며, 이는 Ser^{64} 및 Ser^{79}에서 헤파란 및 콘드로이틴 황산염 글리코사미노글리칸[glycosaminoglycan, GAG] 사슬을 모두 갖는다(문헌[Kaur et al., J. Biological Chemistry, 2011]). 헤파란 황산염[heparan sulfate, HSGAG] 및 콘드로이틴 황산염[chondroitin sulfate, CSGAG]은 골지체에서 합성되며, 여기서 조면소포체에서 제조된 단백질 코어는 글리코실전달효소에 의한 O-연결 글리코실화로 번역후 변형되어 프로테오글리칸을 형성한다. 추가적으로, N-연결 글리코실화는 인간 CD47 단백질에서 다섯 개의 잠재적 변형 부위 중 네 개(N^{16}, N^{32}, N^{55}, 및 N^{93})에서 확인되었다(문헌[Hatherley et al., Cell, 2008]). 본 문단에서 아미노산의 번호매김은 서열 번호 3(즉, 성숙한, 전장의 야생형 CD47)을 기준으로 한다.

[0167] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형 부위를 포함한다. 글리코실화 변형 부위는 글리칸에 대한 부착 부위로서의 역할을 할 수 있는 단백질 내 연속된 아미노산의 서열을 지칭한다. 글리코실화 변형 부위는 시퀀(sequon)으로도 명명된다. 일부 구현예에서, 야생형 인간 CD47 단백질의 글리코사미노글리칸 변형 부위 내의 하나 이상의 아미노산(들)은 조작된 CD47 단백질에서 결실 또는 치환된다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 글리코실화 부위(들)을 갖는다.

[0168] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형을 포함한다. 글리코실화 변형은 N 글리코실화, O 글리코실화, 포스포세린 글리코실화, 및 C 글리코실화를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5 개의 글리코실화 변형(들)을 갖는다.

[0169] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글루코사미노글리칸 변형 부위를 포함한다. 글루코사미노글리칸 변형 부위는 글루코사미노글리칸에 대한 부착 부위로서의 역할을 할 수 있는 단백질 내 연속된 아미노산의 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 야생형 인간 CD47 단백질의 글루코사미노글리칸 변형 부위 내의 하나 이상의 아미노산(들)은 조작된 CD47 단백질에서 결실 또는 치환된다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0 또는 1개의 글루코사미노글리칸 변형 부위를 갖는다.

[0170] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코사미노글리칸 사슬을 포함한다. 글루코사미노글리칸 사슬은 헤파란 황산염[HSGAG], 콘드로이틴 황산염[CSGAG], 케라탄 황산염, 및 히알루론산을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0 또는 1 개의 글루코사미노글리칸 측쇄를 갖는다.

[0171] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 두 개 미만의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 황산염 글루코사미노글리칸 변형 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 야생형 인간 CD47 단백질의 글루코사미노글리칸 변형 부위 내 하나 이상의 아미노산(들)은 조작된 CD47 단백질에서 결실 또는 치환된다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 하나의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 황산염 글루코사미노글리칸 변형 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 헤파란 및/또는 콘드로이틴 황산염 글루코사미노글리칸 변형 부위를 포함하지 않는다.

[0172] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 두 개 미만의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 황산염 글루코사미노글리칸 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0 또는 1 개의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 황산염 글루코사미노글리칸 사슬을 갖는다.

[0173] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 N-연결 글리코실화 부위를 포함한다. N-연결 글리코실화 부위는 사카라이드, 특히 N-글리칸에 대한 부착 부위로서의 역할을 할 수 있는 단백질 내 연속된 아미노산들의 서열이다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0, 1, 2, 3, 또는 4개의 N-연결 글리코실화 부위(들)을 갖는다.

[0174] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 적은 N-연결 글리코실화 변형을

포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 0, 1, 2, 또는 3개의 N-연결 글리코실화 변형(들)을 갖는다.

[0175] **조작된 CD47 단백질의 생물학적 활성**

[0176] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질과 기능적으로 동등하다. 본원에서 사용된 바와 같이, '기능적으로 동등한'은 야생형 인간 CD47 단백질의 적어도 하나의 유형의 생물학적 활성을 갖는 것을 지칭한다. 야생형 인간 CD47 단백질의 생물학적 활성 유형은 TSP-1, 인테그린, 또 다른 CD47 단백질, 또는 SIRPα와 상호작용하는 능력을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 조작된 CD47 단백질은 SIRPα에 결합할 수 있다.

[0177] TSP-1와의 상호작용

[0178] CD47에 대한 주요 분비 리간드는 트롬보스폰딘-1[thrombospondin-1, TSP-1]이다. TSP-1은 동종삼량체 당단백질이며, 이의 C-말단 도메인은 CD47에 대한 결합을 매개한다(문헌[Isenberg et al., 2009]). 트롬보스폰딘의 적어도 두 개의 추가 구성원이, 친화도가 더 적기는 하지만, CD47에 결합한다. TSP-1은 세포외 기질 당단백질의 트롬보스폰딘 족의 전형적인 구성원이며, 세포 운동성, 증식, 및 분화에 관련된다. CD47의 세포외 IgV 도메인은 TSP-1의 C-말단 세포 결합 도메인[C-terminal cell-binding domain, CBD]에 대한 수용체이다. 돌연변이유발 연구는 CD47의 헤파란 황산염 변형이 CD47과 TSP-1의 고친화도 상호작용에 필요하다는 것을 확립하였다(문헌[Kaur et al., 2011]).

[0179] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질에 비교하여 하나 이상의 트롬보스폰딘-1 결합 부위(들)을 결여한다. 일부 구현예에서, 야생형 인간 CD47 단백질의 TSP-1 부위 내에 있는 하나 이상의 아미노산(들)은 조작된 CD47 단백질에서 결실 또는 치환된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 TSP-1 결합 부위를 결여한 조작된 CD47 단백질은 하나 이상의 헤파란 황산염에 의해 글리코실화되지 않는다.

[0180] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질에 비교하여 TSP-1와 더 낮은 친화도로 결합한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 약 0.1 μM, 0.2 μM, 0.3 μM, 0.4 μM, 0.5 μM, 0.6 μM, 0.7 μM, 0.8 μM, 0.9 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM, 9 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM, 60 μM, 70 μM, 80 μM, 90 μM, 100 μM 초과의 K_D로 TSP-1에 결합한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 TSP-1에 결합할 수 없다.

[0181] 인테그린과의 상호작용

[0182] CD47의 초기 연구는 태반에서 정제된 CD47 단백질에 대해 발생된 단클론성 항체[monoclonal antibodies, mAbs]의 사용에 기반하였다. 이들 연구는 피브로넥틴, 피브리노겐, 비트로넥틴, 또는 콜라겐 유형 IV와 같은 RGD-함유 리간드 존재하에서 IgG-매개 식세포작용 반응을 향상시키는 데 있어 CD47의 역할을 보여주였다. 동일한 mAbs는 인터루킨 8[IL-8] 또는 세균 펩티드 N-포르밀-메티오닐-루실-페닐알라닌 [f-Met-Leu-Phe]에 의해 자극되는 호중구 경내피 이동을 차단하고, 종양 괴사 인자 α[tumor-necrosis-factor-α, TNFα] 자극된 내피 세포를 거치는 호중구 이동을 억제하는 것으로도 발견되었다. 이들 연구는 CD47이 호중구 및 내피 세포에 모두에서 중요하다는 것을 드러내었다. 상피 막 제조에서 발생되는, 다른 항-CD47mAbs의 생성은 CD47이 상피 세포 단층의 기저측 막에 존재하고, 호중구 또는 상피 세포에서 CD47을 차단하는 mAbs가 호중구의 경상피 이동을 지연시키며, 효율적인 호중구 주화성이 CD47의 증가된 호중구 세포 표면 발현과 연관된다는 것을 보여주었다. 기저막 단백질 엔탁틴은 RGD 서열을 함유하며, 시험관 내에서 CD47에 의존적인 방식으로 호중구 접착 및 주화성을 자극하는 것으로도 발견되었다. CD47-결핍 마우스의 생성은, 세균성 복막염에서 지연된 호중구 축적으로 인한 세균 감염에 대해 증가된 감수성을 나타냄으로써, 호중구 염증 반응을 조절하는 데 대한 이 단백질의 중요성을 추가로 입증하였다. CD47-결핍 호중구는 또한 크게 손상된 RGD-자극 호중구 부착, 식세포작용, 및 호흡폭발을 나타낸다. 세포외 기질 단백질 비트로넥틴에 대한 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린-매개 세포 반응의 경우, CD47은, 비트로넥틴 코팅된 비즈에 대한 $\alpha_v\beta_3$-매개 결합에 필요하지만, 비트로넥틴 코팅된 표면에 대한 $\alpha_v\beta_3$-매개 접착에는 필요하지 않은 것으로 발견되었다. $\alpha_v\beta_3$ 인테그린과 이의 원래의 회합에 추가하여, CD47은 혈소판상에서 인테그린 $\alpha_2\beta_1$ 및 $\alpha IIb\beta_3$, 평활근 세포상에서 $\alpha_2\beta_1$ 인테그린, 낫형 적혈구 세포 및 B 림프구상에서 $\alpha_4\beta_1$ 인테그린, 소교세포에서 $\alpha_6\beta_1$ 인테그린, 및 연골세포에서 α_5 인테그린과 상호작용하고, 이를 조절하는 것으로 나타났다.

[0183] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질에 비교하여 하나 이상의 인테그린 결합 부위

(들)을 결여한다. 일부 구현예에서, 야생형 인간 CD47 단백질의 인테그린 결합 부위 내에 있는 하나 이상의 아미노산(들)은 조작된 CD47 단백질에서 결실 또는 치환된다.

[0184] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질에 비교하여 인테그린과 더 낮은 친화도로 결합한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 약 0.1 μM, 0.2 μM, 0.3 μM, 0.4 μM, 0.5 μM, 0.6 μM, 0.7 μM, 0.8 μM, 0.9 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM, 9 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM, 60 μM, 70 μM, 80 μM, 90 μM, 100 μM 초과의 K_D로 인테그린에 결합한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인테그린에 결합할 수 없다.

[0185] 일부 구현예에서, 인테그린은 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린, $\alpha IIb\beta_3$ 인테그린, $\alpha_2\beta_1$ 인테그린, $\alpha_4\beta_1$ 인테그린, $\alpha_6\beta_1$ 인테그린, 및 α_5 인테그린으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0186] SIRP 단백질과의 상호작용

[0187] 신호 조절 단백질 [signal regulator protein, SIRP] 족은 세 개의 구성원을 함유하며, 이들 중 SIRPα 및 SIRPγ는 알려진 CD47 수용체이다. SIRP 단백질은 세포 표면 당단백질의 Ig 족에 속하고, 확인된 제1원은 SIRPα(SHPS-1, CD172a, BIT, MFR, 또는 P84로도 알려짐)였다. SIRPα는 골수 세포 및 신경 세포뿐아니라 내피 세포 및 섬유아세포에서도 고도로 발현되고, 하나의 원위 IgV-유사 도메인 및 두 개의 막 근위 IgC-유사 도메인인, 세 개의 세포외 Ig-유사 도메인을 갖는다. 추가로, 단지 하나의 IgV 도메인을 갖는 선택적으로 스플라이싱된 형태 또한 보고되었다. 이의 세포내 꼬리에서, SIRPα는 두 개의 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 [immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, ITIMs]를 가지며, 인산화된 경우, Src 상동성 2[Src homology 2, SH2] 도메인-함유 단백질-티로신 인산염분해효소 SHP-1 및 SHP-2에 결합할 수 있다. SIRPα에 대한 추가의 세포질 결합 상대는, 연결자 분자들 Src 키나제-연관 단백질 55 kDa 동족체/SKAP2(SKAP55hom/R), Fyn-결합 단백질/SLP-76-연관 인단백질 130 kDa (FYB/SLAP-130), 및 티로신 키나제 PYK2이다. SIRPα는 또한 인슐린, EGF, 및 bPDGF 수용체의 키나제 활성에 대한 기질이다. 섬유아세포에서 SIRPα의 과발현은 인슐린, EGF, 및 bPDGF에 반응한 다른 하류에서의 현상, 및 증식을 감소시킨다. SIRPα는 M-CSF 수용체 c-fms과 구성적으로 회합되기 때문에, SIRPα 과발현은 v-fms 표현형을 부분적으로 역전시킨다.

[0188] CD47은 SIRPα에 대한 리간드이다. CD47 또는 SIRPα의 글리코실화는 이들의 상호작용에 필수로 여겨지지는 않지만, SIRPα의 N-글리코실화 수준은 상호작용에 중요한 영향을 미쳐서, 과도한 글리코실화는 CD47의 결합을 감소시킨다. CD47 IgV 도메인 내의 Cys^{33}과 CD47 막관통 도메인 내 Cys^{263} 사이의 긴 범위의 이황화 결합 또한, SIRPα에 대한 결합을 향상시키는, CD47 IgV 도메인의 배향을 확립하는데 중요하다. 본 문단에서 아미노산의 번호매김은 서열 번호 3(즉, 성숙한, 야생형의 전장 CD47 단백질)을 기준으로 한다.

[0189] CD47 및 CD47/SIRPα 복합체의 구조는 밝혀져 있다(문헌[Hatherley et al., 2008]). 서열 번호 3의 아미노산 92-100 및 103-113에 상응하는 두 개의 β-가닥이 CD47/SIRPα 상호작용의 핵심에 있는 것으로 확인되었다. 서열 번호 3의 아미노산 97(Glu), 99(Thr), 100(Glu), 103(Arg), 104(Glu) 및 106(Glu)은 CD47/SIRPα 상호작용에서 접촉 잔기로 확인되었으며, CD47의 SIRPα에 대한 결합 친화도에 일조한다(문헌(Hatherley et al., 2008]). 바람직한 구현예에서, 두 개의 β-가닥 및 이들 내의 여섯 개의 접촉 잔기는 SIRPα 결합 능력을 유지하기 위해 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질에서 유지된다.

[0190] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 그의 세포외 도메인에 적어도 하나의 SIRPα 상호작용 모티프를 포함한다. 일부 구현예에서, 서열 번호 3의 아미노산 97, 99, 100, 103, 104, 106에 상응하는 아미노산은 조작된 CD47 단백질 내에 보유된다. 일부 구현예에서, 두 개의 β-가닥은 조작된 CD47 단백질에 보유된다.

[0191] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부 내에 있는 시스테인과 인간 CD47 막관통 도메인(들) 내에 또는 사이에 있는 시스테인 사이의 이황화 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 두 개의 시스테인은 세포외 도메인의 Cys^{33} 및 막관통 도메인의 Cys^{263}이고, 여기서 번호매김은 서열 번호 3을 기준으로 한다.

[0192] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 SIRPα와 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질과 유사한 결합 친화도로 SIRPα에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 약 0.01 μM, 0.02 μM, 0.03 μM, 0.04 μM, 0.05 μM, 0.06 μM, 0.07 μM, 0.08 μM, 0.09 μM, 0.1 μM, 0.2 μM, 0.3 μM, 0.4 μM, 0.5 μM, 0.6 μM, 0.7 μM, 0.8 μM, 0.9 μM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μ

M, 5 μM 미만의 K_D로 SIRPα에 결합한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 높은 결합 친화도로 SIRPα에 결합할 수 있다.

[0193] 직접 결합 연구는 TSP-1이 CD47을 발현하는 세포에 대한 SIRPα 결합을 억제한다는 것을 입증한다(문헌[Isenberg et al., 2009]). 이 데이터는 TSP-1 및 SIRPα의 CD47 상의 단일 부위에 대한 경쟁적 결합, 별개지만 근위 부위에 대한 결합의 입체 억제, 또는 다른자리입체성 억제와 일치한다. Ser^{64}에서 헤파란 황산염 사슬을 사용한 글리코실화는 TSP-1 결합에는 필요하지만, SIRPα 결합에는 필요하지 않다(문헌[Soto-Pantoja et al., 2015]). 따라서, 일부 구현예에서 Ser^{64}에서 글리코실을 결여한 조작된 CD47 단백질은, TSP-1 결합이 방해되기 때문에, 향상된 SIRPα 결합능을 갖는다.

[0194] CD47/SIRPα 상호작용은 많은 신체계, 예컨대 림프구 항상성, 수지상 세포[DC] 성숙 및 활성화, 이차 림프구 기관에서의 특정 DC 소집단의 적절한 국재화 및 세포 이행[transmigration]을 조절하는 면역계에서 다수의 세포내 상호작용을 조절한다. CD47/SIRPα 상호작용은 또한 신경계의 세포를 조절한다. 이 두 단백질 사이의 상호작용은 뼈 재형성에서도 중요한 역할을 한다. CD47/SIRPα 상호작용에 의해 조절되는 세포 반응은 종종 두 수용체를 통한 양방향 신호전달에 따라 달라진다.

[0195] 숙주 세포상에서 CD47은 '자기 마커'로 기능할 수 있고, 억제성인 '나를 죽이지 말라'는 신호를 전달하기 위해 순환 면역 세포 표면상에서 SIRPα에 결합함으로써 식세포 작용을 조절한다. 상기 개시된 바와 같이, SIRPα는 대식세포 및 수지상 세포의 표면에서 발현되는 Ig-초족 수용체를 암호화하며, 그의 세포질 영역은 식세포 작용을 억제하기 위해 연쇄반응을 촉발할 수 있는 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프[ITIM]를 함유한다. CD47-SIRPα 결합은 SIRPα상에서 ITIMs의 인산화를 일으키며, 이는 SHP1 및 SHP2 Src 상동성 인산염분해효소의 유인을 촉발시킨다. 이러한 인산염분해효소는 결과적으로 식세포 시냅스에서 미오신 II의 축적을 억제하여, 식세포 작용을 방지한다(문헌[Fujioka et al., 1996]). 대식세포에 의한 표적 세포의 식세포 작용은 본질적으로 활성화 신호(예를 들어, FcγR, CRT, LRP-1)와 억제 신호(예를 들어, SIRPα-CD47)의 균형에 의해 조절된다. CD47의 상승된 발현은 세포가 면역감시 및 후속 파괴를 회피하도록 도울 수 있다. CD47의 상승된 발현은 세포가 선천성 면역 세포 사멸을 회피하도록 도울 수 있다.

[0196] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 관용원성 인자이다. 본원에 사용된 바와 같이, 관용원성 인자는, 정상 면역 반응의 병적 또는 바람직하지 않은 활성화가 있을 때, 면역관용을 유도하는 작용제이다. 이는, 예를 들어, 환자가 동종이계 이식 또는 동종이계 세포 치료법을 받은 후에, 공여자 항원에 대한 면역 반응이 발생할 때, 또는 신체가 자가면역 질환에 관련된 자기-항원에 부적절하게 반응할 때, 일어날 수 있다. 일부 구현예에서, '관용원성 인자'는 저면역 인자, 보체 억제제, 및 투여, 이식 또는 생착시 숙주 또는 수용자 대상의 면역계에 의해 인식되는 세포의 능력을 조절하거나 이에 영향을 미치는 다른 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 추가의 기능을 달성하기 위해 유전자 변형된다.

[0197] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 식세포 작용, 세포독성제의 방출, 및/또는 세포-매개 사멸의 다른 메커니즘을 억제할 수 있다.

[0198] CD47 분자 간의 상호작용

[0199] 또한, 임의의 알려진 CD47 리간드의 부재하에 CD47이 세포 접착 상호작용을 매개하는 것으로 나타났다. CD47을 필요로 하지만, 이의 알려진 리간드 중 어느 것도 필요로 하지 않는 이러한 세포-세포 접착은, 동형 결합이 또한 대향 세포 상에서 CD47의 IgV 도메인 사이에서 발생할 수 있음을 시사한다(문헌[Rebres et al., 2005]). 이러한 상호작용은 세포-세포 접착을 매개하기 위해 미확인된 트립신-민감성 단백질(X)을 필요로 할 수 있지만, 이러한 세포-세포 상호작용 및 단백질 가수분해에 의해 방출된 CD47 IgV 도메인(문헌[Maile et al., 2010]) 또는 엑소좀 내의 CD47(문헌[Kaur et al., 2014])의 세포 표면 CD47에 대한 동형 결합이 CD47 신호 전달을 유발할 수 있다는 가능성을 고려해야 한다. 그러나 CD47-CD47 결합 및 동형 CD47 결합으로 인한 신호전달에 대한 직접적인 증거는 없다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 또 다른 CD47 분자와 상호작용할 수 없다.

[0200] **III. 폴리뉴클레오티드**

[0201] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0202] 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드는(예를 들어, DNA 라이브러리로부터) 클로닝된 DNA에서, 화학적 합성에 의해, cDNA 클로닝에 의해, 또는 원하는 세포로부터 정제된 유전체 DNA 또는 그의 단편의 클로닝에 의해 수득될

수 있다. 폴리뉴클레오티드가 재조합 수단에 의해 생산되는 경우, 원하는 유전자를 암호화하는 핵산의 확인을 위해 당업자에게 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다. 당업계에서 이용 가능한 임의의 방법을 사용하여, 예컨대 세포 또는 조직 공급원에서, 원하는 인간 CD47 단백질을 암호화하는 전장(즉, 전체 코딩 영역을 포함) cDNA 또는 유전체 DNA를 수득할 수 있다. 본원에서 제공되는 것과 같은 CD47의 절두된 형태를 포함하는 변형된 폴리뉴클레오티드 또는 변이체 폴리뉴클레오티드는 표준 재조합 DNA 방법을 사용하여 야생형 폴리뉴클레오티드로부터 조작될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 핵산 분자를 클로닝 및 단리하기 위해 당업계에 알려진 임의의 이용 가능한 방법을 사용하여 클로닝 또는 단리될 수 있다. 이러한 방법은 핵산의 PCR 증폭 및 핵산 혼성화 선별, 항체 기반 선별 및 활성 기반 선별을 포함하는 라이브러리의 선별을 포함한다.

[0203] 예를 들어 중합효소 연쇄 반응[PCR] 방법을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 증폭 방법이 원하는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 단리하기 위해 사용될 수 있다. PCR은 당업계에 알려진 임의의 방법 또는 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 예시적인 방법은 Perkin-Elmer Cetus 열 순환기 및 Taq 중합효소(Gene Amp)의 사용을 포함한다. 원하는 폴리펩티드 암호화 핵산 분자가 증폭될 수 있는 공급원 재료로서, 관심 유전자를 함유하는 핵산이 사용될 수 있다. 예를 들어, DNA 및 mRNA 제제, 세포 추출물, 적절한 공급원(예를 들어, 고환, 전립선, 유방)에서부터의 조직 추출물, 유체 샘플(예를 들어, 혈액, 혈청, 타액), 건강한 및/또는 병든 대상에서부터의 시료가 증폭 방법에 사용될 수 있다. 공급원은 임의의 진핵 생물 종에서 유래할 수 있으며, 이는 척추동물, 포유동물, 인간, 돼지, 소, 고양이, 조류, 말, 개 및 기타 영장류 공급원을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 핵산 라이브러리도 공급원 재료로서 사용될 수 있다. 프라이머는 원하는 폴리뉴클레오티드를 증폭하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 원하는 폴리뉴클레오티드가 생성되는 발현된 서열을 기준으로 설계될 수 있다. 프라이머는 폴리펩티드 아미노산 서열의 역번역[back-translation]을 기준으로 설계될 수 있다. 원하는 경우, 축퇴성 프라이머를 증폭에 사용할 수 있다. 원하는 서열의 3' 및 5' 말단에서 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 프라이머는 핵산 시료에서부터 PCR에 의해 증폭하기 위한 프라이머로 사용할 수 있다. 프라이머는 전체 전장 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 절두된 서열을 증폭시키는 데 사용될 수 있다. 증폭에 의해 생성된 핵산 분자는 서열결정되고, 원하는 폴리펩티드를 암호화하는 것으로 확인될 수 있다.

[0204] **IV. 벡터**

[0205] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0206] 벡터 내로 DNA 단편을 삽입하기 위한 당업자에게 알려진 임의의 방법이 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 작제하는 데 사용될 수 있다. 이들 방법은 시험관내 재조합 DNA 및 합성 기술, 및 생체내 (유전자) 재조합을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 조작된 CD47 단백질의 발현을 보장하기 위해 발현 벡터(들) 내의 제어 서열에 함께 작동 가능한 상태로 연결될 수 있다. 이러한 제어 서열은 리더(leader) 또는 신호 서열, 프로모터(예를 들어, 자연적으로 연관된 또는 이종 프로모터), 리보솜 결합 부위, 인핸서 또는 활성자 요소, 번역 개시 및 종결 서열, 및 전사 개시 및 종결 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않고, 조작된 CD47 단백질을 발현하도록 선택된 숙주 세포와 상용성이도록 선택된다. 당업계에 알려진 항구적 프로모터 또는 유도성 프로모터도 또한 고려된다. 프로모터는 자연 발생 프로모터, 하나 초과의 프로모터의 요소들을 조합한 혼성 프로모터, 또는 합성 프로모터일 수 있다. 발현 작제물은 플라스미드와 같은 에피솜 상의 세포에 존재할 수 있거나, 발현 작제물은 염색체, 예컨대 유전자좌에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 허용하는 선택가능한 마커 유전자를 포함한다. 일부 구현예는 적어도 하나의 조절 제어 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 본원에서의 사용을 위한 조절 제어 서열은 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현 벡터는 형질전환될 숙주 세포, 발현하고자 하는 특정 변이체 폴리펩티드, 벡터의 복제 수, 그 복제 수를 제어하는 능력, 및/또는 항생제 마커와 같은 벡터로 암호화된 임의의 다른 단백질의 발현의 선택을 위해 설계된다.

[0207] 적합한 포유동물 프로모터의 예는 예를 들어, 아래 유전자 유래의 프로모터: 신장 인자 1 α[elongation factor 1 alpha, EF1α], CAG 프로모터, 햄스터의 유비퀴틴/S27a 프로모터(제WO97/15664호), 유인원 공포 바이러스 40[Simian vacuolating virus 40, SV40] 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, 라우스 육종 바이러스[Rous Sarcoma Virus, RSV]의 긴 말단 반복 영역, 마우스 유방 종양 바이러스 프로모터[mouse mammary tumor virus promoter, MMTV], 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 긴 말단 반복 영역, 및 인간 거대세포바이러스[Cytomegalovirus, CMV]의 초기 프로모터를 포함한다. 다른 이종 포유동물 프로모터의 예는 액틴, 면역글로불린 또는 열 충격 프로모터(들)이다. 추가의 구현예에서, 포유동물 세포에 사용하기

위한 프로모터는 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스(1989년 7월 5일 공개된 제UK2,211,504호), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 거대세포바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 유인원 바이러스 40[SV40]과 같은 바이러스의 유전체에서 수득될 수 있다. 추가 구현예에서, 이종 포유동물 프로모터가 사용된다. 예로는 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터 및 열 충격 프로모터가 있다. SV40의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기원을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다(문헌[Fiers et al., Nature 273: 113-120 (1978)]). 인간 거대세포바이러스의 즉시 초기 프로모터는 HindIII 제한 효소 단편으로서 편리하게 수득된다(문헌[Greenaway et al., Gene 18: 355-360 (1982)]). 상기 참고문헌은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0208] 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화된, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다.

[0209] 벡터는 바이러스 벡터 및 플라스미드 DNA를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 및 아데노-연관 바이러스 벡터를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 발현 벡터는 원하는 DNA 서열로 형질전환된 세포의 검출을 허용하도록, 예컨대 암피실린 내성, 히그로마이신 내성, 테트라사이클린 내성, 카나마이신 내성, 또는 네오마이신 내성과 같은 선발 마커를 함유한다. 적합한 벡터, 프로모터 및 인핸서 요소는 당업계에 알려져 있으며, 본 재조합 작제물의 제조를 위한 다수가 시판된다. 일부 구현예에서, 벡터는 다중시스트론성 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 이중시스트론성 벡터 또는 삼중시스트론성 벡터이다. 이중시스트론성 또는 멀티시스트론성[multicistronic] 발현 벡터는 (1) 각각의 오픈 리딩 프레임에 융합된 다수의 프로모터, (2) 유전자 사이의 스플라이싱 신호의 삽입, (3) 단일 프로모터에 의해 발현이 유도되는 유전자의 융합, 및 (4) 유전자 사이의 단백질 분해 절단 부위의 삽입(자기-절단 펩티드) 또는 유전자 사이의 내부 리보솜 진입 부위[internal ribosome entry sites, IRES]의 삽입을 포함할 수 있다.

[0210] 다중시스트론성 벡터를 사용하여 동일한 세포에서 여러 유전자를 공동 발현한다. 멀티시스트론성 벡터를 작제하는 데 가장 일반적으로 사용되는 전략은 두 가지이다. 먼저, 내부 리보솜 진입 부위[IRES]가 이중시스트론성 벡터에 통상적으로 사용된다. 또 다른 리보솜 유인 부위로서 작용하는 IRES 요소는 mRNA의 내부 영역에서부터 번역의 개시를 가능하게 한다. 따라서, 두 개의 단백질이 하나의 mRNA에서 번역된다. IRES 요소는 상당히 크다(보통 500-600 bp)(문헌[Pelletier et al., 1988; Jang et al., 1988]). 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질은 야생형 전장 인간 CD47에 비해 더 작은 크기를 가지며, 따라서 제한된 패키징 능력을 갖는 멀티시스트론성 벡터에서 IRES 요소와 함께 사용될 수 있다.

[0211] 두 번째 전략은 '자기-절단' 2A 펩티드에 의존한다. 피코르나바이러스에서 처음 발견된 이 펩티드는 짧고(약 20개의 아미노산), 동일한 mRNA에서 등몰 수준의 다수의 유전자를 생성한다. 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩티드 결합의 합성을 건너뛰게 만듦으로써 기능하여, 2A 서열의 단부와 다음 펩티드 하류 사이의 분리를 유도하는 것으로 여겨지므로, 용어 '자기-절단'이 완전히 정확한 것은 아니다(문헌[Kim et al., 2011]). '절단'은 C-말단에서 발견되는 글리신과 프롤린 잔기 사이에서 발생한다. 따라서 상류 시스트론은 단부에 몇 개의 추가 잔기가 추가되는 반면, 하류 시스트론은 프롤린으로 시작할 것이다.

[0212] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 맥락에서 사용된 다중시스트론성 벡터는 미국 출원 제63/270,956호 및 제63/222,954호에 기재된 다중시스트론성 벡터이다.

[0213] 일부 구현예에서, 본원의 벡터는 세포 내 또는 세포의 유전체 내를 포함하여, 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자이다. 전달된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결되고, 예를 들어, 그 안에 삽입된다. 벡터는 세포에서 자율 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA로의 통합을 허용하기에 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는 예를 들어, 플라스미드(예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 전위인자, 코스미드, 세균 인공 염색체 및 바이러스 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터는 예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 포함한다. 비-바이러스 벡터는 핵산 분자의 세포 내로의 진입을 용이하게 하기 위해 전달 비히클을 필요로 할 수 있다.

[0214] 바이러스 벡터는 전형적으로 핵산 분자의 전달 또는 세포의 유전체 내로 또는 핵산 전달을 매개하는 바이러스 입자로의 통합을 용이하게 하는 바이러스-유래 핵산 요소를 포함하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 바이러스 입자는 전형적으로 핵산(들)에 더하여 다양한 바이러스 구성요소 및 때때로 숙주 세포 구성요소를 또한 포함할 것이다. 바이러스 벡터는 예를 들어, 핵산을 세포 내로, 또는 (예를 들어, 네이키드(naked) DNA로서) 전달된 핵산

으로 전달할 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터 및 전달 플라스미드는 주로 바이러스에서 유래한 구조적 및/또는 기능적 유전 요소를 포함할 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 주로 레트로바이러스에서 유래한, 구조적 및 기능적 유전 요소를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드, 또는 이의 일부를 포함할 수 있다.

[0215] 본원에 기재된 일부 벡터에서, 복제에 기여하거나 복제에 필수적인 하나 이상의 단백질 암호화 영역의 적어도 일부는 상응하는 야생형 바이러스와 비교하여 부재할 수 있다. 이는 바이러스 벡터 복제-결함을 만든다. 일부 구현예에서, 벡터는 표적 비-분열 숙주 세포를 형질도입하고/하거나 이의 유전체를 숙주 유전체 내로 통합할 수 있다.

[0216] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 핵산은 5' 프로모터(예를 들어, 전체 패키징된 RNA의 발현을 제어하기 위해), 5' LTR(예를 들어, R(폴리아데닐화 꼬리 신호) 및/또는 프라이머 활성화 신호를 포함하는 U5 포함), 프라이머 결합 부위, psi 패키징 신호, 핵 유출을 위한 RRE 요소, 이식유전자 발현을 제어하기 위한 이식유전자의 바로 상류에 있는 프로모터, 이식유전자(또는 다른 외인성 작용제 요소), 폴리푸린관, 및 3' LTR(예를 들어, 성숙된 U3, R, 및 U5 포함) 중 하나 이상(예를 들어, 전부)을 포함한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 핵산은 cPPT, WPRE, 및/또는 절연체 요소(예를 들어, 문헌[Browning et al., "Insulators to Improve the Safety of Retroviral Vectors for HIV Gene Therapy," Biomedicines, 4(1):4 (2016)]에 기재된 바와 같음) 중 하나 이상을 더 포함한다.

[0217] 레트로바이러스는 전형적으로 유전체 RNA를 선형 이중 가닥 DNA 복제물로 역전사함으로써 복제하고, 이어서 이의 유전체 DNA를 숙주 유전체에 공유적으로 통합한다. 야생형 레트로바이러스 유전체의 구조는 종종 이들 사이에 또는 그 안에 유전체가 패키징될 수 있도록 하는 패키징 신호가 위치된 5' 긴 말단 반복부[long terminal repeats, LTR]와 3' LTR, 프라이머 결합 부위, 숙주 세포 유전체로의 통합을 가능하게 하는 통합 부위, 및 바이러스 입자의 조립을 촉진하는 패키징 성분을 암호화하는 gag, pol 및 env 유전자를 포함한다. 더 복잡한 레트로바이러스는 HIV 내의 rev 및 RRE 서열과 같은 추가 특징을 가지며, 이는 통합된 프로바이러스의 RNA 전사체가 감염된 표적 세포의 핵에서 세포질로 효율적으로 유출되는 것을 가능하게 한다. 프로바이러스에서, 바이러스 유전자는 긴 말단 반복부[LTR]로 명명되는 영역에 의해 양쪽 단부에서 측면 근접된다. LTR은 프로바이러스 통합 및 전사에 관여한다. LTR은 또한 인핸서-프로모터 서열로서 역할을 하며, 바이러스 유전자의 발현을 제어할 수 있다. 레트로바이러스 RNA의 캡슐화는 바이러스 유전체의 5' 단부에 위치한 psi 서열에 의해 발생한다.

[0218] LTR 자체는 전형적으로 U3, R 및 U5로 명명되는 세 개의 요소로 나뉠 수 있는 유사한(예를 들어, 동일한) 서열이다. U3은 RNA의 3' 단부에 독특한 서열로부터 유래된다. R은 RNA의 양 단부에서 반복된 서열에서 유래되고, U5는 RNA의 5' 단부에 독특한 서열에서 유래된다. 이러한 세 개 요소의 크기는 상이한 레트로바이러스 중에서 상당히 달라질 수 있다.

[0219] 바이러스 전사체의 경우, 전사 개시 부위는 전형적으로 하나의 LTR에서 U3과 R 사이의 경계에 있고, 폴리 (A) 부가(종결) 부위는 다른 LTR에서 R과 U5 사이의 경계에 있다. U3은 세포 및 일부 경우에 바이러스 전사 활성자 단백질에 반응성인 프로모터 및 다중 인핸서 서열을 포함하는, 프로바이러스의 전사 제어 요소의 대부분을 함유한다. 일부 레트로바이러스는 유전자 발현의 조절에 관련된 단백질을 코딩하는 유전자들 tot, rev, tax 및 rex 중 임의의 하나 이상을 포함한다.

[0220] 구조 유전자 gag, pol 및 env와 관련하여, gag는 바이러스의 내부 구조 단백질을 암호화한다. Gag 단백질은 성숙한 단백질인, 단백질 MA[매트릭스(matrix)], CA[캡시드(capsid)] 및 NC[뉴클레오캡시드]로 단백질 분해 처리된다. pol 유전자는 DNA 중합효소를 함유하는 역전사효소[reverse transcriptase, RT], 유전체의 복제를 매개하는, 연관된 RNase H 및 통합효소[integrase, IN]를 암호화한다. 일부 구현예에서, env 유전자는 세포 수용체 단백질과 특이적으로 상호작용하는 복합체를 형성하는, 비리온의 표면[SU] 당단백질 및 막관통[TM] 단백질을 암호화한다. 이러한 상호작용은 예를 들어, 바이러스 막과 세포막의 융합에 의해 감염을 촉진한다.

[0221] 복제-결함 레트로바이러스 벡터 유전체에서 gag, pol 및 env는 부재하거나 또는 기능하지 않을 수 있다. RNA의 양쪽 단부에서의 R 영역은 전형적으로 반복된 서열이다. U5 및 U3은 각각 RNA 유전체의 5' 및 3' 단부에서 독특한 서열을 나타낸다. 레트로바이러스는 또한 gag, pol 및 env 이외의 단백질을 코딩하는 추가 유전자를 함유할 수 있다. 추가 유전자의 예는 (HIV에서) vif, vpr, vpx, vpu, tat, rev 및 nef 중 하나 이상을 포함한다. EIAV는 (특히) 추가적인 유전자 S2를 갖는다.

[0222] 특정 구현예에서의 이용에 적합한 예시적인 레트로바이러스는, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스[Moloney murine

leukemia virus, M-MuLV], 몰로니 쥐 육종 바이러스[Moloney murine sarcoma virus, MoMSV], 하베이 쥐 육종 바이러스[Harvey murine sarcoma virus, HaMuSV], 쥣과 유방 종양 바이러스[murine mammary tumor virus, MuMTV], 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스[gibbon ape leukemia virus, GaLV], 고양이 백혈병 바이러스[feline leukemia virus, FLV], 스푸마바이러스, 프리엔드(Friend) 쥐 백혈병 바이러스, 쥣과 줄기 세포 바이러스[Murine Stem Cell Virus, MSCV] 및 라우스 육종 바이러스[RSV]) 및 인간 면역결핍 바이러스[human immunodeficiency virus, HIV]를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0223] 일부 구현예에서 레트로바이러스는 감마레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 엡실론레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 알파레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 베타레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 델타레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 스푸마레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 내인성 레트로바이러스이다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 렌티바이러스이다.

[0224] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 하나 이상의 절연체 요소, 예를 들어 문헌[Browning et al., "Insulators to Improve the Safety of Retroviral Vectors for HIV Gene Therapy," Biomedices, 4(1):4 (2016)]에 기재된 절연체 요소를 더 포함한다. 다양한 구현예에서, 벡터는 외인성 작용제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 함께 작동 가능한 상태로 연결된 프로모터를 포함한다. 벡터는 하나 이상의 LTR을 가질 수 있으며, 상기 어느 한 LTR은 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가, 또는 결실과 같은 하나 이상의 변형을 포함한다. 벡터는 형질도입 효율(예를 들어, cPPT/FLAP), 바이러스 패키징(예를 들어, Psi (Y) 패키징 신호, RRE) 및/또는 외인성 유전자 발현을 증가시키는 기타 요소(예를 들어, 폴리 (A) 서열)을 증가시키기 위한 하나 이상의 보조 요소들을 더 포함할 수 있으며, 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 핵산은 예를 들어, 5'에서 3'으로, 프로모터(예를 들어, CMV), R 서열(예를 들어, TAR 포함), U5 서열(예를 들어, 통합을 위해), PBS 서열(예를 들어, 역전사를 위해), DIS 서열(예를 들어, 유전체 이량체화를 위해), psi 패키징 신호, 부분 gag 서열, RRE 서열(예를 들어, 핵 유출을 위해), cPPT 서열(예를 들어, 핵 유입을 위해), 외인성 작용제의 발현을 구동하기 위한 프로모터, 외인성 작용제를 암호화하는 유전자, WPRE 서열(예를 들어, 효율적인 이식유전자 발현을 위해), PPT 서열(예를 들어, 역전사를 위해), R 서열(예를 들어, 폴리아데닐화 및 종결을 위해), 및 U5 신호(예를 들어, 통합을 위해) 중 하나 이상, 예를 들어, 전부를 포함한다.

[0225] 예시적인 렌티바이러스는, HIV(인간 면역결핍 바이러스, HIV 1형 및 HIV 2형을 포함), 비스나-매디 바이러스[visna-maedi virus, VMV] 바이러스, 염소 관절염-뇌염 바이러스[caprine arthritis-encephalitis virus, CAEV], 말 전염성 빈혈 바이러스[infectious anemia virus, EIAV], 고양이 면역결핍 바이러스[feline immunodeficiency virus, FIV], 소 면역 결핍 바이러스[bovine immune deficiency virus, BIV], 및 유인원 면역결핍 바이러스[simian immunodeficiency virus, SIV]을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, HIV 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스-작용 서열 요소)가 사용된다. 렌티바이러스 벡터는 주로 렌티바이러스에서 유래되는, LTR을 비롯하여 구조적 및 기능적 유전 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 포함할 수 있다.

[0226] 구현예에서, 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 발현 벡터)는 렌티바이러스 전달 플라스미드(예를 들어, 네이키드 DNA로서) 또는 감염성 렌티바이러스 입자를 포함할 수 있다. 클로닝 부위, 프로모터, 조절 요소, 이종성 핵산 등과 같은 요소와 관련하여, 이러한 요소의 서열은 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재할 수 있고, DNA 플라스미드에서 DNA 형태로 존재할 수 있음을 이해해야 한다.

[0227] 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 패키징 구성요소의 존재하에, 표적 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자 내로 RNA 유전체의 패키징을 허용하는, 충분한 레트로바이러스 유전 정보를 갖는 벡터이다. 표적 세포의 감염은 역전사 및 표적 세포 유전체로의 통합을 포함할 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터[recombinant lentivirus vector, RLV]는 전형적으로 벡터에 의해 표적 세포로 전달될 비-바이러스 코딩 서열을 운반한다. 구현예에서, RLV는 표적 세포 내에서 감염성 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 독립적인 복제가 불가능하다. 일반적으로 RLV에는 기능적 gag-pol 및/또는 env 유전자 및/또는 복제에 관련된 기타 유전자가 결여되어 있다. 벡터는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 PCT 특허 출원 제WO 99/15683호에 기재된 바와 같이 분할-인트론 벡터로서 구성될 수 있다.

[0228] 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 최소 바이러스 유전체를 포함하며, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO 98/17815호에 기재된 바와 같이 표적 숙주 세포에 관심 뉴클레오티드 서열을 감염, 형질도입 및

전달하는 데 필요한 기능성을 제공하기 위해 예를 들어, 바이러스 벡터는 비-필수 요소를 제거하고 필수 요소는 유지하도록 조작되었다.

[0229] 최소 렌티바이러스 유전체는, 예를 들어, (5')R-U5-하나 이상의 제1 뉴클레오티드 서열-U3-R(3')을 포함할 수 있다. 그러나, 공급원 세포 내에서 렌티바이러스 유전체를 생산하는 데 사용된 플라스미드 벡터는 또한 공급원 세포에서 유전체의 전사를 지시하도록 렌티바이러스 유전체에 작동 가능한 상태로 연결된 전사 조절 제어 서열을 포함할 수 있다. 이러한 조절 서열은 전사된 레트로바이러스 서열과 회합된 자연 서열, 예를 들어, 5'U3 영역을 포함할 수 있거나, 이들은 다른 바이러스 프로모터, 예를 들어, CMV 프로모터와 같은 이종 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 렌티바이러스 유전체는 효율적인 바이러스 생산을 촉진시키기 위해 추가적인 서열을 포함한다. 예를 들어, HIV의 경우, rev 및 RRE 서열이 포함될 수 있다.

[0230] **V. 세포**

[0231] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포, 및/또는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0232] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 포함하는 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 핵산 분자의 형태로 세포 내로 도입된다. 핵산을 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질감염, 전기천공, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 변형된 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 변형된 mRNA를 포함한다.

[0233] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 예를 들어 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화되고, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다.

[0234] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 하나 이상의 유전자 편집 시스템을 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 CRISPR/Cas이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 본원에 기재된 CRISPR/Cas 시스템 중 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 세포는 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN] 방법을 사용하여 제조된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 본원에 기재된 TALEN 방법 중 하나 이상이다.

[0235] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 아연 집게 핵산분해효소[zinc finger nuclease, ZFN]를 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 본원에 기재된 ZFN 방법 중 하나 이상이다.

[0236] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 메가핵산분해효소를 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 본원에 기재된 메가핵산분해효소 방법 중 하나 이상이다.

[0237] 일부 구현예에서, 세포는 줄기 세포이다.

[0238] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 만능 줄기 세포이다. 만능 줄기 세포는 분열하여 자가갱생하는 능력 및 초기 배아의 세 개의 일차 생식 세포 층으로 발달하는 능력을 가져서, 성체의 모든 세포로 발달하는 능력을 가진 세포지만, 태반과 같은 배아-외 조직은 아니다. 배아줄기 세포 및 유도만능줄기 세포는 만능줄기 세포이다.

[0239] 일부 구현예에서, 세포는 배아 줄기 세포[embryonic stem cell, ESC]이다. 배아 줄기 세포는 초기 단계의 착상전 배아인, 배반포의 내부 세포 덩어리에서 유래하는 만능 줄기 세포이다.

[0240] 일부 구현예에서, 세포는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]이다. iPSC는 치료 목적에 필요한 임의의 유형의 세포의 무제한 공급원의 개발을 가능하게 하는 배아 유사 만능 상태로 다시 유전적으로 재프로그래밍된[reprogrammed] 성인 체세포에서 유래한다.

[0241] 본원에서 사용된 바와 같이, '만능 줄기 세포'는 3 개의 배엽, 즉 내배엽(예를 들어, 위 라이닝(lining), 위장관, 폐, 등), 중배엽(예를 들어, 근육, 뼈, 혈액, 비뇨생식기 조직, 등) 또는 외배엽(예를 들어, 표피 조직 및 신경계 조직) 중 임의의 것으로 분화할 가능성을 갖는다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 '만능 줄기 세포'는 또한 '유도 만능 줄기 세포'(iPSC 또는 iPS 세포), 또는 비-만능 세포에서 유래된 만능 줄기 세포의 유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 만능 세포가 아닌 세포에서 생산되거나 생성된다. 즉, 만능 줄기 세

포는 비-만능 세포의 직접 또는 간접 자손일 수 있다. 부모 세포의 예는 다양한 수단에 의한 만능성, 미분화 표현형을 유도하도록 재프로그래밍된 체세포를 포함한다. 이러한 'iPS' 또는 'iPSC' 세포는 특정 조절 유전자의 발현을 유도하거나 또는 특정 단백질의 외인성 적용에 의해 생성될 수 있다. iPS 세포의 유도 방법은 당업계에 알려져 있으며, 하기에 추가로 설명된다(예를 들어, 문헌[Zhou et al., Stem Cells 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu et al., Nature Biotechnol. 26 (7): 795 (2008); Woltjen et al., Nature 458 (7239): 766-770 (2009); and Zhou et al., Cell Stem Cell 8:381-384 (2009)] 참조, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다). 본원에서 사용된 바와 같이, 'hiPSC'는 인간 유도 만능 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 본원에서 사용된 바와 같이, '만능 줄기 세포'는 중간엽 줄기 세포[mesenchymal stem cell, MSC] 및/또는 배아 줄기 세포[ESC] 또한 포함한다.

[0242] 일부 구현예에서, 세포는 췌장 섬 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 일차 췌장 섬 세포이다.

[0243] 일부 구현예에서, 세포는 유도 만능 줄기 세포에서 분화된다. 일부 구현예에서, 유도 만능 줄기 세포는 iPSC 또는 ESC이다.

[0244] 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 일차 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 키메라 항원 수용체[chimeric antigen receptor, CAR]을 포함하는 T 세포, 예컨대 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고/하거나 CAR을 포함하는 T 세포, 또는 그렇지 않으면 폴리뉴클레오티드에서 CAR을 발현하는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 CAR-T 세포이다. 일부 구현예에서, T 세포는 만능 줄기 세포에서 분화된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 iPSC 또는 ESC이다.

[0245] T 세포는 림프구의 한 유형이다. T 세포는 면역계의 백혈구 중 하나로 적응 면역 반응의 중심 역할을 한다. CAR-T 세포는 인공 T 세포 수용체를 생산하도록 유전자 조작된 T 세포이다. 키메라 항원 수용체(CAR, 키메라 면역수용체, 키메라 T 세포 수용체, 또는 인공 T 세포 수용체로도 알려짐)는 특정 단백질을 표적화하는 능력을 T 세포에 제공하도록 조작된 수용체 단백질이다. 수용체는 항원-결합과 T 세포 활성화 작용 둘 모두를 단일 수용체에 조합하기 때문에 키메라이다. CAR-T 세포는 CD4+ 및 CD8+ 둘 모두일 수 있으며, 이때 둘 모두의 세포 유형의 1 대 1 비율은 상승작용적 항종양 효과를 제공한다. CAR-T 세포는 환자 자신의 혈액 내의 T 세포 유래일 수 있거나(자가) 또는 다른 건강한 공여자의 T 세포 유래일 수 있다(동종이계). T 세포는, 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터 조직, 복수, 흉막 삼출, 비장 조직 및 종양을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다수의 공급원에서 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 당업자에게 알려진 기술, 예컨대 침강, 예를 들어 FICOLL™ 분리, 항체-컨쥬게이트된 비드-기반 방법, 예컨대 MACS™ 분리(Miltenyi)를 얼마든지 사용하여 대상에서 수집된 혈액 단위에서 수득될 수 있다.

[0246] 일부 구현예에서, 세포는 심장 세포, 심장 전구세포, 신경 세포, 신경아교 전구세포, 내피 세포, T 세포, B 세포, 췌장 섬 세포, 망막 색소 상피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 혈액 세포, 형질 세포, 혈소판, 신장 세포, 상피 세포, CAR-T 세포, NK 세포, 및 CAR-NK 세포에서 선택되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0247] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 일차 세포이다. 일차 세포는 효소적 또는 기계적 방법을 사용하여 인간 또는 동물 조직으로부터 직접 단리된다. 일단 단리되면, 증식을 지원하기 위해 필수 영양소와 성장 인자를 함유하는 특수 배지로 지지된 플라스틱 또는 유리 용기의 인공 환경에 배치한다. 일차 세포는 접착성 또는 현탁의 두 가지 유형일 수 있다. 접착성 세포는 성장을 위해 부착이 필요하며, 고정 의존성 세포라고도 한다. 접착성 세포는 보통 장기 조직에서 유래한다. 현탁 세포는 성장을 위해 부착이 필요 없으며 고정 비의존성 세포라고 한다. 대부분의 현탁 세포는 혈액계에서 단리되지만, 간세포나 장세포와 같은 일부 조직 유래 세포도 현탁 형태로 사용할 수 있다. 일차 세포는 보통 제한된 수명을 갖지만, 세포주와 비교하여 다수의 이점을 제공한다. 일차 세포 배양은 연구자들이 세포만이 아닌 기증자를 연구할 수 있게 한다. 실험모형 구축시 연령, 병력, 인종, 성별과 같은 몇 가지 요인을 고려할 수 있다. 개인 맞춤형의학에 대한 경향이 성장함에 따라, 이러한 공여자 가변성 및 조직 복잡성은 일차 세포의 사용으로 달성될 수 있지만, 본질적으로 더 전신성이고 균일하며, 살아있는 조직의 진정한 다양성을 획득하지 않는 세포주로 복제하기가 어렵다.

[0248] 일부 구현예에서, 세포는 분화된 세포이다. 분화된 세포는 분화를 거친 세포이다. 이들은 특수 기능을 수행하는 성숙한 세포이다. 분화된 세포의 일부 예는 상피 세포, 피부 섬유아세포, 혈관 라이닝을 형성하는 내피 세포, 평활근 세포, 간 세포, 신경 세포, 인간 심근 세포, 등이다. 일반적으로, 이들 세포는 신체 조직 또는 장기에서 그들의 기능을 촉진하는 신호에 대한 독특한 형태, 대사 활성, 막 전위 및 반응성을 갖는다.

[0249] **저면역원성 세포**

[0250] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 저면역원성 세포이다. 세포를 특성화하기 위해 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '저면역원성'은 일반적으로 이러한 세포가 이식된 대상에 의한 선천적 또는 후천적 면역 거부 경향이 덜하다는 것을 의미하며, 예를 들어, 세포는 이러한 세포가 이식되는 대상에 의한 동종이식거부 경향이 적다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비해, 이러한 저면역원성 세포는 약 2.5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99%, 100%, 또는 이 사이의 임의의 양일 수 있으며, 그러한 세포가 이식되는 대상자에 의한 선천성 또는 적응성 면역 거부 경향이 덜하다. 일부 구현예에서, 유전체 편집 기술이 사용되어 MHC I 및 MHC II 유전자의 발현을 조절하고, 그에 따라 저면역원성 세포를 생성하는데 기여한다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 MHC-불일치 동종이계 수용자에서 면역 거부를 회피한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 약술된 저면역원성 줄기 세포에서 생성된 분화된 세포는 MHC-불일치 동종이계 수용자에게 투여될 때(예를 들어, 이식 또는 접합될 때) 면역 거부를 회피한다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 T 세포-매개 적응성 면역 거부 및/또는 선천성 면역 세포 거부로부터 보호된다. 저면역원성 세포, 이러한 세포를 생산하는 방법, 및 이러한 세포를 사용하는 방법에 대한 상세한 설명은 2015년 5월 9일 출원된 제WO2016183041호, 2018년 1월 14일 출원된 제WO2018132783호, 2018년 3월 20일 출원된 제WO2018176390호, 2019년 7월 17일 출원된 제WO2020018615호, 2019년 7월 17일 출원된 제WO2020018620호, 2020년 7월 31일 출원된 제PCT/US2020/44635호, 2019년 8월 1일 출원된 제US62/881,840호, 2019년 8월 23일 출원된 제US62/891,180호, 2020년 4월 27일 출원된 제US63/016,190호, 및 2020년 7월 15일에 출원된 제US63/052,360호에서 찾을 수 있으며, 이들의 예, 서열 목록, 및 도면을 포함한 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0251] 세포의 저면역원성은 세포의 면역원성, 예컨대 적응성 및 선천성 면역 반응을 유발하거나 이러한 적응성 및 선천적 면역 반응을 유발하는 것을 피하는 세포의 능력을 평가함으로써 결정될 수 있다. 이러한 면역 반응은 당업자에게 인지되어 있는 분석을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 반응 분석은 T 세포 증식, T 세포 활성화, T 세포 사멸, 공여자 특이적 항체 생성, NK 세포 증식, NK 세포 활성화, 및 대식세포 활성에 대한 저면역원성 세포의 효과를 측정한다. 일부 경우에서, 저면역원성 세포 및 이의 유도체는 대상에게 투여 시 T 세포 및/또는 NK 세포에 의해 사멸되는 것이 감소된다. 일부 경우에서, 세포 및 이의 유도체는 비변형 또는 야생형 세포에 비해 감소된 대식세포 탐식[engulfment]을 나타낸다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 상응하는 비변형된 야생형 세포에 비교하여, 수용자 대상에서 감소되거나 줄어든 면역 반응을 유발한다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 비면역원성이거나 또는 수용 대상에서 면역 반응을 유발하지 못한다.

[0252] 일부 구현예에서, 주조직적합성[MHC] 클래스 I 및 MHC 클래스 II 단백질의 발현은 세포에서 파괴된다. MHC 클래스 I 및 클래스 II 단백질은 면역계의 적응 분지[adaptive branch]에 일정 역할을 한다. 두 부류의 단백질 모두 T 세포에 의한 인식을 위해 세포 표면에 펩티드를 제시하는 작업을 공유한다. 면역원성 펩티드-MHC 클래스 I[pMHCI] 복합체는 유핵 세포상에 제시되고 세포독성 CD8+ T 세포에 의해 인식된다. 한편, 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포[DC], 대식세포, 또는 B 세포)에 의한 펩티드-MHC 클래스 II[pMHCII]의 제시는, CD4+ T 세포를 활성화시켜 효과기 세포의 배위 및 조절을 유도할 수 있다. 모든 경우에, 이는 소정의 pMHC 복합체와 상호작용하여 잠재적으로 지속적인 세포-세포 접촉 형성 및 T 세포 활성화를 일으키는 클론형 T 세포 수용체이다.

[0253] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 야생형 또는 대조군 세포에 비해 감소된 수준의 MHC 클래스 I 단백질을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포는 야생형 또는 대조군 세포에 비해 MHC 클래스 II 단백질을 감소된 수준으로 발현한다. 일부 구현예에서, 세포는 야생형 또는 대조군 세포에 비해 MHC 클래스 I 및 클래스 II 모두를 감소된 수준으로 발현한다.

[0254] 일부 구현예에서, 세포는 임의의 MHC 클래스 I 단백질을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 임의의 MHC 클래스 II 단백질을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 임의의 MHC 클래스 I을 발현하지 않고, 임의의 MHC 클래스 II 단백질을 발현하지 않는다.

[0255] 일부 구현예에서, 본원에서 논의된 MHC 단백질은 HLA 단백질이다.

[0256] 'HLA' 또는 '인간 백혈구 항원' 복합체는 인간의 MHC 단백질을 암호화하는 유전자 복합체이다. HLA 복합체를 구성하는 이러한 세포-표면 단백질은 항원에 대한 면역 반응의 조절을 담당한다. 인간에는, 두 개의 MHC인 클래스 I 및 클래스 II, 또는 'HLA-I' 및 'HLA-II'가 있다. HLA-I는 세포 내부 유래의 펩티드를 제시하는 세 개의 단백질인 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C를 포함하며, HLA-I 복합체에 의해 제시된 항원은 살해 T-세포(CD8+ T-세포 또는 세포독성 T 세포로도 알려져 있음)를 유인한다. HLA-I 단백질은 β-2 마이크로글로불린[beta-2-microgloublin, B2M]과 연관된다. HLA-II는 세포 외부에서 T 림프구로 항원을 제시하는 다섯 개의 단백질인 HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR을 포함한다. HLA-II 단백질은 클래스 II 전사활성자[class II transactivator,

CIITA]와 연관된다. 이는 CD4+ 세포(T-헬퍼 세포로도 알려져 있음)를 자극한다. 'MHC' 또는 'HLA'의 사용은, 'HLA'가 전형적으로 그 유전자가 인간 유래를 나타내기는 하지만, 제한적으로 의도되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 포유동물 세포와 관련하여, 이들 용어는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.

[0257] 일부 구현예에서, MHC 클래스 II 분자의 발현은 녹아웃에 의해 또는 CIITA의 발현을 감소시킴으로써 감소된다. 일부 구현예에서, MHC II 유전자의 발현은 클래스 II 전사활성자[CIITA] 발현을 표적화 및 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)함으로써 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)된다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 일어난다. CIITA는 단백질의 LR 또는 뉴클레오티드 결합 도메인[nucleotide binding domain, NBD] 루신-풍부 반복부[leucine-rich repeat, LRR]족의 구성원이고, MHC 인핸세오솜(enhanceosome)과의 회합에 의해 MHC II의 전사를 조절한다. 일부 구현예에서, 조절을 위해 표적화되는 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 변이체, CIITA의 동족체, 또는 CIITA의 동원체이다.

[0258] 일부 구현예에서, CIITA의 감소 또는 제거된 발현은 MHC 클래스 II 분자 HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, 및 HLA-DR 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다.

[0259] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 CIITA 단백질을 암호화하는 유전자좌에서 유전자 변형을 포함한다. 즉, 세포는 CIITA 좌위에서 유전자 변형을 포함한다. 일부 경우에서, CIITA 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 RefSeq. 번호 NM_000246.4 및 NCBI Genbank 번호 U18259에 기재되어 있다. 일부 경우에서, CIITA 유전자좌는 NCBI 유전자 ID 번호 4261에 기재된다. 특정 경우에, CIITA의 아미노산 서열은 NCBI GenBank 번호 AAA88861.1로서 도시된다. CIITA 단백질 및 유전자좌의 추가의 설명은 Uniprot 번호 P33076, HGNC Ref. 번호 7067, 및 OMIM Ref. 번호 600005에서 찾아볼 수 있다.

[0260] 일부 구현예에서, 본원에 약술된 저면역원성 세포는 CIITA 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 희귀-절단 핵산내부분해효소에 의해 생성되며, 이는 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열은 본원에 참조로 포함되는 제WO2016183041호의 표 12의 서열 번호 5184-36352로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에서 선천성 및/또는 적응성 면역 반응을 유도하는 능력이 감소된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예컨대, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산은 CIITA 유전자에 삽입된다.

[0261] CIITA 유전자가 불활성화되었는지 여부를 검정하기 위한 분석은 알려져 있고 본원에 설명되어 있다. 일부 구현예에서, 생성된 CIITA 유전자의 유전자 변형은 PCR에 의해 확인할 수 있고, HLA-II 발현의 감소를 FACS 분석에 의해 확인할 수 있다. 또 다른 구현예에서, CIITA 단백질 발현은 CIITA 단백질에 대한 항체로 탐침된[probed] 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄반응[reverse transcriptase polymerase chain reactions, RT-PCR]을 사용하여 불활성화 유전자 변형의 존재를 확인한다. 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 사용하여 세포의 하나 이상의 대립유전자 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화되고, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입을 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 렌티바이러스계 바이러스 벡터를 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다.

[0262] 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 분자의 발현은 녹아웃에 의해 또는 B2M의 발현을 감소시킴으로써 감소된다. 일부 구현예에서, MHC I 유전자의 발현은 보조 사슬 B2M의 발현을 표적화 및 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)함으로써 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)된다. 일부 구현예에서, 상기 조절은 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 일어난다. B2M의 발현을 조절함으로써(예를 들어, 감소 또는 결실) MHC-I 분자의 표면 이동이 차단되고, 세포는 저면역원성이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에서 선천성 및/또는 적응성 면역 반응을 유도하는 능력이 감소된다.

[0263] 일부 구현예에서, 조절을 위해 표적화되는 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 변이체, B2M의 동족체, 또는 B2M의 동원체이다.

[0264] 일부 구현예에서, B2M의 감소 또는 제거된 발현은 다음 MHC I 분자들, 즉 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다.

[0265] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 B2M 단백질을 암호화하는 유전자좌에서의 유전자 변형을 포함한다. 즉, 세포는 B2M 좌위에서의 유전자 변형을 포함한다. 일부 경우에서, B2M 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 RefSeq. 번호 NM_004048.4 및 Genbank 번호 AB021288.1에 기재되어 있다. 일부 예에서, B2M 유전자좌는 NCBI 유전자 ID 번호 567에 기재되어 있다. 특정 경우에, B2M의 아미노산 서열은 NCBI GenBank 번호 BAA35182.1에 기재되어 있다. B2M 단백질 및 유전자좌에 대한 추가 설명은 Uniprot 번호 P61769, HGNC 참조 번호 914, 및 OMIM Ref. 번호 109700에서 찾아볼 수 있다.

[0266] 일부 구현예에서, 본원에 약술된 저면역원성 세포는 B2M 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 희귀-절단 핵산내부분해효소에 의해 생성되며, 이는 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열은 본원에 참조로 포함되는 제WO2016183041호의 표 15의 서열 번호 81240-85644로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예컨대, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산은 B2M 유전자에 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화되고, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입을 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 렌티바이러스계 바이러스 벡터를 사용하여 세포의 적어도 하나의 대립유전자 내로 삽입된다.

[0267] B2M 유전자가 불활성화되었는지의 여부를 시험하기 위한 분석은 알려져 있고 본원에 설명되어 있다. 일부 구현예에서, 생성된 B2M 유전자의 유전자 변형은 PCR에 의해 확인할 수 있고, HLA-I 발현의 감소는 FACS 분석에 의해 확인할 수 있다. 또 다른 구현예에서, B2M 단백질 발현은 B2M 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 또 다른 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 불활성화 유전자 변형의 존재를 확인한다.

[0268] 본원에 기재된 T 세포, iPSC, 또는 ESC의 일부 구현예에서, T 세포 수용체 알파 사슬[TRAC] 및/또는 T 세포 수용체 베타 사슬[TRBC] 유전자는 녹아웃되거나, 이의 발현이 세포에서 감소된다.

[0269] T-세포 수용체[T-cell receptor, TCR]는 MHC 분자에 결합된 펩티드로서 항원의 단편을 인식을 담당하는 T 세포의 표면에서 발견되는 단백질 복합체이다. TCR은 불변 CD3 사슬 분자와의 복합체의 일부로서 발현되는 고도로 가변성인 알파(α) 및 베타(β) 사슬(각각, TRAC 및 TRBC 유전자에 의해 암호화됨)로 일반적으로 이루어지는 이황화-연결된 막-고정된 이종이량체 단백질이다. 이 수용체를 발현하는 T 세포는 α:β(또는 αβ) T 세포로 지칭되지만, 소수의 T 세포는 가변성 감마(γ) 및 델타(δ) 사슬에 의해 형성된, 대체 수용체를 발현하며, 이는 γδT 세포로 지칭된다. 각각의 사슬은 두 개의 세포외 도메인, 즉 가변 영역과 불변 영역으로 구성되며, 이들 면역글로불린 초족(IgSF) 도메인 둘 모두는 역평행 β-시트를 형성한다. 불변 영역은 세포막에 근위이며, 막관통 영역 및 짧은 세포질 꼬리가 뒤따르는 반면, 가변 영역은 펩티드/MHC 복합체에 결합한다. 내인성 TRAC 및/또는 TRBC 유전자의 녹아웃은 유전자이식 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포의 발현 및 기능을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되었다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 야생형 또는 대조군 세포에 비해 MHC 클래스 I 단백질 및/또는 MHC 클래스 II 단백질을 감소된 수준으로 발현한다.

[0270] 일부 구현예에서, 세포는 동일한 세포 유형의 야생형 세포 또는 대조군 세포에 비해 야생형 및/또는 조작된 CD47 단백질의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 야생형 세포 또는 대조군 세포는 출발 재료이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 출발 재료는 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CD47 단백질, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 본원에 기재된 바와 같은 벡터, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CD47 단백질을 포함하는 세포, 또는 본원에 기재된 바와 같은 조작된 CD47 단백질 또는 세포를 포함하는 조성물을 생산하기 위해 본원에 기재된 하나 이상의 변형이 이루어지는 원료 물질을 지칭한다.

[0271] 본원에 사용된 바와 같이, '야생형 세포' 또는 'wt 세포'는 자연에서 발견되는 임의의 세포를 의미한다. 일부 구현예에서, 야생형 세포는 자연에서 발견되는 일차 세포 및 T 세포를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '대조군 세포'는 그의 CD47 유전자가 변경되지는 않지만, 그 안에서 다른 변형이 이루어질 수 있는 세포이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 MHC I 단백질 및/또는 MHC II 단백질 및/또는 T-세포 수용체의 감소된 발현을 일으키는 핵산 변화를 함유할 수 있는 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 B2M 녹아웃되거나, 또

는 B2M의 감소된 발현을 포함하는 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 CIITA 녹아웃되거나, 또는 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 TRAC 및/또는 TRBC가 녹아웃되거나, 또는 TRAC 및/또는 TRBC의 감소된 발현을 포함하는 조작된 세포이다.

[0272] 일부 구현예에서, 대조군 세포는 iPSC, ESC, 또는 만능성을 일으키는 핵산 변화를 함유하는 자손이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 iPSC, ESC, 또는 B2M이 녹아웃되거나 B2M의 감소된 발현을 포함하는 자손이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 iPSC, ESC, 또는 CIITA가 녹아웃되거나 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 자손이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 iPSC, ESC, 또는 TRAC 및/또는 TRBC가 녹아웃되거나 TRAC 및/또는 TRBC의 감소된 발현을 포함하는 자손이다.

[0273] 일부 구현예에서, 대조군 세포는 일차 T 세포, 또는 MHC I 단백질 및/또는 MHC II 단백질 및/또는 T-세포 수용체의 감소된 발현을 일으키는 핵산 변화를 함유하는 자손이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 일차 T 세포 또는 B2M이 녹아웃되거나 B2M의 감소된 발현을 포함하는 자손이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 일차 T 세포 또는 CIITA가 녹아웃되거나 CIITA의 감소된 발현을 포함하는 자손이다. 일부 구현예에서, 대조군 세포는 일차 T 세포 또는 TRAC 및/또는 TRBC가 녹아웃되거나 TRAC 및/또는 TRBC의 감소된 발현을 포함하는 자손이다.

[0274] 일부 구현예에서, 출발 재료는 공여자에게서 수집된 일차 세포이다. 일부 구현예에서, 출발 재료는 예컨대, 류코팩(leukopak)을 통해 공여자에게서 수집된 일차 혈액 세포이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 출발 재료는 공여자에게서 수득된 미변형된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 출발 재료는 iPSC 세포주이다. 일부 구현예에서, 이와 달리 출발 재료는 인간 CD47 유전자 외의 하나 이상의 유전자의 변경된 발현을 갖도록 변형되거나 조작된다.

[0275] 일부 구현예에서, 기재된 조작된 및 저면역원성 세포는 iPSC 또는 그의 자손으로부터 유래된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 'iPSC 또는 그의 자손에서 유래된'은 생성된 초기 iPSC 및 그의 임의의 후속 자손을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '자손'은 예를 들어, 일 세대 자손을 포함하며, 즉 자손은 예를 들어 전통적인 증식 방법에 의해, 초기 iPSC로부터 직접 유래되거나, 수득되거나, 수득가능하거나, 유도가능하다. 용어 '자손'은 또한 2세대, 3세대, 4세대, 5세대, 6세대, 7세대 이상의 세대와 같은 추가의 세대, 즉, 예를 들어 전통적인 증식 방법에 의해 이전 세대에서 유래되거나, 수득되거나, 수득가능하거나, 유도가능한 세포의 세대를 포함한다. 용어 '자손'은 또한 초기 iPSC 또는 그의 자손의 변형 또는 변경 결과 발생하는 변형된 세포를 포함한다.

[0276] 일부 구현예에서, 유전자 발현을 녹다운(예를 들어, 감소, 제거 또는 억제)시키는 것은 RNA 사일런싱(silencing) 또는 RNA 간섭[RNA interference, RNAi]에 의해 달성될 수 있다. 유용한 RNAi 방법에는 합성 RNAi 분자, 짧은 간섭 RNA[short interfering RNA, siRNA], PIWI-상호작용 NRA[PIWI-interacting NRA, piRNA], 짧은 헤어핀[short hairpin] RNA[shRNA], 마이크로RNA(microRNA, miRNA), 및 당업자가 인식하는 기타 일시적인 녹다운 방법을 이용하는 방법이 포함된다. 서열 특이적 shRNA, siRNA, miRNA 등을 포함하는 RNAi용 시약은 시판된다.

[0277] 본원에 사용된 바와 같은 용어 '조작된 세포'는, 예를 들어, 조작된 세포가 야생형 세포와 상이하도록 하는 유전자 변경 또는 변형에 의한 것을 포함하는, 인간 개입에 의해 적어도 일부 방식으로 변경된 세포를 지칭한다.

[0278] 용어 '감소하다(decrease)', '감소된(reduced)', '감소(reduction)' 및 '감소된(decreased)'은 모두, 본원에서 통계적으로 유의한 양만큼의 저하를 의미하기 위해 일반적으로 사용된다. 그러나, 의심의 여지를 없애기 위해, '감소', '감소된', '감소' 및 '감소된'은 참조 수준과 비교하여 적어도 10% 저하, 예를 들어 참조 수준과 비교하여 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%, 또는 100%을 포함하여 이에 달하는 저하(즉, 참조 샘플과 비교하여 부재하는 수준), 또는 10-100% 사이의 임의의 저하를 의미한다. 일부 구현예에서, 세포는 미변경된 또는 미변형된 야생형 세포에 비해 하나 이상의 표적의 감소된 발현을 갖도록 조작된다.

[0279] 일부 구현예에서, 제공된 변형된 세포는 환자(예를 들어, 수용자 대상)에 투여될 때 면역 인식 및 반응을 회피할 수 있도록 변형된다. 세포는 시험관내 및 생체내에서 면역 세포에 의한 사멸을 회피할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 대식세포 및 NK 세포에 의한 사멸을 회피한다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포 또는 대상의 면역계에 의해 무시된다. 즉, 본원에 기재된 방법에 따라 투여된 세포는 면역계에 의해 검출 가능하지 않다. 일부 구현예에서, 세포는 은폐되고[cloaked] 그에 따라서 면역 거부반응을 회피한다.

[0280] 본원에 제공된 변형된 세포가 면역 인식을 회피하는지 여부를 결정하는 방법은 IFN-γ, Elispot 분석, 미세아교세포 사멸 분석, 세포 생착 동물 모델, 시토킨 방출 분석, ELISA, 생물발광 영상화를 사용한 사멸 분석 또는 크

롬 방출 분석 또는 Xcelligence 분석, 혼합-림프구 반응, 면역형광 분석, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0281] 일부 구현예에서, 세포의 면역원성은 보체-의존적 세포독성[complement-dependent cytotoxicity, CDC] 분석으로 평가된다. CDC는 보체를 함유하는 혈청의 존재하에 세포 표면상에 발현된 HLA-비의존성 항원을 표적화하는 IgG 또는 IgM 항체와 함께 세포를 인큐베이션하고, 세포 사멸을 분석함으로써 시험관 내에서 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, CDC는 세포를 ABO 혈액형 비상용성[incompatible] 혈청과 함께 인큐베이션함으로써 분석될 수 있으며, 여기서 세포는 A 항원 또는 B 항원을 포함하고, 혈청은 세포의 A 항원 및/또는 B 항원에 대한 항체를 포함한다.

[0282] 일부 구현예에서, 일단 변형된 세포가 본원에 기재된 바와 같이 변형되거나 생성되면, 이들은 그의 저면역원성에 대해 분석될 수 있다. 임의의 다양한 분석을 사용하여 세포가 저면역원성인지 또는 면역계를 회피할 수 있는지 여부를 평가할 수 있다. 예시적인 분석은 제WO2016183041호 및 제WO2018132783호에 기재된 임의의 것을 포함한다.

[0283] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변형된 세포는 1주 이상(예를 들어, 1주, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년 이상, 예를 들어, 세포 및/또는 그의 자손의 수명 동안) 동안 숙주 면역 반응을 자극하지 않으면서 숙주에서 생존한다. 세포는 이들이 숙주 내에서 생존하는 동안 이식유전자의 발현을 유지하고/하거나, 표적 유전자의 발현은 결실되거나 감소된다. 일부 양태에서, 이식유전자가 더 이상 발현되지 않는 경우 및/또는 표적 유전자가 발현되는 경우, 변형된 세포는 숙주의 면역계에 의해 제거될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 세포의 지속성 또는 생존은 세포가 생체내에서 검출될 수 있도록 하는 단백질(예를 들어, 형광 단백질, 예컨대 GFP, 절두된 수용체 또는 다른 대용 마커 또는 다른 검출 가능한 마커)을 암호화하는 이식유전자를 추가로 발현시킴으로써 수용자에게 투여된 후에 모니터링될 수 있다.

[0284] 저면역원성 세포는, 세포가 의도된 조직 부위에 생착되고 기능적으로 결핍된 영역을 재구성하거나 재생하도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 생착(예를 들어, 성공적인 생착)에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 생착은 미리 선택된 분량의 시간 후에 평가된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 세포 생존에 대해 모니터링된다. 예를 들어, 세포 생존은 생물발광 영상화[bioluminescence imaging, BLI]를 통해 모니터링될 수 있으며, 여기서 세포는 세포 생존을 모니터링하기 위한 발광효소 발현 작제물로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 당업계에 알려진 면역염색 및 영상화 방법에 의해 시각화된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 성공적인 생착을 결정하도록 검출될 수 있는 알려진 바이오마커를 발현한다. 예를 들어, 특정 바이오마커의 표면 발현을 결정하기 위해 유세포 분석법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 예상대로 의도된 조직 부위에 생착된다(예를 들어, 저면역원성 세포의 성공적인 생착). 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 필요에 따라, 예컨대 세포 결함 부위에서 의도된 조직 부위에 생착된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 동일한 방식으로 의도된 조직 부위에 생착된다.

[0285] 일부 구현예에서, 변형된 세포 집단(예를 들어, 감소된 CD142 발현을 포함하는 변형을 포함하는 변형된 베타 섬 세포) 또는 조합물의 투여(예를 들어, 변형된 세포 집단을 항-응고제와 조합하여 투여)는 세포가 이식 동안 혈액에 대한 세포의 노출의 결과로서 발생하는 IBMIR을 피하거나 감소시킴으로써 생존 및 생착을 개선한다. 일부 구현예에서, IBMIR의 감소는 이식 동안 발생하는 세포 손실(예를 들어, 이식된 섬의 손실)의 양을 감소시킨다.

[0286] 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 기능에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 의도된 조직 부위에 대한 그의 생착 전에, 기능에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 의도된 조직 부위에 대한 생착 후 기능에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 미리 선택된 분량 이후에 평가된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포의 기능은 검출 가능한 표현형을 생성하는 세포의 능력에 의해 평가된다. 예를 들어, 생착된 베타 섬 세포 기능은 당뇨병으로 인해 손실된 글루코스 제어능의 회복을 기반으로 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 예상된 바와 같다(예를 들어, 항체-매개 거부는 피하면서 저면역원성 세포의 성공적인 기능). 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 항체-매개 거부를 피하면서 세포 결함 부위에서의 충분한 기능과 같이, 필요에 따라 존재한다. 일부 구현예에서, 변형된 세포는 동일한 유형의 비-변형된 세포와 동일한 방식으로 기능한다.

[0287] 즉시 혈액-매개 염증 반응

[0288] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 변형된 세포는 즉시 혈액-매개 염증 반응을 회피한다. 임상 섬 이식의 좋지 않

은 결과에 대한 주요 원인은 섬이 문맥에서 혈액을 만날 때 이식된 조직의 손실을 일으키는 파괴적인 즉시 혈액 매개 염증 반응[Instant blood-mediated inflammatory reaction, IBMIR]의 발생이다(문헌[Bennet et al., (1995) Diabetes 48:1907-1914; Moberg et al., (2002) Lancet 360:2039-2045]). 이러한 반응은 MCP-1(문헌[Piemonti et al., (2002) Diabetes 51:55-65]), IL-8, 및 MIF(문헌[Waeber et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:4782-4787; Johansson et al., (2006) Am J Transplantation 6(2):305])의 발현과 같은, 일련의 다른 전염증성[proinflammatory] 발생과 조합된, 섬의 내분비 세포에 의한 조직 인자[tissue factor, TF] 발현에 의해 촉발된다.

[0289] 즉시 혈액 매개 염증 반응[IBMIR]은 CD142를 발현하는 세포가 혈액과 접촉할 때 발생할 수 있는 비특이적인 염증 및 혈전 반응이다. IBMIR은 문맥에서 인간의 혈액에 노출됨으로써 빠르게 개시된다. 이는 보체, 혈소판 및 응고 경로의 활성화를 특징으로 하며, 이는 결과적으로 호중구의 유인으로 이어진다. IBMIR은 이식된 섬의 상당한 손실을 유발한다. 일부 구현예에서, 세포의 이식 또는 세포에 대한 세포의 혈액에 대한 노출과 연관된 IBMIR을 감소시키는, 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 다른 변형과 조합된 CD142의 감소된 발현을 포함하는 변형된 세포), 조합물(예를 들어, 본원에 기재된 변형된 세포의 임의의 집단 및 응고를 감소시키는 항응고제를 포함하는 조합물), 및 방법(예를 들어, 본원에 기재된 변형된 세포의 임의의 집단 및 응고를 감소시키는 항응고제를 투여하는 것을 포함하는 환자를 치료하는 방법)이 본원에 제공된다.

[0290] 일부 구현예에서, IBMIR은 시험관 내에서, 예를 들어, IBMIR의 시험관 내 튜빙 루프 모델에서 분석될 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,045,502호에서 이전에 설명되었다.

[0291] 일부 구현예에서, IBMIR은 이식 주위[peritransplant] 주기 동안 혈액 시료를 취하고, 트롬빈-항-트롬빈 III 복합체[thrombin-anti-thrombin III complex, TAT], C-펩티드, 인자 XIa-항트롬빈[factor XIa-antithrombin, FXIa-AT], 인자 XIIa-항트롬빈[FXIIa-AT], 트롬빈-항트롬빈[TAT] 플라스민-알파 2 항플라스민[PAP], 및/또는 보체 C3a의 혈장 수준을 평가함으로써 생체내(예를 들어, 포유동물 또는 인간 환자에서)에서 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, IBMIR은 이식된 세포의 주입 동안 및/또는 이식 후 일정 기간(예를 들어, 이식 후 최대 3, 5, 10, 또는 10시간 또는 10시간 초과)에서 TAT, C-펩티드, FXIa-AT, FXIIa-AT, PAP 및/또는 보체 C3a의 증가된 수준과 연관된다. 일부 구현예에서, IBMIR은 자유 순환 혈소판의 수를 모니터링함으로써 분석될 수 있으며, 이식 동안 또는 이식 후 혈소판 수의 감소는 IBMIR과 연관된다(예를 들어, IBMIR로 인한 혈소판 소비).

[0292] 보체-의존성 세포독성

[0293] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 변형된 세포(예를 들어, 베타 섬)는 보체 의존성 세포독성[CDC]을 회피한다. 일부 구현예에서, CDC는 IBMIR의 혈전 반응에 이차적이다. 일부 구현예에서, CDC는 IBMIR과 독립적으로 발생한다.

[0294] 일부 구현예에서, CDC에 대한 세포의 감수성은 당업자에 의해 이해되는 표준 프로토콜에 따라 시험관 내에서 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, CDC는 보체계의 성분을 포함하는 혈청(예를 들어, 인간 혈청)을 항체(예를 들어, IgG 또는 IgM 항체)에 의해 결합된 표적 세포와 혼합하고, 이어서 세포 사멸을 결정함으로써 시험관내에서 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, 보체계의 성분 및 세포의 ABO 유형 A, ABO 유형 B, 및/또는 Rh 인자 항원에 대한 항체를 포함하는, ABO-비상용성 또는 Rh 인자 비상용성 혈청의 존재하에 세포를 인큐베이션함으로써 CDC에 대한 세포의 감수성을 시험관 내에서 분석할 수 있다.

[0295] 일반적인 CDC 분석은 표적 세포에 방사성 화합물을 사전 부하함으로써 세포 사멸을 결정한다. 세포가 죽으면, 방사성 화합물이 세포로부터 방출된다. 따라서, 세포 사멸을 매개하는 항체의 효능은 방사능 수준에 의해 결정된다. 방사성 CDC 분석과 달리, 비방사성 CDC 분석에서는 형광 또는 발광 측정을 이용하여, 종종 풍부한 세포 성분, 예컨대 GAPDH의 방출이 측정된다. 일부 구현예에서, CDC에 의한 세포 사멸은 무표지[label-free] 플랫폼, 예컨대 xCELLigence™(Agilent)를 사용하여 분석될 수 있다.

[0296] **VI. 조성물**

[0297] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0298] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본원에 개시된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및/또는 이 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0299] 본원에 사용된 용어 '조성물'은 약학 조성물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. '약학 조성물'은 세포 또는 동물에 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 형태의 요법과 조합하여 투여하기 위한 약학적으로 허용되는 또는 생

리학적으로 허용되는 용액으로 제제화된 활성 약제를 지칭한다. 또한, 원하는 경우, 본 발명의 조성물이 예를 들어, 시토킨, 성장 인자, 호르몬, 소분자, 화학요법제, 전구약물, 약물, 항체, 또는 다른 다양한 약학 활성제와 같은 다른 작용제와 조합하여 투여될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 추가의 작용제가 의도된 치료를 전달하는 조성물의 능력에 악영향을 미치지 않는 한, 조성물에 또한 포함될 수 있는 다른 성분에는 사실상 제한이 없다. '약학적으로 허용되는'이라는 문구는 본원에서 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 합리적인 유익/유해비에 상응하게, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 재료, 조성물 및/또는 제형을 지칭하도록 사용된다.

[0300] 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 또한 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, '약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제'는 미국 식품 의약국에서 사람 또는 가축에서의 사용에 허용되는 것으로 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활택제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증진제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장제, 용매, 계면활성제, 또는 유화제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약학적으로 허용되는 담체는, 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 및 셀룰로스 아세테이트; 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터; 밀납; 동물성 및 채소 지방; 파라핀; 실리콘; 벤토나이트; 규산; 산화아연; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화씨유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 소르비톨, 만니톨, 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트, 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대 수산화 마그네슘 및 수산화 알루미늄; 알긴산; 발열물질 제거수; 등장성 염수; 링거 용액; 에틸 알코올; 인산염 완충 용액; 및 약학 제형에서 사용되는 임의의 기타 상용성 물질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0301] 용액, 현탁액 또는 다른 유사 형태의 형태인, 액체 약학 조성물은, 무균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리학적 식염수; 링거액; 등장성 염화나트륨; 고정유, 예컨대 용매 또는 현탁 매질로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드; 폴리에틸렌 글리콜; 글리세린; 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매; 항균제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충액, 예컨대 초산염, 구연산염, 또는 인산염; 및 긴장성[tonicity] 조절을 위한 작용제, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰풀, 일회용 주사기 또는 다회 투여용 바이알 내에 봉입될 수 있다. 주사가능한 약학 조성물은 바람직하게는 무균이다.

[0302] 조성물은 정맥내, 종양내, 경구, 직장, 질, 비경구, 국소, 폐, 비강내, 협측[buccal], 안과, 또는 다른 투여 경로를 위해 적절하게 개발될 수 있다.

[0303] **VII. 유전자 편집 방법**

[0304] 일부 구현예에서, 하나 이상의 유전자를 녹아웃, 녹다운 또는 달리 변형시키기 위해 세포를 유전적으로 변형시키는 방법은, 예를 들어 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, 전위효소, 및 군집화된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부[clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR]/Cas 시스템뿐만 아니라 틈내기효소[nickase] 시스템, 염기 편집 시스템, 프라임 편집 시스템, 및 당업계에 알려진 임의의 다른 유전자 편집 시스템을 포함하는 부위-유도[site-directed] 핵산분해효소를 사용하는 것을 포함한다.

[0305] ZFN은 세균 FokI 제한 효소의 핵산내부분해효소 도메인에 부착된 아연 집게-함유 전사 인자로부터 적합화된 부위-특이적 DNA 결합 도메인의 배열을 포함하는 융합 단백질이다. ZFN은 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상)의 DNA 결합 도메인 또는 아연 집게 도메인을 가질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160] 참조. 개별 DNA 결합 도메인은 전형적으로 '핑거(finger)' 또는 '아연 집게'로 지칭된다. 각각의 아연 집게 도메인은 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이며, 일반적으로 3 내지 4 bp DNA 서열을 인식한다. 탠덤(tandem) 도메인은, 이에 따라 세포의 유전체 내에 독특한 확장된 뉴클레오티드 서열에 잠재적으로 결합할 수 있다. 각각의 핑거는 2-4개의 DNA 염기쌍, 전형적으로 3-4개의 DNA 염기쌍에 결합한다. DNA 결합 도메인은 표적 부위 또는 표적 절편으로 명명되는 핵산 서열에 결합한다. 각각의 핑거는 전형적으로 대략 30개의 아미노산, 아연-킬레이팅, DNA-결합 하위도메인을 포함한다. 연구는 이 부류의 단일 아연 집게가 단일 베타 회전(turn)의 두 개의 시스테인 잔기와 함께 아연으로 배위된 두 개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하는 알파 나선으로 이루어진다는 것을 입증하였다(예를 들어, 문헌[Berg & Shi, Science 271:1081-1085

(1996)] 참조).

[0306] 알려진 특이성의 다양한 아연 집게를 조합하여 약 6, 9, 12, 15 또는 18 bp 서열을 인식하는 다중-핑거 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-혼성계[yeast one-hybrid system], 세균 1-혼성 및 2-혼성계, 및 포유동물 세포를 비롯한, 특정 서열을 인식하는 아연 집게(및 이의 조합)을 생성하기 위해, 다양한 선택 및 모듈식 조립 기술이 이용 가능하다. 아연 집게는 예정된 핵산 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 예정된 핵산 서열에 결합하도록 아연 집게를 조작하는 기준은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Sera et al., Biochemistry (2002) 41:7074-7081; Liu et al., Bioinformatics (2008) 24:1850-1857]을 참조.

[0307] FokI 핵산분해효소 도메인 또는 다른 이량체 핵산분해효소 도메인을 함유하는 ZFN은 이량체로서 기능한다. 따라서, 비-회문 DNA 부위를 표적화하기 위해서는 한 쌍의 ZFN이 필요하다. 두 개의 개별 ZFN은 적절한 간격으로 떨어져 있는 이들의 핵산분해효소를 사용하여 DNA의 반대 가닥에 결합해야 한다. 문헌[Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:10570-10575]참조. 유전체에서 특이적 부위를 절단하기 위해, 한 쌍의 ZFN은 부위에 측면 근접하는 두 개의 서열을 인식하도록 설계되며, 하나는 정방향 가닥에 있고 다른 하나는 역방향 가닥에 있다. 부위의 양쪽에서 ZFN이 결합하면, 핵산분해효소 도메인이 해당 부위에서 DNA를 이량체화하고 절단하여 5' 오버행(overhang)을 가진 DSB를 생성한다. 그런 다음 HDR을 사용하여 상동성 팔이 측면에 있는 원하는 돌연변이를 함유하는 복구 주형의 도움으로 특정 돌연변이를 도입할 수 있다. 복구 주형은 일반적으로 세포에 도입된 외인성 이중 가닥 DNA 벡터이다. 문헌[Miller et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:731-734] 참조.

[0308] TALEN은 표적 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 핵산분해효소의 또 다른 예이다. 'TALE-핵산분해효소'[TALEN]는 전사 활성자 유사 효과기[TALE]에서 유래한 핵산-결합 도메인 및 핵산 표적 서열을 절단하기 위한 하나의 핵산분해효소 촉매 도메인으로 이루어진 융합 단백질이다. 촉매 도메인은 바람직하게는 핵산분해효소 도메인이고, 더욱 바람직하게는 핵산내부분해효소 활성을 갖는 도메인으로, 예를 들어 I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-Ik이다. 다양한 구현예에서, TALE 도메인은 예를 들어 I-CreI 및 I-OnuI 또는 그의 기능적 변이체와 같은 메가핵산분해효소에 융합될 수 있다. 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 핵산분해효소는 단량체성 TALE-핵산분해효소이다. 단량체성 TALE-핵산분해효소는 제WO2012138927호에 기재된 I-TevI의 촉매 도메인과 조작된 TAL 반복부의 융합과 같은 특이적 인식 및 절단을 위한 이량체화를 필요로 하지 않는 TALE-핵산분해효소이다.

[0309] 전사 활성자 유사 효과기[Transcription Activator like Effector, TALE]는 박테리아 종인 잔토모나스 유래의 단백질이며, 복수의 반복된 서열을 포함한다. 각각의 반복부는 33 내지 35개 아미노산 길이이며, 위치 12 및 13에 핵산 표적화된 서열의 각각의 뉴클레오티드 염기에 특이적인 두 개의 인접 아미노산(반복부-가변성 두 개 잔기[repeat-variable di-residue] 또는 RVD로 지칭됨)을 갖는다. 유사한 모듈형 염기당 염기 핵산 결합 특성을 갖는 결합 도메인[modular base-per-base nucleic acid binding properties, MBBBD] 또한 상이한 박테리아 종에서 최근에 발견된 새로운 모듈형 단백질에서 유래될 수 있다. 새로운 모듈형 단백질은 TAL 반복부보다 더 많은 서열 가변성을 나타내는 이점을 갖는다. 바람직하게는, 상이한 뉴클레오티드의 인식과 연관된 RVD는 C를 인식하기 위한 HD, T를 인식하기 위한 NG, A를 인식하기 위한 NI, G 또는 A를 인식하기 위한 NN, A, C, G 또는 T를 인식하기 위한 NS, T를 인식하기 위한 HG, T를 인식하기 위한 IG, G를 인식하기 위한 NK, C를 인식하기 위한 HA, C를 인식하기 위한 ND, C를 인식하기 위한 HI, G를 인식하기 위한 HN, G를 인식하기 위한 NA, G 또는 A를 인식하기 위한 SN 및 T를 인식하기 위한 YG, A를 인식하기 위한 TL, A 또는 G를 인식하기 위한 VT 및 A를 인식하기 위한 SW이다. 또 다른 구현예에서, 결정적 아미노산 12 및 13은 뉴클레오티드 A, T, C 및 G에 대한 특이성을 조절하기 위해, 특히 이러한 특이성을 향상시키기 위해 다른 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다. TALEN 키트는 시판된다.

[0310] TALEN은 하나 이상의 TALE DNA 결합 도메인(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 개 이상)을 핵산분해효소 도메인, 예를 들어, FokI 핵산내부분해효소 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생산된다. 문헌[Zhang, Nature Biotech. (2011) 29:149-153] 참조. TALEN에서의 사용을 위해 FokI에 대한 여러 돌연변이가 만들어졌으며, 예를 들어 이는 절단 특이성 또는 활성을 개선한다. 문헌[Cermak et al., Nucl. Acids Res. (2011) 39:e82; Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., Nature Biotech. (2011) 29:731-734; Wood et al., Science (2011) 333:307; Doyon et al., Nature Methods (2010) 8:74-79; Szczepek et al., Nature Biotech (2007) 25:786-793; Guo et al., J. Mol. Biol. (2010) 200:96] 참조. FokI 도메인은 이량체로서 기능하여, 적절한 배향 및 간격을 갖는 표적 유전체 내의 부위에 대한 독특한 DNA 결합 도메인을 갖는, 두 개의 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 핵산분해효소 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수 및 두 개의 개별적인 TALEN 결합 부위들 사이의 염기의 수 모두는, 높은 수준의 활성을 달성하기 위해 중요

한 파라미터인 것으로 여겨진다. 문헌[Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148] 참조.

[0311] 조작된 TALE 반복부를 핵산분해효소 도메인과 조합함으로써, 부위-특이적 핵산분해효소가 임의의 원하는 DNA 서열에 특이적으로 생성될 수 있다. ZFN과 유사하게, TALEN은 세포 내로 도입되어 유전체 내의 원하는 표적 부위에서 DSB를 생성할 수 있고, 따라서 유사한 HDR-매개 경로에서 유전자 녹아웃 또는 돌연변이 녹인에 사용될 수 있다. 문헌[Boch, Nature Biotech. (2011) 29:135-136; Boch et al., Science (2009) 326:1509-1512; Moscou et al., Science (2009) 326:3501] 참조.

[0312] 메가핵산분해효소는 핵산내부분해효소 족의 서열 특이적 효소이며, 이는 큰 DNA 서열(14 내지 40개 염기쌍)을 인식하고 절단하는 능력을 특징으로 한다. (문헌[Chevalier, B. S. 및 B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774]). 이들은 살아있는 세포에서 독특한 부위를 절단하여, 절단 부위 부근에서 1000 배 이상까지 유전자 표적화를 향상시킬 수 있다(문헌[Puchta et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040; Rouet et al., Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106; Choulika et al., Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968-1973; Puchta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-5060; Sargent et al., Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 267-77; Donoho et al., Mol. Cell. Biol, 1998, 18, 4070-4078; Elliott et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 93-101; Cohen-Tannoudji et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444-1448] 참조).

[0313] 메가핵산분해효소는 핵산분해효소 활성 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 구조적 모티프에 기반하여 족들로 분류된다. 가장 널리 퍼져 있고 가장 잘 알려져 있는 메가핵산분해효소는 LAGLIDADG 족의 단백질이며, 이 명칭은 보존된 아미노산 서열에 기인한 것이다. 문헌[Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18): 3757-3774] 참조. 한편, GIY-YIG 족 구성원은 잔기 길이가 70-100개이며, 네 개의 불변 잔기를 갖는 네 개 또는 다섯 개의 보존된 서열 모티프를 포함하고, 두 개의 불변 잔기가 활성에 필요한, GIY-YIG 모듈을 갖는다. 문헌[Van Roey et al., Nature Struct. Biol. (2002) 9:806-811] 참조. His-Cys족 메가핵산분해효소는 수백 개의 아미노산 잔기를 포함하는 영역에 걸쳐 고도로 보존된 일련의 히스티딘과 시스테인을 특징으로 한다. 문헌[Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774] 참조. NHN족의 구성원은 아스파라긴 잔기로 둘러싸인 두 쌍의 보존된 히스티딘을 함유하는 모티프로 정의된다. 문헌[Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774.] 참조.

[0314] 높은 특이성 요건으로 인해 특정 표적 DNA 서열에 대한 천연 메가핵산분해효소의 확인 가능성은 낮기 때문에, 돌연변이유발 및 고속 대량 선별 방법을 비롯한 다양한 방법을 사용하여 독특한 서열을 인식하는 메가핵산분해효소 변이체를 생성하였다. 예를 들어, 사전 결정된 핵산 서열에 결합하기 위해 변경된 DNA-결합 특이성을 갖는 메가핵산분해효소를 조작하기 위한 전략은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Chevalier et al., Mol. Cell. (2002) 10:895-905; Epinat et al., Nucleic Acids Res (2003) 31:2952-2962; Silva et al., J Mol. Biol. (2006) 361:744-754; Seligman et al., Nucleic Acids Res (2002) 30:3870-3879; Sussman et al., J Mol Biol (2004) 342:31-41; Doyon et al., J Am Chem Soc (2006) 128:2477-2484; Chen et al., Protein Eng Des Sel (2009) 22:249-256; Arnould et al., J Mol Biol. (2006) 355:443-458; Smith et al., Nucleic Acids Res. (2006) 363(2):283-294] 참조.

[0315] ZFN 및 TALEN과 마찬가지로, 메가핵산분해효소는 유전체 DNA에서 DSB를 생성할 수 있으며, 이는 예컨대, NHEJ를 통해 부적절하게 복구되는 경우 프레임-이동 돌연변이를 생성하여 세포에서 표적 유전자의 발현의 감소를 야기할 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 메가핵산분해효소와 함께 세포 내로 도입될 수 있다. 외래 DNA 및 염색체 서열에 따라, 이 과정은 표적 유전자를 변형시키는 데 사용될 수 있다. 문헌[Silva et al., Current Gene Therapy (2011) 11:11-27] 참조.

[0316] 전위효소는 전위인자의 단부에 결합하고, 잘라 붙이기 메커니즘 또는 복제 전위 메커니즘에 의해 유전체의 다른 부분으로 이의 이동을 촉진시키는 효소이다. CRISPER/Cas 시스템과 같은 다른 시스템에 전위효소를 연결함으로써, 유전체 DNA의 부위 특이적 삽입 또는 조작을 가능하게 하기 위해 새로운 유전자 편집 도구가 개발될 수 있다. 촉매적으로 불활성인 Cas 효과기 단백질 및 Tn7-유사 전위인자를 사용하는 전위인자를 이용하는 두 개의 알려진 DNA 통합 방법이 있다. 전위효소-의존적 DNA 통합은 유전체에서 DSB를 유발하지 않으며, 이는 더 안전하고 더 특이적인 DNA 통합을 보장할 수 있다.

[0317] CRISPR 시스템은 획득 면역의 형태를 제공하는 침입 파지 및 플라스미드에 대한 방어에 관련된 시스템으로서, 본래 원핵 생물(예를 들어, 박테리아 및 고세균)에서 발견되었다. 지금은 연구 및 임상 응용 분야에서 인기 있는 유전자 편집 도구로 채택되어 사용되고 있다.

[0318] CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 적어도 두 개의 구성성분, 즉 하나 이상의 안내 RNA[gRNA] 및 Cas 단백질을 포함한다. Cas 단백질은 DSB를 표적 부위에 도입하는 핵산분해효소이다. CRISPR-Cas 시스템은 두 개의 주요 부류에 속하는데, 클래스 1 시스템은 다중 Cas 단백질의 복합체를 사용하여 핵산을 분해하고, 클래스 2 시스템은 동일한 목적을 위해 단일의 거대한 Cas 단백질을 사용한다. 클래스 1은 I, III 및 IV형으로 나누어지고, 클래스 2는 II, V 및 VI으로 나누어진다. 유전자 편집 적용에 적합한 상이한 Cas 단백질은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, 및 Mad7을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 가장 널리 사용되는 Cas9가 본원에 예시로서 기재되어 있다. 이들 Cas 단백질은 상이한 공급원 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas9는 S. 피오게네스(*S. pyogenes*) 또는 S. 아우레우스(*S. aureus*)로부터 유래될 수 있다.

[0319] 원래의 미생물 유전체에서, II형 CRISPR 시스템은 숙주 유전체 내에서 배열로서 암호화된 CRISPR 반복부 서열 사이에서 침입 DNA의 서열을 통합한다. CRISPR 반복부 배열 유래의 전사체는 '프로토스페이서(protospacer)' 서열뿐만 아니라 CRISPR 반복부의 부분으로 알려진 침입 DNA에서 전사된 가변 서열을 각각 보유하는 CRISPR RNA(crRNA)로 가공된다. 각각의 crRNA는 제2 전사활성 CRISPR RNA[tracrRNA]와 혼성화하고, 이들 두 RNA는 Cas9 핵산분해효소와 복합체를 형성한다. crRNA의 프로토스페이서-암호화된 부분은 Cas9 복합체가 상보적인 표적 DNA 서열을 절단하도록 지시하며, 단, 이들은 '프로토스페이서 인접 모티프'[protospacer adjacent motif, PAM]로서 알려진 짧은 서열에 인접한다.

[0320] 이의 발견 이후로, CRISPR 시스템은 박테리아에서부터 인간 세포를 포함하는 진핵 세포까지 걸쳐 매우 다양한 세포 및 생물에서 서열 특이적 DSB 및 표적화된 유전체 편집을 유도하는 데 적합하게 되었다. 유전자 편집 적용 분야에서의 이의 사용에서, 인공적으로 설계된, 합성 gRNA는 본래의 crRNA:tracrRNA 복합체를 대체하였다. 예를 들어, gRNA는 crRNA, 테트라루프(tetraloop) 및 tracrRNA로 구성된 단일 안내 RNA[single guide RNA, sgRNA]일 수 있다. crRNA는 보통 관심의 표적 DNA를 인식하도록 사용자-설계된 상보적 영역(스페이서로도 명명되며, 보통 약 20개의 뉴클레오티드 길이임)을 포함한다. tracrRNA 서열은 Cas 핵산분해효소 결합에 대한 뼈대[scaffold] 영역을 포함한다. crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 테트라루프에 의해 연결되고, 각각은 서로 혼성화를 위해 짧은 반복부 서열을 갖고, 따라서, 키메라 sgRNA를 생성한다. gRNA에 존재하는 스페이서 또는 상보적 영역 서열을 간단히 변화시킴으로써 Cas 핵산분해효소의 유전체 표적을 변화시킬 수 있다. 상보적 영역은 표준 RNA-DNA 상보적 염기쌍 형성 규칙을 통해 Cas 핵산분해효소를 표적 DNA로 향하게 할 것이다.

[0321] Cas 핵산분해효소가 기능하기 위해서는, 유전체 DNA에서 표적 서열의 바로 하류에 PAM이 있어야 한다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 유전체 서열을 탈안정화시켜, gRNA에 의한 서열의 조사[interrogation]를 가능하게 하고 일치 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 짝짓기를 일으키는 것으로 여겨진다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 다르다. 예를 들어, S. 피오게네스에서 유래한 가장 통상적으로 사용되는 Cas9 핵산분해효소는 5'-NGG-3' 또는 덜 효율적인 비로, 5'-NAG-3'의 PAM 서열을 인식하며, 여기서 'N'은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대안적인 PAM을 갖는 다른 Cas 핵산분해효소 변이체가 또한 특징화되었고, 아래의 표 4에 요약된 유전체 편집에 성공적으로 사용되었다.

[0322] [표 4] 예시적인 Cas 핵산분해효소 변이체 및 이들의 PAM 서열

CRISPR 핵산분해효소	공급원 생물	서열(5'→3')
SpCas9	스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*)	NGG 또는 NAG
SaCas9	스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)	NGRRT 또는 NGRRN
NmeCas9	네이세리아 메닌기티디스 (*Neisseria meningitidis*)	NNNNGATT
CjCas9	캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*)	NNNNRYAC
StCas9	스트렙코코커스 써모필러스 (*Streptococcus thermophilus*)	NNAGAAW
TdCas9	트레포네마 덴티콜라 (*Treponema denticola*)	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	라크노스피라세아 박테리움 (*Lachnospiraceae bacterium*)	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	아시다미노코커스 종 (*Acidaminococcus sp.*)	TTTV
AacCas12b	알리사이클로바실러스 아시디필러스 (*Alicyclobacillus acidiphilus*)	TTN
BhCas12b v4	바실러스 히사시(*Bacillus hisashii*)	ATTN, TTTN, 또는 GTTN

[0323]

[0324] R = A 또는 G; Y = C 또는 T; W = A 또는 T; V = A 또는 C 또는 G; N = 임의의 염기

[0325] 일부 구현예에서, Cas 핵산분해효소는 이들의 활성, 특이성, 인식 및/또는 다른 특징을 변경시키기 위해 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, Cas 핵산분해효소는 표적 이탈[off-target] 효과를 완화시키기 위해 이의 정확도[fidelity]를 변경시키는 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 evoSpCas9)를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, Cas 핵산분해효소는 이의 PAM 특이성을 변경시키는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0326] Cas, 특히 Cas9, 핵산분해효소의 핵산분해효소 도메인은 독립적으로 돌연변이되어 DNA '틈내기효소'로서 지칭되는 효소를 생성할 수 있다. 틈내기효소는 예를 들어, CRISPR/Cas9를 비롯하여, 일반 CRISPR/Cas 핵분해효소 시스템과 동일한 특이성을 갖는 단일 가닥 절단을 도입할 수 있다. 틈내기효소는 유전자 편집 시스템에서 사용될 수 있는 이중 가닥 파손을 생성하기 위해 사용될 수 있다(문헌[Mali et al., Nat Biotech, 31(9):833-838 (2013); Mali et al. Nature Methods, 10:957-963 (2013); Mali et al., Science, 339(6121):823-826 (2013)). 일부 경우에서, 두 개의 Cas 틈내기효소가 사용될 때, 정확한 유전자 통합 및 삽입에 대한 추가적인 제어를 허용하는 평활 말단 대신에 절단된 말단 각각에 긴 오버행이 생성된다(문헌[Mali et al., Nat Biotech, 31(9):833-838 (2013); Mali et al. Nature Methods, 10:957-963 (2013); Mali et al., Science, 339(6121):823-826 (2013)]). 두 틈내기 Cas 효소 모두는 이들의 표적 DNA에 효과적으로 틈내기를 해야 하기 때문에, 짝지어진 틈내기효소는 이중 가닥-절단 Cas-기반 시스템과 비교하여 더 낮은 표적이탈 효과를 가질 수 있다(문헌[Ran et al., Cell, 155(2):479-480(2013); Mali et al., Nat Biotech, 31(9):833-838 (2013); Mali et al., Nature Methods, 10:957-963 (2013); Mali et al., Science, 339(6121):823-826 (2013)].

[0327] CRISPR/Cas 시스템이 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경시키는 것을 가능하게 하는 이러한 Cas 단백질의 분자 기구는 RNA 결합 단백질, 핵산내부분해효소 및 핵산외부분해효소, 나선효소 및 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CRISPR/Cas 시스템은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화할 수 있는 적어도 한 개 내지 두 개의 리보핵산 및 Cas 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, '단백질' 및 '폴리펩티드'는 펩티드 결합에 의해 결합된 일련의 아미노산 잔기(즉, 아미노산의 중합체)를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용되고, 변형된 아미노산(예를 들어, 인산화, 당화, 글리코실화 등) 및 아미노산 유사체를 포함한다. 예시적인 폴리펩티드 또는 단백질은 상기의 유전자 산물, 자연 발생 단백질, 동족체, 이원체[paralog], 단편 및 다른 등가물, 변이체, 및 유사체를 포함한다.

[0328] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 일부 경우에서, 치환 및/또는 변형은 단백질 분해를 방지하거나 감소시킬 수 있고/있거나 세포에서 폴리펩티드의 반감기를 연장시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Cas

단백질은 펩티드 결합 대체(예를 들어, 우레아, 티오우레아, 카르바메이트, 설포닐 우레아, 등)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 대안적인 아미노산(예를 들어, D-아미노산, 베타-아미노산, 호모시스테인, 포스포세린, 등)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 모이어티(moiety)를 포함하기 위한 변형(예를 들어, 페길화[PEGylation], 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 단부-캡핑 등)을 포함할 수 있다.

[0329] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 핵심 Cas 단백질, 이의 동형체, 또는 임의의 Cas 단백질 또는 이의 동형체과 유사한 기능 또는 활성을 갖는 임의의 Cas-유사 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 핵심 Cas 단백질을 포함한다. 예시적인 Cas 핵심 단백질은 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 및 Cas9를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 V형 Cas 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 대장균[*E. coli*] 하위유형의 Cas 단백질(CASS2로도 알려짐)을 포함한다. 대장균 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, 및 Cas5e를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Ypest 하위유형의 Cas 단백질(CASS3으로도 알려짐)을 포함한다. Ypest 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csy1, Csy2, Csy3, 및 Csy4를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Nmeni 하위유형의 Cas 단백질(CASS4로도 알려짐)을 포함한다. Nmeni 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csn1 및 Csn2를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Dvulg 하위유형의 Cas 단백질 (CASS1로도 알려짐)을 포함한다. Dvulg 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csd1, Csd2, 및 Cas5d를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Tneap 하위유형의 Cas 단백질(CASS7로도 알려짐)을 포함한다. Tneap 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Cst1, Cst2, Cas5t를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Hmari 하위유형의 Cas 단백질을 포함한다. Hmari 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csh1, Csh2, 및 Cas5h를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Apern 하위유형의 Cas 단백질(CASS5로도 알려짐)을 포함한다. Apern 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, 및 Cas5a를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Mtube 하위유형의 Cas 단백질(CASS6으로도 알려짐)을 포함한다. Mtube 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, 및 Csm5를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 RAMP 모듈 Cas 단백질을 포함한다. 예시적인 RAMP 모듈 Cas 단백질은 Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 및 Cmr6을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Klompe et al., Nature 571, 219-225 (2019); Strecker et al., Science 365, 48-53 (2019)] 참조. Cas 단백질의 예는 Cas3, Cas8a, Cas5, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1, Cse2, Csy1, Csy2, Csy3, 및/또는 GSU0054를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas3, Cas8a, Cas5, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1, Cse2, Csy1, Csy2, Csy3, 및/또는 GSU0054를 포함한다. Cas 단백질의 예는 Cas9, Csn2 및/또는 Cas4를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9, Csn2 및/또는 Cas4를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질의 예는 Cas10, Csm2, Cmr5, Cas10, Csx11, 및/또는 Csx10을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas10, Csm2, Cmr5, Cas10, Csx11, 및/또는 Csx10을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질의 예는 Csf1을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질의 예는 Csf1을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질의 예는 Cas12a, Cas12b, Cas12c, C2c4, C2c8, C2c5, C2c10, 및 C2c9, 또한 CasX(Cas12e) 및 CasY(Cas12d)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 예컨대, 문헌[Koonin et al., Curr Opin Microbiol. 2017; 37:67-78: "Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems."] 참조. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas12a, Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas12d, 및/또는 Cas12e를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas13, Cas13a, C2c2, Cas13b, Cas13c, 및/또는 Cas13d를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은, a) Cas3, Cas8a, Cas5, Cas8b, Cas8c, Cas10d, Cse1, Cse2, Csy1, Csy2, Csy3, 및 GSU0054, b) Cas9, Csn2, 및 Cas4, c) Cas10, Csm2, Cmr5, Cas10, Csx11 및 Csx10, d) Csf1, e) Cas12a, Cas12b, Cas12c, C2c4, C2c8, C2c5, C2c10, C2c9, CasX(Cas12e) 및 CasY(Cas12d), 및 f) Cas13, Cas13a, C2c2, Cas13b, Cas13c 및 Cas13d로 이루어진 군에서 선택된 Cas 효과기 단백질을 포함한다.

[0330] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 Cas 단백질 중 어느 하나 또는 이들의 기능적 부분을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '기능적 부분'은 적어도 하나의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA[gRNA])와 복합체를 형성하고 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 절단하는 능력을 보유하는 펩티드의 부분을 지칭한다. 일부 구현예에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 나선효소 도메인, 및 핵산내부분해효소 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 작동 가능한 상태로 연결된 Cas9 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 나선효소 도메인, 및 핵산내부분해효소 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 작동 가능한 상태로 연결된 Cas12a(Cpf1으로도

알려짐) 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 도메인은 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질의 기능적 부분은 RuvC-유사 도메인의 기능적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질의 기능적 부분은 HNH 핵산분해효소 도메인의 기능적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질의 기능적 부분은 RuvC-유사 도메인의 기능적 부분을 포함한다.

[0331] 일부 구현예에서, 외인성 Cas 단백질은 폴리펩티드 형태로 세포에 도입될 수 있다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 세포-침투 폴리펩티드 또는 세포-침투 펩티드에 접합되거나 융합될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, '세포-침투 폴리펩티드' 및 '세포-침투 펩티드'는, 각각 세포 내로 분자의 흡수를 용이하게 하는, 폴리펩티드 또는 펩티드를 지칭한다. 세포-침투 폴리펩티드는 검출 가능한 표지를 함유할 수 있다.

[0332] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 하전된 단백질(예를 들어, 양성, 음성 또는 전체적으로 중성인 전기적 하전을 지님)에 접합되거나 융합될 수 있다. 이러한 연결은 공유결합일 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 세포를 침투하는 Cas 단백질의 능력을 유의하게 증가시키기 위해 초양성으로[superpositvely] 하전된 GFP에 융합될 수 있다(문헌[Cronican et al. ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52]). 특정 구현예에서, Cas 단백질은 세포 내로의 진입을 용이하게 하기 위해 단백질 형질도입 도메인[protein transduction domain, PTD]에 융합될 수 있다. 예시적인 PTD는 Tat, 올리고아르기닌, 및 페네트라틴을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 세포-침투 펩티드에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 PTD에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 tat 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 세포-침투 펩티드에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 PTD에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 tat 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다.

[0333] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 형태로 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 세포에 도입될 수 있다. 핵산을 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 본원에 기재된 것을 포함한다.

[0334] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 한 개 내지 두 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 두 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 한 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 변형된 핵산(예를 들어, 합성, 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.

[0335] 본 기술의 방법은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화할 수 있는 임의의 리보핵산의 용도를 고려한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 tracrRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 CRISPR RNA(crRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 리보핵산은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 리보핵산은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산 둘 모두는 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다. 본 개시의 리보핵산은 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이용된 특정 CRISPR/Cas 시스템, 및 표적 폴리뉴클레오티드의 서열에 따라, 다양한 상이한 표적 모티프를 혼성화하도록 선택될 수 있다. 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 또한 표적 폴리뉴클레오티드 서열 이외의 핵산 서열과의 혼성화를 최소화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 세포 내의 모든 다른 유전체 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 두 개의 불일치를 함유하는 표적 모티프에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 세포 내의 모든 다른 유전체 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 한 개의 불일치를 함유하는 표적 모티프에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 Cas 단백질에 의해 인식된 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화하도록 설계된다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산 각각은 표적 모티프 사이에 위치한 돌연변이체 대립유전자에 대해 측면 근접하는 Cas 단백질에 의해 인식된 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화하도록 설계된다.

[0336] 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산 각각은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프에 지시하고 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다.

[0337] 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 동일 가닥상의 서열에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 마주보는 가닥상의 서열에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 마주보는 가닥상의 서열에 상보적이 아니고/아니거나 이에 혼성화되지 않는다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 중복 표적 모티프에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 상쇄 표적 모티프에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다.

[0338] **VIII. 조작된 CD47 단백질의 발현 방법**

[0339] 여기에 제공된 조작된 CD47 단백질은 생체내(in vivo) 및 시험관내(in vitro) 방법을 포함하여 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 원하는 단백질은 필요한 양 및 형태의 단백질을 생산하기에 적합한 임의의 생물에서 발현될 수 있다. 발현 숙주는 대장균, 효모, 식물, 곤충 세포, 인간 세포주 및 형질전환 동물을 포함하는 포유동물 세포와 같은 원핵 및 진핵 생물을 포함한다. 발현 숙주는 발현된 단백질에 존재하는 번역 후 변형의 유형뿐만 아니라 단백질 생산 수준에서 상이할 수 있다. 발현 숙주의 선택은 규제 및 안전 고려 사항, 생산 비용 및 정제의 필요성 및 방법과 같은 이러한 요인 및 기타 요인을 기준으로 이루어질 수 있다.

[0340] 본원에 기재된 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질주입, 전기천공, 융합원[fusogen] 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입(예를 들어, AAV 형질도입, 렌티바이러스 형질도입)을 통해 세포 내로 도입되거나, 그렇지 않으면 바이러스 벡터상에 전달된다(예를 들어, 융합원-매개 전달). 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 조건적 또는 유도성 전위효소, 조건적 또는 유도성 피기백(PiggyBac) 전위인자, 조건적 또는 유도성 슬리핑 뷰티(Sleeping Bequty)(SB11) 전위인자, 조건적 또는 유도성 Mos1 전위인자, 및 조건적 또는 유도성 Tol2 전위인자로 이루어진 군에서 선택되는 전위효소 시스템 또는 융합원-매개 전달을 통해 세포 내로 도입된다.

[0341] 많은 발현 벡터가 이용 가능하고 당업자에게 알려져 있으며, 단백질의 발현에 사용될 수 있다. 발현 벡터의 선택은 숙주 발현 시스템의 선택에 의해 영향을 받을 것이다. 일반적으로, 발현 벡터는 전사 프로모터 및 임의로 인핸서, 번역 신호, 및 전사 및 번역 종결 신호를 포함할 수 있다. 안정한 형질전환에 사용되는 발현 벡터는 전형적으로 형질전환된 세포의 선발 및 유지를 허용하는 선발 마커를 갖는다. 일부 경우에서, 복제 기점[origin of replication]은 벡터의 복제 수를 증폭하기 위해 사용될 수 있다.

[0342] 발현 벡터는 예를 들어 형질전환, 형질감염, 형질도입, 감염, 전기천공, 및 초음파천공을 통해 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 당업자는 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하기에 적합한 방법 및 조건을 선택할 수 있다.

[0343] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 예를 들어 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화되고, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다.

[0344] 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 하나 이상의 유전자 편집 시스템을 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 CRISPR/Cas이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 TALEN을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 아연 집게 핵산분해효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 메가핵산분해효소를 포함한다.

[0345] 선발 마커를 포함하는 벡터의 도입 후에, 세포는 선택 배지로 전환되기 전에 농축된 배지에서 1-2일 동안 성장하도록 허용될 수 있다. 선발 마커의 목적은 선발에 대한 내성을 부여하는 것이며, 이의 존재는 도입된 서열을 성공적으로 발현하는 세포의 성장 및 회복을 허용한다. 안정적으로 형질전환된 세포의 내성 세포는 세포 유형에 적합한 조직 배양 기술을 사용하여 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 포유동물 발현 시스템에서 발현된다. 발현 작제물은 바이러스 감염, 예컨대 아데노바이러스 작제물에 의해, 또는 직접적인 DNA 전달, 예컨대 리포솜, 인산칼슘, DEAE-덱스트란에 의해, 그리고 물리적 수단, 예컨대 전기천공 및 미세주입에 의해 포유동물 세포로 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 예를 들어 벡터로, 바이러스 형

질도입을 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 위형의 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 벡터는 수포성 구내염 VSV-G 외피로 위형화되고, 외인성 폴리뉴클레오티드를 운반하는 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 조작된 CD47 단백질은 하나 이상의 유전자 편집 시스템을 이용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 CRISPR/Cas이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 TALEN을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 아연 집게 핵산분해효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 메가핵산분해효소를 포함한다.

[0346] 일부 구현예에서, 본 개시의 맥락에서 사용되는 시스템이라는 표현은 미국 출원 제63/270,454호에 개시되어 있다.

[0347] 포유동물 세포에 대한 발현 벡터는 전형적으로 mRNA 캡 부위, TATA 상자, 번역 개시 서열(코작(Kozak) 공통 서열), 및 폴리아데닐화 요소를 포함한다. IRES 요소는 또한 선발 마커와 같은 다른 유전자와의 이중시스트론성 발현을 허용하기 위해 첨가될 수 있다. 이러한 벡터는 종종 고수준 발현을 위한 전사 프로모터-인핸서, 예를 들어 SV40 프로모터-인핸서, 인간 거대세포바이러스[CMV] 프로모터 및 라우스 육종 바이러스[RSV]의 긴 말단 반복부를 포함한다. 이들 프로모터-인핸서는 많은 세포 유형에서 활성이다. 조직 및 세포-유형 프로모터 및 인핸서 영역이 또한 발현을 위해 사용될 수 있다. 예시적인 프로모터/인핸서 영역은 엘라스타제(elastase) I, 인슐린, 면역글로불린, 마우스 유방 종양 바이러스, 알부민, 알파 태아단백질, 알파 1 항트립신, 베타 글로빈, 미엘린 염기성 단백질, 미오신 경쇄 2, 및 성선 자극 분비 호르몬 유전자 대조군과 같은 유전자 유래의 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 선발 마커는 발현 작제물을 갖는 세포를 선발 및 유지하기 위해 사용될 수 있다. 선발 마커 유전자의 예는 히그로마이신 B 인산전달효소, 아데노신 탈아미노효소, 잔틴-구아닌 포스포리보실 전달효소, 아미노글리코시드 인산전달효소, 디히드로폴레이트 환원효소[dihydrofolate reductase, DHFR] 및 티미딘 키나제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 발현은 DHFR 유전자를 발현하는 세포만 선발하기 위해 메토트렉세이트의 존재하에 수행될 수 있다.

[0348] 일단 벡터가 적절한 숙주 세포 내로 혼입되면, 숙주 세포는 혼입된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 조작된 CD47 단백질의 발현에 적합한 조건 하에 유지된다. 당업자는 조작된 CD47 단백질의 발현에 적합한 조건을 선택할 수 있다.

[0349] **IX. 기타 특징**

[0350] 세포 치료법 제조과정에서, 세포 치료제에 바람직한 것으로 간주되는 특정 변형이 세포에 도입될 수 있음이 이해될 것이다. 공여자 능력에 대해 프로파일링된[profiled] 세포는 편집되거나 비편집된 세포일 수 있다. 세포의 프로파일링은 세포 편집 전 또는 후에 수행할 수 있다. 편집된 세포는 HIP 변형(면역 회피를 가능하게 하는 저면역 유전자 변형)과 같은 하나 이상의 변형을 포함한다. 면역억제 없이 생체내에 이식되는 경우, HIP-변형된 세포는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 발현이 감소되고, 따라서 전신 면역 반응, 예컨대 T 세포 활성화, 항체 생산, 또는 NK 세포 활성의 증거가 없을 수 있다. 편집된 세포에 관한 개시가 본원에 제공된다. 이러한 개시는 본원에 기재된 방법, 용도 및 세포에 적용 가능하다. 본원에 개시된 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 본원에 기재된 바와 같은 많은 세포 유형에 유리하다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포(예를 들어, CAR-T 세포)이다. 조작된 세포 및 세포 조작 방법

[0351] 세포 치료제에 대해 바람직한 것으로 고려되는 하나의 변형은 조작된 세포 및 이의 집단이 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내는 것이다. 세포 치료제에 대해 바람직한 것으로 고려되는 추가의 변형은 조작된 세포 및 이의 집단이 본원에 기재된 관용원성 인자와 같은 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 것이다.

[0352] 동종이계 이식에 대한 면역계 반응의 효과를 완화 및/또는 회피하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 제공된다. 세포-유래 및/또는 조직 이식의 면역 거부 문제를 극복하기 위해, 임의의 이식가능한 세포 유형에 대한 생존가능한 공급원을 나타내는 조작된 면역-회피 세포(예를 들어, 조작된 일차 저면역원성 세포), 또는 이의 집단 또는 약학 조성물이 본원에 개시된다. 본원에 개시된 조작된 세포는, 대상의 유전적 구성, 또는 하나 이상의 이전의 동종이계 이식, 이전의 자가 키메라 항원 수용체[CAR] T 거부, 및/또는 이식유전자가 발현되는 다른 자가 또는 동종이계 요법에 대한 대상 내에서의 임의의 기존 반응에 관계없이, 수용자인 대상의 면역계에 감소된 인식을 제공한다. 조작된 세포는 베타 섬 세포, B 세포, T 세포, NK 세포, 망막 색소 상피 세포, 신경아교 전구세포, 내피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 및 혈액 세포(예를 들어, 형질 세포 또는 혈소판)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0353] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 세포는 하나 이상의 보체 억제제의 증가된 발현 및/또는 과발현을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 보체 억제제는 CD46, CD59, 및 DAF/CD55 로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD46 및 CD59의 증가된 발현 또는 CD46, CD59, 및 CD55의 증가된 발현과 같은, 둘 이상의 보체 억제제의 조합의 증가된 발현을 포함한다.

[0354] 본원에 제공된 조작된 세포는 관용원성 인자의 발현을 이용하고, 또한 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현(예를 들어, 표면 발현)을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)할 수 있다. 일부 구현예에서, 희귀-절단 핵산내부분해효소(예를 들어, CRISPR/Cas, TALEN, 아연 집게 핵산분해효소, 메가핵산분해효소 및 귀소 핵산내부분해효소 시스템)을 활용하는 유전체 편집 기술은 또한 인간 세포에서 (예를 들어, 결정적 면역 유전자의 유전체 DNA를 결실시킴으로써) 결정적 면역 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 유전체 편집 기술 또는 다른 유전자 조절 기술은 인간 세포에 관용-유도(관용원성)(예를 들어, CD47)을 삽입하여, 수령자 대상 내로 생착될 때, 면역 인식을 회피할 수 있도록 조작된 세포를 생성한다. 따라서, 본원에 제공된 조작된 세포는 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자에 영향을 미치는 인자의 하나 이상의 유전자 및 인자의 조절된 발현(예를 들어, 감소 또는 제거된 발현), 관용원성 인자, 예컨대 CD47의 조절된 발현(예를 들어, 감소 또는 및 조절된 발현(예를 들어, 과발현)을 나타내고, 수용자 대상의 면역계에 의한 감소된 인식을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 세포는 CD142의 조절된 발현(예를 들어, 감소된 발현)을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 세포는 CD46, CD59 및 DAF/CD55로부터 선택된 하나 이상의 보체 억제제의 조절된 발현(예를 들어, 증가된 발현)을 나타낸다.

[0355] 일부 양태에서, 본원에 제공된 조작된 세포는 감소된 선천성 면역 세포 거부 및/또는 적응성 면역 세포 거부(예를 들어, 저면역원성 세포)를 나타낸다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 세포는 NK 세포-매개 용해 및/또는 대식세포 포획에 대한 감소된 감수성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 필요한 면억억제제가 거의 내지 전혀 없이 수용자 대상에 이식될 수 있는 보편적으로 상용성인 세포 또는 조직(예를 들어, 보편적 공여자 세포 또는 조직)의 공급원으로서 유용하다. 이러한 저면역원성 세포는 이식시 세포-특이적 특징 및 특성을 유지한다.

[0356] 일부 구현예에서, MHC-불일치 동종이계 수용자에서 면역 거부를 회피하는 조작된 세포(예를 들어, 조작된 일차 세포)를 투여하는 단계를 포함하는 장애의 치료 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 방법으로 생성된 조작된 세포는, MHC-불일치 동종이계 수용자에게 반복적으로 투여될(예를 들어, 이식 또는 그래프트됨)때, 면역 거부를 회피한다.

[0357] 일부 구현예의 실시는 특별히 달리 명시되지 않는 한, 당 기술 범위 내에 있는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 유전학, 면역학 및 세포 생물학의 통상적인 방법을 사용할 것이며, 그 중 많은 부분이 예시 목적으로 아래에 설명되어 있다. 이러한 기술은 문헌에서 충분히 설명된다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); Annual Review of Immunology]뿐만 아니라, Advances in Immunology과 같은 학술지의 논문 참조.

[0358] 본 출원에 언급된 특허 문서, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 간행물은 마치 각각의 개별 간행물이 참조에 의해 개별적으로 포함된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다. 본원에 기재된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개 출원 및 다른 간행물에 기재된 정의와 상반되거나 다른 방식으로 일치하지 않는 경우, 본원에 기재된 정의가 본원에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.

[0359] 본원에 사용된 섹션 표제는 단지 조직화 목적을 위한 것이며, 기재된 주제로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 당업자는 몇몇 구현예가 본 개시의 범주 및 취지 내에서 가능함을 인지할 것이다. 다음의 설명은 본 개시를 예시하는 것으로, 물론, 본원에 기재된 고려된 실시예들의 범위를 제한하는 것으로 임의의 방식으로 해석되

어서는 안 된다.

[0360] 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포가 본원에 설명된다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형을 함유한다.

[0361] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 또한 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, Serpinb9, 또는 이들의 임의의 조합 중 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 변형은 CD47의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 변형은 PD-L1의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 변형은 HLA-E의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 변형은 HLA-G의 증가된 발현이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키기 위한 변형은 CCL21, PD-L1, FasL, Serpinb9, H2-M3(HLA-G), CD47, CD200 및 Mfge8의 증가된 발현이거나 이를 포함한다.

[0362] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 유전체 변형 및 CD47의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 즉, 조작된 세포는 외인성 CD47 단백질을 포함하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소된 또는 사일런싱된 표면 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 유전체 변형 및 CD47의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 외인성 CD47 핵산 및 단백질을 포함하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소된 또는 사일런싱된 표면 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 유전체 변형, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 유전체 변형, 및 CD47의 발현을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 외인성 CD47 단백질을 포함하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 감소된 또는 사일런싱된 표면 발현을 나타내고, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 감소된 또는 결여된 표면 발현을 나타낸다. 많은 구현예에서, 세포는 $B2M^{인델/인델}$, $CIITA^{인델/인델}$, CD47tg 세포이다.

[0363] 일부 구현예에서, 기재된 바와 같이 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 표적 단백질의 발현을 감소시키기 위해 임의의 유전자 편집 기술이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 핵산분해효소, 통합효소, 전위효소, 재조합효소를 수반하는 시스템을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 유전자의 녹아웃 또는 녹다운에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 유전체의 영역으로의 DNA의 녹인 또는 통합을 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 단일 가닥 파손[single-strand breaks, SSB]을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 비-상동성 단부 결합[non-homologous end-joining, NHEJ] 또는 상동성 유도 복구[homology-directed repair, HDR]와 관련된 것을 포함하는 이중 가닥 파손[double-strand breaks, DSB]을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 DNA-기반 편집 또는 프라임-편집을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[programmable addition via site-specific targeting element, PASTE]를 포함할 수 있다.

[0364] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 염기 편집과 연관된다. 염기 편집기[base editor, BE]는 일반적으로 Cas('CRISPR 연관') 도메인과 핵염기 변형 도메인(예를 들어, APOBEC1['아포지질단백질 B mRNA 편집 효소, 촉매 폴리펩티드 1[apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1]'], CDA['시티딘 탈아미노효소[cytidine deaminase]'] 및 AID['활성화 유도된 시티딘 탈아미노효소[activation-induced cytidine deaminase]']를 포함하는 시티딘 탈아미노효소와 같은 천연 또는 진화된 탈아미노효소)의 융합체이다. 일부 경우에서, 염기 편집기는 생성된 단일 뉴클레오티드 변화의 효율 및/또는 안정성을 증가시키기 위해 세포 DNA 복구 과정을 변경하는 단백질 또는 도메인을 포함할 수도 있다.

[0365] 일부 양태들에서, 현재 이용 가능한 염기 편집기들은 표적 C·G를 T·A로 전환하는 시티딘 염기 편집기(예를 들어, BE4) 및 표적 A·T를 G·C로 전환하는 아데닌 염기 편집기(예를 들어, ABE7.10)을 포함한다. 일부 양태에서, Cas9-표적화된 탈아미노화는 이중 가닥 DNA 파손을 도입하지 않고 염기 변화를 유도하도록 설계된 염기 편집기[BE] 시스템과 관련하여 처음으로 시연되었다. 탈활성화된 Cas9[deactivated Cas9, dCas9]에 융합된 추가 래트 탈아미노효소 APOBEC1(rAPOBEC1)을 사용하여 시티딘을 sgRNA의 PAM의 상류에서 티미딘으로 성공적으

로 전환했다. 일부 양태에서, 이러한 제1 BE 시스템은 dCas9를 탈아미노화된 시티딘의 반대편의 가닥을 틈내는 '틈내기효소' Cas9 D10A로 변경함으로써 최적화되었다. 이론에 매이지 않고, 긴 패치 염기 절제 복구[base excision repair, BER]의 개시가 예상되며, 여기에서 탈아미노 가닥은 우선적으로 복구물을 주형화하는데 사용되어 U:A 염기쌍을 생성하고, 이는 이후 DNA 복제 동안 T:A로 변환된다.

[0366] 일부 구현예에서, 염기 편집기는 촉매적으로 불활성인 제1 DNA 결합 단백질 도메인, 염기 편집 활성을 갖는 도메인, 및 틈내기효소 활성을 갖는 제2 DNA 결합 단백질 도메인을 함유하는 핵염기 편집기이며, 여기서 DNA 결합 단백질 도메인은 단일 융합 단백질이거나, (예를 들어, 별도의 발현 벡터에서) 별도로 발현된다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 염기 편집 활성을 갖는 도메인(예를 들어, 시티딘 탈아미노효소 또는 아데노신 탈아미노효소), 및 두 개의 핵산 프로그래밍 가능 DNA 결합 단백질 도메인[nucleic acid programmable DNA binding protein domain, napDNAbp]을 포함하는 융합 단백질이며, 첫 번째는 틈내기효소 활성을 포함하고 두 번째 napDNAbp는 촉매적으로 불활성이며, 여기서 적어도 두 개의 napDNAbp는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 틈내기효소 활성을 갖는 CRISPR-Cas(예를 들어, Cas9)의 DNA 도메인(nCas; nCas9), 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 활성을 갖는 CRISPR-Cas 단백질(예를 들어, Cas9)의 촉매적 불활성 도메인(dCas; 예를 들어, dCas9), 및 탈아미노효소 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 여기서 dCas는 링커에 의해 nCas에 결합되고, dCas는 탈아미노효소 도메인에 바로 인접한다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기이다. 예시적인 염기 편집기 및 염기 편집기 시스템은 특허 공개 번호 제US20220127622호, 제US20210079366호, 제US20200248169호, 제US20210093667호, 제US20210071163호, 제WO2020181202호, 제WO2021158921호, 제WO2019126709호, 제WO2020181178호, 제WO2020181195호, 제WO2020214842호, 제WO2020181193호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 포함된다.

[0367] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 표적-프라임화된 역전사[target-primed reverse transcription, TPRT] 또는 '프라임 편집'이다. 일부 구현예에서, 프라임 편집은 DSB 또는 공여자 DNA 주형을 필요로 하지 않고 인간 세포에서 표적화된 삽입, 결실, 12개의 가능한 모든 염기-대-염기 전환 및 이들의 조합을 매개한다.

[0368] 프라임 편집은 중합효소와 회합하여 작동하는 (즉, 융합 단백질의 형태로 또는 그렇지 않으면 napDNAbp와 함께 트랜스(trans)로 제공되는) 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질('napDNAbp')을 사용하여 새로운 유전 정보를 특정된 DNA 부위에 직접 기록하는 유전체 편집 방법이며, 여기서 프라임 편집 시스템은 표적 부위를 특정하고 안내 RNA상에(예를 들어, 5' 또는 3' 단부, 또는 안내 RNA의 내부 부분에) 조작된 연장부(DNA 또는 RNA)를 통한 대체 DNA 가닥의 형태로 원하는 편집의 합성을 주형화하는 프라임 편집[prime editing, PE] 안내 RNA['PEgRNA']로 프로그램된다. 원하는 편집(예를 들면, 단일 핵염기 치환)을 함유하는 대체 가닥은 (원하는 편집을 포함하는 것을 제외하고는) 편집될 표적 부위의 내인성 가닥과 동일한 서열을 공유한다. DNA 복구 및/또는 복제 기구를 통해, 표적 부위의 내인성 가닥은 원하는 편집을 함유하는 새로 합성된 대체 가닥으로 대체된다. 일부 경우에서, 프라임 편집기는 편집될 원하는 표적 부위를 검색 및 위치시키는 동시에, 상응하는 표적 부위 내인성 DNA 가닥 대신에 도입되는 원하는 편집을 함유하는 대체 가닥을 암호화하기 때문에, 프라임 편집은 '검색 및 대체' 유전체 편집 기술로 생각될 수 있다. 예를 들어, 프라임 편집은 이중 가닥 파손을 우회하기 위해 정밀 CRISPR/Cas 기반 유전체 편집을 수행하도록 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상동성 단백질은 안내 RNA로 특정 DNA 서열을 표적화하고, 표적 부위에서 단일 가닥 틈을 생성하고, 안내 RNA와 통합되는 조작된 역전사제 주형의 역전사용 프라이머로서 틈이 생성된 DNA를 사용하기 위한 Cas 단백질-역전사효소 융합체 또는 관련 시스템이거나 이를 암호화한다. 일부 구현예에서, 프라임 편집기 단백질은 유전체 DNA의 대향하는 가닥상에서 상보적 DNA 플랩(flap)의 합성을 주형화하는 두 개의 프라임 편집 안내 RNA[pegRNA]와 쌍을 이루어, 그 결과 PE-유도된 틈 부위 사이의 내인성 DNA 서열을 pegRNA-암호화된 서열로 대체시킨다.

[0369] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 역전사효소 또는 당업계에 알려진 임의의 DNA 중합효소인 프라이머 편집기와 회합된다. 따라서, 일 양태에서, 프라임 편집기는 DNA 서열을 표적 DNA에 있는 상보적인 프로토스페이서에 어닐링하는 스페이서 서열을 함유하는 특수화된 안내 RNA(즉, PEgRNA)와 회합시킴으로써, 그 DNA 서열을 표적화하도록 프로그램된 Cas9(또는 등가의 napDNAbp)를 포함할 수 있다. 그러한 방법은 문헌[Anzalone et al., (doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4)], 또는 PCT 공개 번호 제WO2020191248호, 제WO2021226558호, 또는 제WO2022067130호에 개시된 임의의 것을 포함하며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0370] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE]이다. 일부 양태에서, PASTE는 유전체 삽입이 역전사효소 및 세린 통합효소 모두에 융합된 CRISPR-Cas9 틈내기효소를 통해 유도되는 플랫폼이다. 문헌[Ioannidi et al., (doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)]에 설명된 바와 같이, PASTE는 이중 가닥 파손을 생성하지 않지만, ~36kb만큼 큰 서열의 통합을 허용한다. 일부 구현예에서, 세린 통

합효소는 당업계에 알려진 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 세린 통합효소는 PASTE가 다중 유전자 통합에 사용될 수 있도록 충분한 직교성을 가지며, 동시에 적어도 두 개의 유전체 좌위에서 적어도 두 개의 상이한 유전자를 통합한다. 일부 구현예에서, PASTE는 비분열 세포에서의 활성 및 더 적은 검출 가능한 표적 이탈 발생과 함께, 상동성 유도 복구 또는 비-상동성 단부 결합 기반 통합의 편집 효율에 필적하거나, 그보다 더 나은 편집 효율을 갖는다.

[0371] 일부 구현예에서, 본 개시의 CRISPR 시스템은 TnpB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 Ruv-C-유사 도메인을 포함할 수 있다. RuvC 도메인은 RuvC-I, RuvC-II 및 RuvC-III 하위도메인을 포함하는 분할된 RuvC 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, TnpB는 HTH 도메인, 다리 나선 도메인 및 아연 집게 도메인 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. TnpB 폴리펩티드는 HNH 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, TnpB 단백질은 N-말단에서 출발하는, HTH 도메인, RuvC-I 하위도메인, 다리 나선 도메인, RuvC-II 하위도메인, 아연 집게 도메인 및 RuvC-III 하위도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, RuvC-III 하위도메인은 TnpB 폴리펩티드의 C-말단을 형성한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 엡실론프로테오박테리아(*Epsilonproteobacteria*) 세균, 악티노플레인즈 로바투스(*Actinoplanes lobatus*) 균주 DSM 43150, 악티노마두라 셀룰로실리티카(*Actinomadura celluolosilytica*) 균주 DSM 45823, 악티노마두라 나미비엔시스(*Actinomadura namibiensis*) 균주 DSM 44197, 알리시클로바실러스 마크로스파란지두스(*Alicyclobacillus macrosprangiidus*) 균주 DSM 17980, 리핑잔겔라 할로필라(*Lipingzhangella halophila*) 균주 DSM 102030, 또는 크테도노박터 레세미퍼(*Ktedonobacter recemifer*)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 크테도노박터 라세미퍼(*Ktedonobacter racemifer*)로부터 유래하거나, 또는 K. 라세미퍼 TnpB 좌위의 5'ITR과 유사한 보존된 RNA 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, TnpB는 진핵 유전체에서 발견되는 TnpB 동족체인 판조르(Fanzor) 단백질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드를 포함하는 CRISPR 시스템은 표적 폴리뉴클레오티드의 표적 인접 모티프[target adjacent motif, TAM] 서열 5'에 결합한다. 일부 구현예에서, TAM은 전위인자-연관 모티프이다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TCA를 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TTCAN을 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TTGAT를 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 ATAAA를 포함한다.

[0372] 일부 구현예에서, 기재된 조작된 세포 집단은 수용자 대상에 대한 투여 시 면역 활성화를 감소된 수준으로 이끌어내거나 면역 활성화를 이끌어내지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에서 전신 TH1 활성화를 감소된 수준으로 유도하거나, 유도하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에서 말초 혈액 단핵 세포[peripheral blood mononuclear cells, PBMC]의 면역 활성화를 감소된 수준으로 유발하거나, PBMC의 면역 활성화를 유발하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에 투여된 세포에 대하여 공여자 특이적 IgG 항체를 감소된 수준으로 유발하거나, 공여자 특이적 IgG 항체를 유발하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에서 세포에 대하여 IgM 및 IgG 항체 생산을 감소된 수준으로 유발하거나, IgM 및 IgG 항체 생산을 유발하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 수용자 대상에 대한 투여 시 세포독성 T 세포 살해를 감소된 수준으로 이끌어낸다.

[0373] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 '자살 유전자'(또는 '자살 스위치')를 포함한다. 자살 유전자 또는 자살 스위치는 조작된 세포(예를 들어, 일차 조작된 세포 또는 조작된 만능 줄기 세포에서 분화된 세포)가 대상에게 투여된 후 및 이들이 바람직하지 않은 방식으로 성장 및 분열되어야 하는 경우와 같이 조작된 세포의 사멸을 야기할 수 있는 '안전 스위치'로서 기능하도록 통합될 수 있다. '자살 유전자' 절제 방식은 특정 화합물에 의해 활성화될 때만 세포 사멸을 초래하는 단백질을 암호화하는 유전자 전달 벡터 내에 자살 유전자를 포함한다. 자살 유전자는 무독성 화합물을 고독성 대사물로 선택적으로 전환하는 효소를 암호화할 수 있다. 그 결과는 효소를 발현하는 세포를 특이적으로 제거하는 것이다. 일부 구현예에서, 자살 유전자는 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(herpesvirus thymidine kinase, HSV-tk) 유전자이고, 촉발자는 간시클로비르(ganciclovir)이다. 다른 구현예에서, 자살 유전자는 대장균 시토신 탈아미노효소[Escherichia coli cytosine deaminase, EC-CD] 유전자이고, 촉발자는 5-플루오로시토신(5-fluorocytosine, 5-FC)이다(문헌[Barese et al, Mol. Therap. 20(10): 1932-1943 (2012), Xu et al, Cell Res. 8:73-8 (1998), 이들 둘 모두 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0374] 다른 구현예에서, 자살 유전자는 유도성 카스파제(Caspase) 단백질이다. 유도성 카스파제 단백질은 세포자멸사를 유도할 수 있는 카스파제 단백질의 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 유도성 카스파제 단백질은 iCasp9이다. 이는 인간 카스파제 9를 암호화하는 유전자에 일련의 아미노산을 통해 연결된, F36V 돌연변이를 갖는, 인간 FK506-결합 단백질, FKBP12의 서열을 포함한다. FKBP12-F36V는 소분자 이량체화제, API 903에 대해 고친화도로 결합한다. 따라서, iCasp9의 자살 기능은 이량체화의 화학적 유도자[chemical inducer of dimerization, CID]의 투여에 의해 촉발된다. 일부 구현예에서, CID는 소분자 약물 API 903이다. 이량체화는 세

포자멸사의 신속한 유도를 야기한다. (문헌[제WO2011146862호; Stasi et al., N. Engl. J. Med 365; 18 (2011); Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant.13:913-924(2007)] 참조, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨.)

[0375] 안전 스위치 또는 자살 유전자의 포함은, 수용자에 대한 세포독성이나 다른 부정적 결과 발생시 세포의 제어된 사멸을 가능하게 하며, 따라서 관용원성 인자를 이용하는 것을 포함하는 세포 기반 치료법의 안전성을 증가시킨다.

[0376] 일부 구현예에서, 예를 들어 세포가 바람직하지 않은 방식으로 성장 및 분열하거나 숙주에 대한 과도한 독성을 야기하는 경우, 안전 스위치를 함유하는 조작된 세포의 사멸 또는 세포자멸사를 유도하는 능력을 제공하기 위해, 본원에 제공된 조작된 세포 내로 안전 스위치가 혼입, 예컨대 도입될 수 있다. 따라서, 안전 스위치의 사용은 생체내에서 비정상 세포를 조건적으로 제거할 수 있게 하고, 임상에서 세포 치료법의 적용에 중요한 단계일 수 있다. 안전 스위치 및 이들의 사용은, 예를 들어, 문헌[Duzgune§, Origins of Suicide Gene Therapy (2019); Duzgune§ (eds), Suicide Gene Therapy. Methods in Molecular Biology, vol. 1895 (Humana Press, New York, NY)(HSVtk, 시토신 탈아미노효소, 니트로환원효소, 푸린 뉴클레오시드 가인산분해효소, 및 서양고추냉이 과산화효소의 경우); Zhou and Brenner, Exp Hematol 44(11):1013-1019 (2016)(i카스파제9의 경우); Wang et al., Blood 18(5):1255-1263 (2001)(huEGFR의 경우); 미국 특허 출원 공개 제20180002397호(HER1의 경우); 및 Philip et al., Blood124(8):1277-1287 (2014)(RQR8의 경우)]에 기재되어 있다.

[0377] 일부 구현예에서, 안전 스위치는, 예를 들어 약물 또는 전구약물[prodrug]의 존재하에 또는 선택적 외인성 화합물에 의한 활성화시에, 제어된 방식으로 세포사를 야기할 수 있다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 헤르페스바이러스 티미딘 키나제(herpes simplex virus thymidine kinase, HSVtk), 시토신 탈아미노효소[cytosine deaminase, CyD], 니트로환원효소[nitroreductase, NTR], 푸린 뉴클레오시드 가인산분해효소[purine nucleoside phosphorylase, PNP], 서양고추냉이 과산화효소, 유도성 카스파제 9[inducible caspase 9, iCasp9], 라파마이신-활성화된 카스파제 9[rapamycin-activated caspase 9, rapaCasp9], CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA 및 RQR8로 이루어진 군에서 선택된다.

[0378] 일부 구현예에서, 안전 스위치는, 예를 들어, 세포 내에서 비독성 전구약물을 독성 대사물질로 전환시킴으로써 약물 또는 전구약물에 의해 활성화될 때 세포 사멸 능력을 갖는 생성물을 암호화하는 이식유전자일 수 있다. 이러한 구현예에서, 세포 사멸은 조작된 세포를 약물 또는 전구약물과 접촉시킴으로써 활성화된다. 일부 경우에서, 안전 스위치는 HSVtk인데, 이는 간시클로버(ganciclovir, GCV)를 GCV-삼인산염으로 전환시킴으로써 DNA 합성을 방해하고 분화 세포를 사멸시킨다. 일부 경우에서, 안전 스위치는 시토신의 우라실로의 가수분해적 탈아미노화를 촉매함으로써, 항진균제 5-플루오로시토신(5-FC)을 세포독성 5-플루오로우라실(5-FU)로 전환시키는 CyD 또는 그의 변이체이다. 5-FU는 세포 효소에 의해 강력한 항대사산물(5-FdUMP, 5-FdUTP, 5-FUTP)로 추가로 전환된다. 이러한 화합물은 티미딜레이트 합성효소 및 RNA 및 DNA의 생산을 억제하여, 세포사를 초래한다. 일부 경우에서, 안전 스위치는 NTR 또는 이의 변이체인데, 이는 증식 세포 및 비증식 세포에서 독성인 반응성 N-히드록실아민 중간체로, 니트로기의 환원을 통해 전구약물 CB 1954상에 작용할 수 있다. 일부 경우에서, 안전 스위치는 PNP 또는 이의 변이체인데, 이는 전구약물 6-메틸푸린 데옥시리보시드 또는 플루다라빈을 증식 세포와 비증식 세포 둘 모두에 대한 독성 대사물질로 전환시킬 수 있다. 일부 경우에서, 안전 스위치는 서양고추냉이 과산화효소 또는 이의 변이체인데, 이는 인돌-3-아세트산[indole-3-acetic acid, IAA]을 강력한 세포독소로 촉매할 수 있어서, 이에 따라 세포 사멸을 달성한다.

[0379] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 iCasp9일 수 있다. 카스파제 9는 생리적 조건 하에서, 손상된 미토콘드리아에서의 시토크롬 C의 방출에 의해 활성화되는 고유한 미토콘드리아 세포자멸사 경로의 구성성분이다. 그 후, 활성화된 카스파제 9는 카스파제 3을 활성화시키고, 이는 말단 효과기 분자의 세포자멸사 야기를 촉발한다. iCasp9는 절두된 카스파제 9를 (이의 생리적 이량체화 도메인 또는 카스파제 활성화 도메인 없이) FK506 결합 단백질[FK506 binding protein, FKBP]인 FKBP12-F36V에 펩티드 링커를 통해 융합시킴으로써 생성될 수 있다. iCasp9는 이량체-독립적 기본 활성이 낮고, 이들의 표현형, 기능 또는 항원 특이성을 손상시키는 일 없이 숙주 세포(예를 들어, 인간 T 세포)에서 안정하게 발현될 수 있다. 그러나, 이량체화의 화학적 유도자[CID], 예컨대, 리미두시드(AP1903), AP20187 및 라파마이신의 존재하에, iCasp9는 유도성 이량체화를 거치고, 하류의 카스파제 분자를 활성화시켜, iCasp9를 발현시키는 세포의 세포자멸사를 초래할 수 있다. 예를 들어, PCT 출원 공개 제WO2011/146862호; 문헌[Stasi et al., N. Engl. J. Med. 365;18 (2011); Tey et al., Biol. Blood Marrow Transplant 13:913-924 (2007)] 참조. 예를 들어, 라파마이신 유도성 카스파제 9 변이체는 rapaCasp9로 명명된다. 문헌[Stavrou et al., Mol. Ther. 26(5):1266-1276 (2018)] 참조. 따라서, iCasp9는 숙주 세포의 제어된

사멸을 달성하기 위해 안전 스위치로서 사용될 수 있다.

[0380] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 해당 단백질에 특정 항체의 투여 후 세포 고갈을 가능하게 하는 막-발현 단백질일 수 있다. 이 범주의 안전 스위치는, 예를 들어, 이의 표면 발현을 위해 CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA 또는 RQR8을 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 포함할 수 있다. 이러한 단백질은 특정 항체에 의해 표적화될 수 있는 표면 에피토프를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CCR4 항체에 의해 인식될 수 있는 CCR4를 포함한다. 적합한 항-CCR4 항체의 비제한적 예는 모가물리주맙 및 이의 동등생물의약품[biosimilar]을 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CD16 또는 항-CD30 항체에 의해 인식될 수 있는 CD16 또는 CD30을 포함한다. 이러한 항-CD16 또는 항-CD30 항체의 비제한적 예는 AFM13 및 이의 동등생물의약품을 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CD19 항체에 의해 인식될 수 있는 CD19를 포함한다. 이러한 항-CD19 항체의 비제한적 예는 MOR208 및 이의 동등생물의약품을 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-CD20 항체에 의해 인식될 수 있는 CD20을 포함한다. 이러한 항-CD20 항체의 비제한적 예는 오비누투주맙, 우블리툭시맙, 오카라투주맙, 리툭시맙, 리툭시맙-RLIb, 및 이의 동등생물의약품을 포함한다. 따라서 안전 스위치를 발현시키는 세포는 CD20-양성이고, 기재된 바와 같이 항-CD20 항체의 투여를 통해 사멸에 대해 표적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-EGFR 항체에 의해 인식될 수 있는 EGFR을 포함한다. 이러한 항-EGFR 항체의 비제한적 예는 토무조툭시맙, RO5083945(GA201), 세툭시맙, 및 이의 동등생물의약품을 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 항-GD2 항체에 의해 인식될 수 있는 GD2를 포함한다. 이러한 항-GD2 항체의 비제한적 예는 Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 디니툭시맙, c.60C3-RLIc, 및 이의 동등생물의약품을 포함한다.

[0381] 일부 구현예에서, 안전 스위치는 조작된 세포의 표면상에서 하나 이상의 관용원성 인자를 인식하는 외인성으로 투여된 작용제일 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성으로 투여된 작용제는 관용원성 작용제에 대해 유도되거나 그에 특이적인 항체, 예를 들어 항-CD47 항체이다. 조작된 세포상에서 관용원성 인자를 인식 및 차단함으로써, 외인성으로 투여된 항체는 관용원성 인자의 면역 억제 기능을 차단하여 조작된 세포에 대한 면역계를 재감작시킬 수 있다. 예를 들어, CD47을 과발현하는 조작된 세포의 경우, 외인성으로 투여된 항-CD47 항체를 대상에게 투여하여, 조작된 세포상에서 CD47을 차폐하고, 조작된 세포에 대한 면역 반응을 촉발시킬 수 있다.

[0382] 일부 구현예에서, 본원은, (a) 세포에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계, 및 (b) 세포에서 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 및 Serpinb9로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 발현을 감소시키거나 증가시키는 단계는 안내 핵산분해효소(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 사용하여 세포에 대한 하나 이상의 변형을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 유도성 자살 스위치를 포함하는 발현 벡터를 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함한다.

[0383] 일부 구현예에서, 발현을 감소시키거나 증가시키는 단계는 유도 핵산분해효소(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 사용하여 세포에 대한 하나 이상의 변형을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 유도성 자살 스위치를 포함하는 발현 벡터를 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 세포에서 DAF/CD55의 발현을 증가시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0384] 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47이고, 세포는 CD47 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현한다.

[0385] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 CD47-SIRPα 차단제의 투여를 필요로 하는 대상에게 이를 투여하는 단계를 포함하되, 대상은 외인성 CD47 폴리펩티드를 발현시키도록 조작된 세포 집단을 미리 투여받았다. 일부 구현예에서, CD47-SIRPα 차단제는 CD47-결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-결합 도메인은 신호 조절 단백질 알파[signal regulatory protein alpha, SIRPα] 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-SIRPα 차단제는 면역글로불린 G[immunoglobulin G, IgG] Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG1 Fc 도메인은 인간 항체의 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-SIRPα 차단제는 TTI-621, TTI-622 및 ALX148로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에

서, CD47-SIRPα 차단제는 TTI-621, TTI-622 및 ALX148이다. 일부 구현예에서, CD47-SIRPα 차단제는 TTI-622이다. 일부 구현예에서, CD47-SIRPα 차단제는 ALX148이다. 일부 구현예에서, IgG Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD47-SIRPα 차단제는 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 MIAP410, B6H12 및 마그롤리맙으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 항체는 MIAP410이다. 일부 구현예에서, 항체는 B6H12이다. 일부 구현예에서, 항체는 마그롤리맙이다. 일부 구현예에서, 항체는 AO-176, IBI188(레타플리맙), STI-6643 및 ZL-1201로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 항체는 AO-176(Arch)이다. 일부 구현예에서, 항체는 IBI188(레타플리맙)(Innovent)이다. 일부 구현예에서, 항체는 STI-6643(Sorrento)이다. 일부 구현예에서, 항체는 ZL-1201(Zai)이다.

[0386] 일부 구현예에서, CD47에 결합하는 유용한 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맙((Hu5F9-G4))(Forty Seven, Inc.; Gilead Sciences, Inc.), 우라브렐리맙, CC-90002(Celgene; Bristol-Myers Squibb), IBI-188(Innovent Biologics), IBI-322(Innovent Biologics), TG-1801(TG Therapeutics; NI-1701로도 알려짐, Novimmune SA), ALX148(ALX Oncology), TJ011133(TJC4로도 알려짐, I-Mab Biopharma), FA3M3, ZL-1201(Zai Lab Co., Ltd), AK117(Akesbio Australia Pty, Ltd.), AO-176(Arch Oncology), SRF231(Surface Oncology), GenSci-059(GeneScience), C47B157(Janssen Research and Development), C47B161(Janssen Research and Development), C47B167(Janssen Research and Development), C47B222(Janssen Research and Development), C47B227(Janssen Research and Development), Vx-1004(Corvus Pharmaceuticals), HMBD004(Hummingbird Bioscience Pte Ltd), SHR-1603(Hengrui), AMMS4-G4(Beijing Institute of Biotechnology), RTX-CD47(University of Groningen) 및 IMC-002(Samsung Biologics; ImmuneOncia Therapeutics)를 포함하는 군에서 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맙, 우라브렐리맙, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, 및 IMC-002를 포함하는 군에서 선택된 항체와 CD47 결합에 대해 경쟁하지 않는다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 단편은 마그롤리맙, 우라브렐리맙, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47, 및 IMC-002에서 선택된 항체와 CD47 결합에 대해 경쟁한다. 일부 구현예에서, CD47에 결합하는 항체 또는 이의 단편은 CD47에 대한 단일사슬 Fv 단편[single-chain Fv fragment, scFv], CD47에 대한 Fab, CD47에 대한 VHH 나노체, CD47에 대한 DARPin, 및 이들의 변이체를 포함하는 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, CD47에 대한 scFv, CD47에 대한 Fab, 및 이들의 변이체는 마그롤리맙, 우라브렐리맙, CC-90002, IBI-188, IBI-322, TG-1801(NI-1701), ALX148, TJ011133, FA3M3, ZL1201, AK117, AO-176, SRF231, GenSci-059, C47B157, C47B161, C47B167, C47B222, C47B227, Vx-1004, HMBD004, SHR-1603, AMMS4-G4, RTX-CD47 및 IMC-002를 포함하는 군에서 선택된 임의의 항체의 항원 결합 도메인에 기초한다.

[0387] 일부 구현예에서, CD47 길항제는 CD47 차단을 제공한다. CD47 차단을 위한 방법 및 작용제는 제 PCT/US2021/054326호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0388] 일단 변경되면, 본원에 기재된 임의의 분자의 발현 존재는 웨스턴 블롯, ELISA 분석, FACS 분석 등과 같은 알려진 기술을 이용하여 분석될 수 있다.

[0389] 일부 구현예에서, 특정 세포 유형과 연관된 특징, 예를 들어 세포 마커 특성화, 바이오마커, 세포내 마커, 세포외 마커, 세포 시토킨 생성, 항체 생성이 또한 세포 속성에 대한 판독으로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 마커는 세포내 단백질 수준의 변화일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 마커는 세포내 RNA 수준의 변화일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 마커는 세포내 DNA 수준의 변화일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 마커는 세포외 펩티드(예를 들어, 하나 이상의 시토킨, 하나 이상의 호르몬, 하나 이상의 항체 등) 수준의 변화일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 마커는 세포외 신호전달 분자(예를 들어, 하나 이상의 신호전달 펩티드, 하나 이상의 대사물, 하나 이상의 리간드, 하나 이상의 유기 화합물, 하나 이상의 이온 등) 수준의 변화일 수 있다.

[0390] **A. 표적 유전자의 발현 감소**

[0391] 1. 표적 유전자

[0392] a. MHC 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자

[0393] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또

는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 서열(또한 상호 교환적으로 표적 유전자로 지칭됨)의 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형 또는 조작될 세포는 하나 이상의 변형이 이전에 도입되지 않은 비변형된 세포 또는 비조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변형시키는데 사용된다. 특정 구현예에서, 세포의 유전체는 HLA 발현을 촉진하는데 필요하거나 관여되는 성분, 예컨대 세포의 표면상에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 결실시키도록 변경되었다. 예를 들어, 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 분자의 성분인, 베타-2-마이크로글로불린[B2M]의 발현은 세포에서 감소되거나 제거되며, 이에 의해 조작된 세포에 의한 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 단백질 발현(예를 들어, 세포 표면 발현)을 감소시키거나 제거한다.

[0394] 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 제거)하는 조작된 세포에서의 임의의 기재된 변형은 섹션 II.B에 기재된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 관용원성 인자, 예컨대 CD47)을 과발현하기 위한 하나 이상의 변형과 함께 조합될 수 있다.

[0395] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현의 감소는 예를 들어, (1) 다형성 HLA 대립유전자(HLA-A, HLA-B, HLA-C) 및 MHC-II 유전자 직접 표적화, (2) 모든 MHC 클래스 I 분자의 표면 이동을 감소시킬, B2M의 제거, 및/또는 (3) LRC5, RFX-5, RFXANK, RFXAP, IRF1, NF-Y(NFY-A, NFY-B, NFY-C 포함), 및 HLA 발현에 중요한 CIITA와 같은 MHC 인핸세오솜의 하나 이상의 성분의 결실 중 하나 이상에 의해 달성될 수 있다.

[0396] 특정 구현예에서, HLA 발현은 간섭된다. 일부 구현예에서, HLA 발현은 개별 HLA를 표적화(예들어, HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C의 발현 녹아웃)하고, HLA 발현의 전사 조절인자를 표적화(예를 들어, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C 및/또는 IRF-1의 발현을 녹아웃)하고, MHC 클래스 I 분자의 표면 이동을 차단(예를 들어, B2M 및/또는 TAP1의 발현을 녹아웃), 및/또는 HLA-Razor를 사용하여 표적화(예를 들어, 제 WO2016183041호 참조)함으로써 간섭된다.

[0397] 인간 백혈구 항원[human leukocyte antigen, HLA] 복합체는 인간 MHC와 동의어이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조작된 세포는 인간 세포이다. 특정 양태에서, 본원에 개시된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자에 상응하는 하나 이상의 인간 백혈구 항원(예를 들어, HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C)를 발현하지 않으며, 이에 따라 저면역원성으로 특징지어진다. 예를 들어, 특정 양태에서, 본원에 개시된 조작된 세포는, 그로부터 제조된 임의의 줄기 세포 또는 분화된 줄기 세포를 비롯한 세포가 다음의 MHC 클래스 I 분자들, 즉 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 중 하나 이상을 발현하지 않거나 감소된 발현을 나타내도록 변형되었다. 일부 구현예에서, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 중 하나 이상은 세포 중 '녹아웃'될 수 있다. 녹아웃된 HLA-A 유전자, HLA-B 유전자, 및/또는 HLA-C 유전자를 갖는 세포는 각각의 녹아웃된 유전자의 감소된 또는 제거된 발현을 나타낼 수 있다.

[0398] 특정 구현예에서, 하나 이상의 MHC I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC II 분자의 발현은 유전체 DNA의 연속 구간을 표적화 및 결실시켜, 그에 의해 B2M, CIITA 및 NLRC5로 이루어진 군에서 선택된 표적 유전자의 발현을 감소 또는 제거함으로써 조절된다.

[0399] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자를 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형을 포함한다. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키기 위한 예시적인 방법이 하기 섹션에 기재된다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M 및 NLRC5 중 하나 또는 이들 둘 모두이다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M 유전자에 대한 유전자 편집 변형(예를 들어, 인델(indel))을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형(예를 들어, 인델)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M, 및 CIITA 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다.

[0400] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 변형은 B2M의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 B2M mRNA 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 미변형된 세포 또는 야생형 세포에 비교한 것이다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 약 5% 초과, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 중 어느 하나의 초과로 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 약 100%까지 감소되고, 예컨대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 이하 중 어느 하나까지로 감소된다. 일부 구현예에서, B2M

의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%중 어느 하나로 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, B2M mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, B2M mRNA 발현을 감소시키는 변형은 B2M 유전자 활성을 제거한다.

[0401] 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 B2M 단백질 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, B2M의 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일 유형의 세포의 미변형된 세포 또는 야생형 세포에 비교한 것이다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 약 5% 초과, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 중 어느 하나의 초과로 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 약 100%까지 감소, 예컨대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 이하 중 어느 하나까지로 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 중 어느 하나까지로 감소된다. 일부 구현예에서, B2M의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, B2M 단백질의 0% 발현). 일부 구현예에서, B2M 단백질 발현을 감소시키는 변형은 *B2M* 유전자 활성을 제거한다.

[0402] 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 *B2M* 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 *B2M* 유전자의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 발현을 감소시키는 변형은 *B2M* 유전자의 양쪽의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0403] 일부 구현예에서, 변형은 세포에서 하나 이상의 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴를 포함하는 변형은 *B2M* 유전자에서 인델을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 유전체 DNA의 해독틀이동 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 유전체 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 유전체 DNA의 연속 구간의 결실이다. 일부 구현예에서, *B2M* 유전자는 녹아웃된다.

[0404] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형을 포함한다. 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 예시적인 방법이 아래 섹션에 기재된다. 일부 구현예에서, 세포는 CIITA 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다.

[0405] 일부 구현예에서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 변형은 CIITA의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형은 CIITA mRNA 발현을 감소시킨다. 일부 구현예에서, CIITA의 감소된 mRNA 발현은 변형을 포함하지 않는 동일 유형의 세포의 미변형된 세포 또는 야생형 세포에 비교한 것이다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 변형은 약 5% 초과, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 중 어느 하나의 초과로 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 약 100%까지 감소되고, 예컨대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 이하 중 어느 하나까지로 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%중 어느 하나까지로 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현은 제거된다(예를 들어, CIITA의 mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, CIITA의 mRNA 발현을 감소시키는 변형은 CIITA의 유전자 활성을 제거한다.

[0406] 일부 구현예에서, 변형은 CIITA 단백질의 발현을 감소시키는 변형이다. 일부 구현예에서, CIITA 감소된 단백질 발현은 변형을 포함하지 않는 동일 유형의 세포의 미변형된 세포 또는 야생형 세포에 비교한 것이다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 약 5% 초과, 예컨대 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 중 어느 하나의 초과로 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 약 100%까지 감소되고, 예컨대 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 이하 중 어느 하나까지로 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%중 어느 하나로 감소된다. 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현은 제거된다(예를 들어, CIITA의 mRNA의 0% 발현). 일부 구현예에서, CIITA의 단백질 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA*의 유전자 활성을 제거한다.

[0407] 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA* 유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA* 유전자의 하나의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 발현을 감소시키는 변형은 *CIITA* 유전자의 둘 모두의 대립유전자의 불활성화 또는 파괴를 포함한다.

[0408] 일부 구현예에서, 변형은 세포에서 하나 이상의 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 세포에서 모든 B2M 코딩 서열의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 불활성화 또는 파괴를 포함하는 변형은 *B2M* 유전자에서 인델을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 유전체 DNA의 해독틀이동 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 변형은 *B2M* 유전자의 유전체 DNA의 결실이다. 일부 구현예에서, 변

형은 *B2M* 유전자의 유전체 DNA의 연속 구간의 결실이다. 일부 구현예에서, *CIITA* 유전자는 녹아웃된다.

[0409] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자를 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 변형을 포함한다. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 예시적인 방법이 아래 섹션에 기재된다. 일부 구현예에서, 세포는 B2M 및 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 CIITA 및 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다. 구현예에서, 세포는 B2M, CIITA 및 NLRC5 유전자에 대한 유전자 편집 변형을 포함한다.

[0410] 2. 발현을 감소시키는 방법

[0411] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 기재된 바와 같이 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 발현을 감소시키기 위해 변형(예를 들어, 유전자 변형)된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 또는 단백질의 발현을 감소(예를 들어, 제거)시키기 위해 하나 이상의 변형으로 조작되는 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 공급원 세포이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 섹션 II.C에 기재된 임의의 세포이다. 특정 구현예에서, 본원에 개시된 세포(예컨대, 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 분화된 세포, 예컨대 베타 섬 세포 또는 간세포, 또는 일차 세포)는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키는 하나 이상의 유전자 변형을 포함한다. 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예는 상기 기재된 것과 같은 임의의 것을 포함하며, 예컨대 CIITA, B2M, NLRC5, HLA-A, HLA-B, HLA-C, LRC5, RFX-ANK, RFX5, RFX-AP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF1, 및 TAP1 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키는 변형은 섹션 II.B에 기재된 것과 같은 원하는 이식유전자의 발현을 증가시키기 위한 하나 이상의 변형과 조합된다. 일부 구현예에서, 변형은 면역 특권화된 또는 저면역원성 세포인 조작된 세포를 생성한다. 하나 또는 다수의 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 결실)함으로써, 이러한 세포는 수용 대상에 이식될 때 감소된 면역 활성화를 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 예컨대, 투여 시 수용자 대상 또는 환자에서 저면역원성인 것으로 간주된다.

[0412] 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키는 임의의 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형은 표적 폴리뉴클레오티드의 발현의 영구적 제거 또는 감소를 초래한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 유전자는 표적 폴리뉴클레오티드에 DNA 파손을 도입함으로써, 예컨대 표적화 핵산내부분해효소를 사용함으로써 파괴된다. 다른 구현예에서, 변형은 표적 폴리뉴클레오티드의 발현에서 일시적인 감소를 초래한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 유전자 억제는 예컨대, RNA 간섭[RNAi], 짧은 간섭 RNA[siRNA], 짧은 헤어핀[shRNA] 및/또는 리보자임에 의한 것과 같은 안티센스(antisense) 기술을 사용하여 유전자의 발현을 선택적으로 저해하거나 억제하기 위해 표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 억제 핵산을 사용하여 달성된다.

[0413] 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 인간 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 포유동물 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 척추동물 유전체 서열이다.

[0414] 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 전형적으로 표적화된 방식으로 유전자에서 하나 이상의 이중 가닥 파손 및/또는 하나 이상의 단일 가닥 파손을 유도함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손은 핵산분해효소, 예를 들어, 유전자-표적화된 핵산분해효소와 같은 핵산내부분해효소에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, 표적화된 핵산분해효소는 유전자의 서열 또는 이의 일부에 표적화되도록 특이적으로 설계된, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN] 및 RNA-안내 핵산분해효소 예컨대 CRISPR-연관 핵산분해효소[Cas]로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 표적화된 핵산분해효소는 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 생성하고, 이는 이어서 오류 경향의 비-상동성 단부 결합[NHEJ], 또는 일부 경우에서, 주형이 사용되는 정밀 상동성 유도 복구[HDR]를 통해 복구 진행된다. 일부 구현예에서, 표적화된 핵산분해효소는 DNA 이중 가닥 파손[DSB]을 생성한다. 일부 구현예에서, 파손 생성 및 복구는 전형적으로 오류 경향이며, NHEJ 복구에서 DNA 염기의 삽입 및 결실(인델)을 초래한다. 일부 구현예에서, 변형은 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열의 결실, 삽입, 또는 돌연변이를 유도할 수 있다. 일부 경우에서, 변형은 해독틀이동 돌연변이를 초래할 수 있으며, 이는 조기 종결 코돈을 초래할 수 있다. 핵산분해효소-매개 유전자 편집의 예에서, 표적화된 편집은 유전자의 두 개의 모든 대립유전자상에서 발생하여 유전자의 이중대립유전자 파괴 또는 편집을 초래한다. 일부 구현예에서, 유전자의 모든 대립유전자는 유전자 편집에 의해 표적화된다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템을 사용하는 것과 같은 표적화된 핵산분해효소에 의한 변형은 유전자의 완전한 녹아웃을 초래한다.

[0415] 일부 구현예에서, 희귀-절단 핵산내부분해효소와 같은 핵산 분해효소는 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는

세포에 도입된다. 핵산분해효소는 그 핵산분해효소를 암호화하는 핵산의 형태로 세포 내에 도입될 수 있다. 핵산을 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질감염, 전기천공, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내로 도입되는 핵산은 DNA이다. 일부 구현예에서, 핵산분해효소는 단백질의 형태로 세포 내로 도입된다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우 리보핵산단백질[ribonucleoprotein, RNP]이 세포에 도입될 수 있다.

[0416] 일부 구현예에서, 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 일어난다. 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경시킬 수 있는 임의의 CRISPR/Cas 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 CRISPR-Cas 시스템은 다양한 Cas 단백질을 이용할 수 있다(문헌[Haft et al. PLoS Comput Biol. 2005; 1(6)e60]). CRISPR/Cas 시스템이 세포에서 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경시키는 것을 가능하게 하는 이러한 Cas 단백질의 분자 기구는 RNA 결합 단백질, 핵산내부분해효소 및 핵산외부분해효소, 나선효소 및 중합효소를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 CRISPR I형 시스템이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 CRISPR II형 시스템이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 CRISPR V형 시스템이다.

[0417] CRISPR/Cas 시스템은 세포에서 임의의 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 변경하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 CRISPR/Cas 시스템은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화할 수 있는 하나 이상, 예컨대 적어도 한 개 내지 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA[gRNA]) 및 Cas 단백질을 포함한다.

[0418] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 하나 이상의 아미노산 치환 또는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 일부 경우에서, 치환 및/또는 변형은 단백질 분해를 방지하거나 감소시킬 수 있고/있거나 세포에서 폴리펩티드의 반감기를 연장시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 펩티드 결합 대체(예를 들어, 우레아, 티오우레아, 카르바메이트, 설포닐 우레아, 등)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 자연 발생 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 대안의 아미노산(예를 들어, D-아미노산, 베타-아미노산, 호모시스테인, 포스포세린, 등)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 모이어티를 포함하기 위한 변형(예를 들어, 페길화, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 단부-캡핑 등)을 포함할 수 있다.

[0419] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 핵심 Cas 단백질을 포함한다. 예시적인 Cas 핵심 단백질은 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 및 Cas9를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 대장균 하위유형의 Cas 단백질(CASS2로도 알려짐)을 포함한다. 대장균 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, 및 Cas5e를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Ypest 하위유형의 Cas 단백질(CASS3으로도 알려짐)을 포함한다. Ypest 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csy1, Csy2, Csy3, 및 Csy4를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Nmeni 하위유형의 Cas 단백질(CASS4로도 알려짐)을 포함한다. Nmeni 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csn1 및 Csn2를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Dvulg 하위유형의 Cas 단백질(CASS1로도 알려짐)을 포함한다. Dvulg 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csd1, Csd2, 및 Cas5d를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Tneap 하위유형의 Cas 단백질(CASS7로도 알려짐)을 포함한다. Tneap 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Cst1, Cst2, Cas5t를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Hmari 하위유형의 Cas 단백질을 포함한다. Hmari 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csh1, Csh2, 및 Cas5h를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Apern 하위유형의 Cas 단백질(CASS5로도 알려짐)을 포함한다. Apern 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, 및 Cas5a를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Mtube 하위유형의 Cas 단백질(CASS6으로도 알려짐)을 포함한다. Mtube 하위유형의 예시적인 Cas 단백질은 Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, 및 Csm5를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 RAMP 모듈 Cas 단백질을 포함한다. 예시적인 RAMP 모듈 Cas 단백질은 Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 및 Cmr6을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Klompe et al., Nature 571, 219-225 (2019); Strecker et al., Science 365, 48-53 (2019)] 참조.

[0420] 일부 구현예에서, 본 개시의 CRISPR 시스템은 TnpB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 Ruv-C-유사 도메인을 포함할 수 있다. RuvC 도메인은 RuvC-I, RuvC-II 및 RuvC-III 하위도메인을 포함하는 분할된 RuvC 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, TnpB는 HTH 도메인, 다리 나선 도메인 및 아연 집게 도메인 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. TnpB 폴리펩티드는 HNH 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, TnpB 단백질은 N-말단에서 출발하는, HTH 도메인, RuvC-I 하위도메인, 다리 나선 도메인, RuvC-II 하위도메인, 아연 집게 도메인 및 RuvC-III 하위도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, RuvC-III 하위도메인은 TnpB 폴리펩티드의

C-말단을 형성한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 엡실론프로테오박테리아 세균, 악티노플레인즈 로바투스 균주 DSM 43150, 악티노마두라 셀룰로실리티카 균주 DSM 45823, 악티노마두라 나미비엔시스 균주 DSM 44197, 알리시클로바실러스 마크로스파란지두스 균주 DSM 17980, 리핑잔겔라 할로필라 균주 DSM 102030, 또는 크테도노박터 레세미퍼로부터 유래된다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 크테도노박터 라세미퍼로부터 유래하거나, 또는 K. 라세미퍼 TnpB 좌위의 5'ITR과 유사한 보존된 RNA 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, TnpB는 진핵 유전체에서 발견되는 TnpB 동족체인 판조르 단백질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드를 포함하는 CRISPR 시스템은 표적 폴리뉴클레오티드의 표적 인접 모티프[TAM] 서열 5'에 결합한다. 일부 구현예에서, TAM은 전위인자-연관 모티프이다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TCA를 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TTCAN을 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TTGAT를 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 ATAAA를 포함한다.

[0421] 일부 구현예에서, 하나 이상의 유전자를 녹아웃, 녹다운 또는 달리 변형시키기 위해 세포를 유전적으로 변형시키는 방법은, 예를 들어 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, 전위효소, 및 군집화된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부[CRISPR]/Cas 시스템을 포함하는 부위-유도 핵산분해효소를 사용하는 것을 포함한다.

[0422] ZFN은 세균 FokI 제한 효소의 핵산내부분해효소 도메인에 부착된 아연 집게-함유 전사 인자로부터 적합화된 부위-특이적 DNA 결합 도메인의 배열을 포함하는 융합 단백질이다. ZFN은 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상)의 DNA 결합 도메인 또는 아연 집게 도메인을 가질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160] 참조. 각각의 아연 집게 도메인은 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이며, 일반적으로 3 bp 내지 4 bp DNA 서열을 인식한다. 탠덤 도메인은, 따라서 세포의 유전체 내에서 독특한 확장된 뉴클레오티드 서열에 잠재적으로 결합할 수 있다.

[0423] 알려진 특이성의 다양한 아연 집게를 조합하여 약 6, 9, 12, 15 또는 18 bp 서열을 인식하는 다중-핑거 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-혼성계, 세균 1-혼성 및 2-혼성계, 및 포유동물 세포를 비롯한, 특정 서열을 인식하는 아연 집게(및 이의 조합)을 생성하기 위해, 다양한 선택 및 모듈식 조립 기술이 이용가능하다. 아연 집게는 예정된 핵산 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 예정된 핵산 서열에 결합하도록 아연 집게를 조작하는 기준은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sera et al., Biochemistry (2002) 41:7074-7081; Liu et al., Bioinformatics (2008) 24:1850-1857]을 참조.

[0424] FokI 핵산분해효소 도메인 또는 다른 이량체 핵산분해효소 도메인을 함유하는 ZFN은 이량체로서 기능한다. 따라서, 비-회문 DNA 부위를 표적화하기 위해서는 한 쌍의 ZFN이 필요하다. 두 개의 개별 ZFN은 적절한 간격으로 떨어져 있는 이들의 핵산분해효소를 사용하여 DNA의 반대 가닥에 결합해야 한다. 문헌[Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:10570-10575] 참조. 유전체에서 특이적 부위를 절단하기 위해, 한 쌍의 ZFN은 부위에 측면 근접하는 두 개의 서열을 인식하도록 설계되며, 하나는 정방향 가닥에 있고 다른 하나는 역방향 가닥에 있다. 부위의 양쪽에서 ZFN이 결합하면, 핵산분해효소 도메인이 해당 부위에서 DNA를 이량체화하고 절단하여 5' 오버행을 가진 DSB를 생성한다. 그런 다음 HDR을 사용하여 상동성 팔이 측면에 있는 원하는 돌연변이를 함유하는 복구 주형의 도움으로 특정 돌연변이를 도입할 수 있다. 복구 주형은 일반적으로 세포에 도입된 외인성 이중 가닥 DNA 벡터이다. 문헌[Miller et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:731-734] 참조.

[0425] TALEN은 표적 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 핵산분해효소의 또 다른 예이다. TALEN은 TALE 반복부로 명명된 DNA 결합 도메인에서 유래되며, 이는 일반적으로 확장된 DNA 서열에 결합하고 이를 인식하는 10 내지 30개의 반복부를 갖는 탠덤 어레이를 포함한다. 각각의 반복부는 33 내지 35개 아미노산 길이이며, 네 개의 DNA 염기쌍 중 하나에 특이성을 부여하는 두 개의 인접한 아미노산(반복부-가변성 두 개 잔기 또는 RVD로 명명됨)을 갖는다. 따라서, 표적 DNA 서열의 반복부 및 염기쌍 사이에는 일-대-일 대응이 있다.

[0426] TALEN은 하나 이상의 TALE DNA 결합 도메인(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 개 이상)을 핵산분해효소 도메인, 예를 들어, FokI 핵산내부분해효소 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생산된다. 문헌[Zhang, Nature Biotech. (2011) 29:149-153] 참조. TALEN에서의 사용을 위해 FokI에 대한 여러 돌연변이가 만들어졌으며, 예를 들어 이는 절단 특이성 또는 활성을 개선한다. 문헌[Cermak et al., Nucl. Acids Res. (2011) 39:e82; Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., Nature Biotech. (2011) 29:731-734; Wood et al., Science (2011) 333:307; Doyon et al., Nature Methods (2010) 8:74-79; Szczepek

et al., Nature Biotech (2007) 25:786-793; Guo et al., J. Mol. Biol. (2010) 200:96] 참조. FokI 도메인은 이량체로서 기능하여, 적절한 배향 및 간격을 갖는, 표적 유전체 내의 부위에 대한 독특한 DNA 결합 도메인을 갖는 두 개의 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 핵산분해효소 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수 및 두 개의 개별적인 TALEN 결합 부위들 사이의 염기의 수 모두는, 높은 수준의 활성을 달성하기 위해 중요한 파라미터인 것으로 여겨진다. 문헌[Miller et al., Nature Biotech. (2011) 29:143-148] 참조.

[0427] 조작된 TALE 반복부를 핵산분해효소 도메인과 조합함으로써, 부위-특이적 핵산분해효소가 임의의 원하는 DNA 서열에 특이적으로 생성될 수 있다. ZFN과 유사하게, TALEN은 세포 내로 도입되어 유전체 내의 원하는 표적 부위에서 DSB를 생성할 수 있고, 따라서 유사한 HDR-매개 경로에서 유전자 녹아웃 또는 돌연변이 녹인에 사용될 수 있다. 문헌[Boch, Nature Biotech. (2011) 29:135-136; Boch et al., Science (2009) 326:1509-1512; Moscou et al., Science (2009) 326:3501] 참조.

[0428] 메가핵산분해효소는 핵산내부분해효소 족의 효소이며, 이는 큰 DNA 서열(14 내지 40개 염기쌍)을 인식하고 절단하는 능력을 특징으로 한다. 메가핵산분해효소는 핵산분해효소 활성 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 그의 구조적 모티프를 기준으로 여러 족들로 분류된다. 가장 널리 퍼져 있고 가장 잘 알려져 있는 메가핵산분해효소는 LAGLIDADG 족의 단백질이며, 이 명칭은 보존된 아미노산 서열에 기인한다. 문헌[Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18): 3757- 3774] 참조. 한편, GIY-YIG 족 구성원은 잔기 길이가 70-100개이며, 네 개의 불변 잔기를 갖는 네 개 또는 다섯 개의 보존된 서열 모티프를 포함하고, 두 개의 불변 잔기가 활성에 필요한, GIY-YIG 모듈을 갖는다. 문헌[Van Roey et al., Nature Struct. Biol. (2002) 9:806-811] 참조. His-Cys족 메가핵산분해효소는 수백 개의 아미노산 잔기를 포함하는 영역에 걸쳐 고도로 보존된 일련의 히스티딘과 시스테인을 특징으로 한다. 문헌[Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774] 참조. NHN족의 구성원은 아스파라긴 잔기로 둘러싸인 두 쌍의 보존된 히스티딘을 함유하는 모티프로 정의된다. 문헌[Chevalier et al., Nucleic Acids Res. (2001) 29(18):3757-3774.] 참조.

[0429] 높은 특이성 요건으로 인해 특정 표적 DNA 서열에 대한 천연 메가핵산분해효소의 확인 가능성은 낮기 때문에, 돌연변이유발 및 고속 대량 선별 방법을 비롯한 다양한 방법을 사용하여 독특한 서열을 인식하는 메가핵산분해효소 변이체를 생성하였다. 예를 들어, 사전 결정된 핵산 서열에 결합하기 위해 변경된 DNA-결합 특이성을 갖는 메가핵산분해효소를 조작하기 위한 전략은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Chevalier et al., Mol. Cell. (2002) 10:895-905; Epinat et al., Nucleic Acids Res (2003) 31:2952-2962; Silva et al., J Mol. Biol. (2006) 361:744-754; Seligman et al., Nucleic Acids Res (2002) 30:3870-3879; Sussman et al., J Mol Biol (2004) 342:31-41; Doyon et al., J Am Chem Soc (2006) 128:2477-2484; Chen et al., Protein Eng Des Sel (2009) 22:249-256; Arnould et al., J Mol Biol. (2006) 355:443-458; Smith et al., Nucleic Acids Res. (2006) 363(2):283-294] 참조.

[0430] ZFN 및 TALEN과 마찬가지로, 메가핵산분해효소는 유전체 DNA에서 DSB를 생성할 수 있으며, 이는 예컨대, NHEJ를 통해 부적절하게 복구되는 경우 프레임-이동 돌연변이를 생성하여 세포에서 표적 유전자의 발현의 감소를 야기할 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 메가핵산분해효소와 함께 세포 내로 도입될 수 있다. 외래 DNA 및 염색체 서열에 따라, 이 과정은 표적 유전자를 변형시키는 데 사용될 수 있다. 문헌[Silva et al., Current Gene Therapy (2011) 11:11-27] 참조.

[0431] 전위효소는 전위인자의 단부에 결합하고, 잘라 붙이기 메커니즘 또는 복제 전위 메커니즘에 의해 유전체의 다른 부분으로 이의 이동을 촉진시키는 효소이다. CRISPER/Cas 시스템과 같은 다른 시스템에 전위효소를 연결함으로써, 유전체 DNA의 부위 특이적 삽입 또는 조작을 가능하게 하기 위해 새로운 유전자 편집 도구가 개발될 수 있다. 촉매적으로 불활성인 Cas 효과기 단백질 및 Tn7-유사 전위인자를 사용하는 전위인자를 이용하는 두 개의 알려진 DNA 통합 방법이 있다. 전위효소-의존적 DNA 통합은 유전체에서 DSB를 유발하지 않으며, 이는 더 안전하고 더 특이적인 DNA 통합을 보장할 수 있다.

[0432] CRISPR 시스템은 획득 면역의 형태를 제공하는 침입 파지 및 플라스미드에 대한 방어에 관련된 시스템으로서, 본래 원핵 생물(예를 들어, 박테리아 및 고세균)에서 발견되었다. 지금은 연구 및 임상 응용 분야에서 인기 있는 유전자 편집 도구로 채택되어 사용되고 있다.

[0433] CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 적어도 두 개의 구성성분, 즉 하나 이상의 안내 RNA[gRNA] 및 Cas 단백질을 포함한다. Cas 단백질은 DSB를 표적 부위에 도입하는 핵산분해효소이다. CRISPR-Cas 시스템은 두 개의 주요 부류에 속하는데, 클래스 1 시스템은 다중 Cas 단백질의 복합체를 사용하여 핵산을 분해하고, 클래스 2 시스템은 동일한 목적을 위해 단일의 거대한 Cas 단백질을 사용한다. 클래스 1은 I, III 및 IV형으로 나누어지고, 클래스 2

는 II, V 및 VI형으로 나누어진다. 유전자 편집 적용에 적합한 상이한 Cas 단백질은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, 및 Mad7을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 가장 널리 사용되는 Cas9는 II형 Cas 단백질이고, 본원에 예시로서 기재된다. 이들 Cas 단백질은 상이한 공급원 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas9는 S. 피오게네스 또는 S. 아우레우스로부터 유래될 수 있다.

[0434] 원래의 미생물 유전체에서, II형 CRISPR 시스템은 숙주 유전체 내의 배열로서 암호화된 CRISPR 반복부 서열 사이에서 침입 DNA의 서열을 통합한다. CRISPR 반복부 배열 유래의 전사체는 '프로토스페이서' 서열뿐만 아니라 CRISPR 반복부의 부분으로 알려진 침입 DNA로부터 전사된 가변 서열을 각각 보유하는 CRISPR RNA(crRNA)로 가공된다. 각각의 crRNA는 제2 전사활성 CRISPR RNA[tracrRNA]와 혼성화하고, 이들 두 RNA는 Cas9 핵산분해효소와 복합체를 형성한다. crRNA의 프로토스페이서-암호화된 부분은 Cas9 복합체가 상보적 표적 DNA 서열을 절단하도록 지시하며, 단, 이들은 [프로토스페이서 인접 모티프'[PAM]로서 알려진 짧은 서열에 인접한다.

[0435] 이의 발견 이후로, CRISPR 시스템은 박테리아에서부터 인간 세포를 포함하는 진핵 세포까지 걸쳐 매우 다양한 세포 및 생물에서 서열 특이적 DSB 및 표적화된 유전체 편집을 유도하는 데 적합하게 되었다. 유전자 편집 적용 분야에서의 이의 사용에서, 인공적으로 설계된, 합성 gRNA는 본래의 crRNA:tracrRNA 복합체를 대체하였다. 예를 들어, gRNA는 crRNA, 테트라루프 및 tracrRNA로 구성된 단일 안내 RNA[sgRNA]일 수 있다. crRNA는 보통 관심의 표적 DNA를 인식하도록 사용자-설계된 상보적 영역(스페이서로도 명명되며, 보통 약 20개의 뉴클레오티드 길이임)을 포함한다. tracrRNA 서열은 Cas 핵산분해효소 결합에 대한 뼈대 영역을 포함한다. crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 테트라루프에 의해 연결되고, 각각은 서로 혼성화를 위해 짧은 반복부 서열을 갖고, 따라서, 키메라 sgRNA를 생성한다. gRNA에 존재하는 스페이서 또는 상보적 영역 서열을 간단히 변화시킴으로써 Cas 핵산분해효소의 유전체 표적을 변화시킬 수 있다. 상보적 영역은 표준 RNA-DNA 상보적 염기쌍 형성 규칙을 통해 Cas 핵산분해효소를 표적 DNA로 향하게 할 것이다.

[0436] Cas 핵산분해효소가 기능하기 위해서는, 유전체 DNA에서 표적 서열의 바로 하류에 PAM이 있어야 한다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 유전체 서열을 탈안정화시켜, gRNA에 의한 서열의 조사를 가능하게 하고 일치 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 짝짓기를 일으키는 것으로 여겨진다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 다르다. 예를 들어, S. 피오게네스에서 유래한 가장 통상적으로 사용되는 Cas9 핵산분해효소는 5'-NGG-3' 또는 덜 효율적인 비로, 5'-NAG-3'의 PAM 서열을 인식하며, 여기서 'N'은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대안적인 PAM을 갖는 다른 Cas 핵산분해효소 변이체가 또한 특징화되었고, 아래의 표 1a에 요약된 유전체 편집에 성공적으로 사용되었다.

[0437] [표 5] 예시적인 Cas 핵산분해효소 변이체 및 이의 PAM 서열

CRISPR 핵산분해효소	공급원 생물	서열(5'→3')
SpCas9	*스트렙토코커스 피오게네스* (*Streptococcus pyogenes*)	NGG 또는 NAG
SaCas9	*스타필로코커스 아우레우스* (*Staphylococcus aureus*)	NGRRT 또는 NGRRN
NmeCas9	*네이세리아 메닌기티디스* (*Neisseria meningitidis*)	NNNNGATT
CjCas9	*캄필로박터 제주니* (*Campylobacter jejuni*)	NNNNRYAC
StCas9	*스트렙코코커스 써모필러스* (*Streptococcus thermophilus*)	NNAGAAW
TdCas9	*트레포네마 덴티콜라* (*Treponema denticola*)	NAAAAC
LbCas12a (Cpf1)	*라크노스피라세아 박테리움* (*Lachnospiraceae bacterium*)	TTTV
AsCas12a (Cpf1)	*아시다미노코커스 종* (*Acidaminococcus sp.*)	TTTV
AacCas12b	*알리사이클로바실러스 아시디필러스* (*Alicyclobacillus acidiphilus*)	TTN
BhCas12b v4	*바실러스 히사시*(*Bacillus hisashii*)	ATTN, TTTN, 또는 GTTN

[0438]

[0439] R = A 또는 G; Y = C 또는 T; W = A 또는 T; V = A 또는 C 또는 G; N = 임의의 염기

[0440] 일부 구현예에서, Cas 핵산분해효소는 이들의 활성, 특이성, 인식 및/또는 다른 특징을 변경시키기 위해 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, Cas 핵산분해효소는 표적 이탈 효과를 완화시키기 위해 이의 정확도를 변경시키는 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 evoSpCas9)를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, Cas 핵산분해효소는 이의 PAM 특이성을 변경시키는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[0441] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 Cas 단백질 중 어느 하나 또는 이들의 기능적 부분을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '기능적 부분'은 적어도 하나의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA[gRNA])와 복합체를 형성하고 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 절단하는 능력을 보유하는 펩티드의 부분을 지칭한다. 일부 구현예에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 나선효소 도메인, 및 핵산내부분해효소 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 작동 가능한 상태로 연결된 Cas9 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 부분은 DNA 결합 도메인, 적어도 하나의 RNA 결합 도메인, 나선효소 도메인, 및 핵산내부분해효소 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 작동 가능한 상태로 연결된 Cas12a(Cpf1으로도 알려짐) 단백질 기능적 도메인의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 기능적 도메인은 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas9a 단백질의 기능적 부분은 RuvC-유사 도메인의 기능적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질의 기능적 부분은 HNH 핵산분해효소 도메인의 기능적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질의 기능적 부분은 RuvC-유사 도메인의 기능적 부분을 포함한다.

[0442] 일부 구현예에서, 적합한 Cas 단백질은 Cas0, Cas12a(즉, Cpf1), Cas12b, Cas12i, CasX, 및 Mad7을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0443] 일부 구현예에서, 외인성 Cas 단백질은 폴리펩티드 형태로 세포에 도입될 수 있다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 세포-침투 폴리펩티드 또는 세포-침투 펩티드에 접합되거나 융합될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, '세포-침투 폴리펩티드' 및 '세포-침투 펩티드'는, 각각 세포 내로 분자의 흡수를 용이하게 하는, 폴리펩티드 또는 펩티드를 지칭한다. 세포-침투 폴리펩티드는 검출 가능한 표지를 함유할 수 있다.

[0444] 특정 구현예에서, Cas 단백질은 하전된 단백질(예를 들어, 양성, 음성 또는 전체적으로 중성인 전기적 하전을 지님)에 접합되거나 융합될 수 있다. 이러한 연결은 공유결합일 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 세포를 침투하는 Cas 단백질의 능력을 유의하게 증가시키기 위해 초양성으로 하전된 GFP에 융합될 수 있다(문헌 [Cronican et al. ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52)]. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 세포 내로의 진입을 용이하게 하기 위해 단백질 형질도입 도메인[PTD]에 융합될 수 있다. 예시적인 PTD는 Tat, 올리고아르기닌, 및

페네트라틴을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 세포-침투 펩티드에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 PTD에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 tat 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 세포-침투 펩티드에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 PTD에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 tat 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 올리고아르기닌 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 페네트라틴 도메인에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, Cas12a 단백질은 초양성으로 하전된 GFP에 융합된 Cas12a 폴리펩티드를 포함한다.

[0445] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 Cas 단백질을 암호화하는 핵산 형태로 표적 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 세포에 도입될 수 있다. 핵산을 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질감염, 전기천공, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 본원에 기재된 바와 같은 변형된 mRNA(예를 들어, 합성, 변형된 mRNA)를 포함한다.

[0446] 제공된 구현예에서, CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 두 개의 구성요소, 즉 하나 이상의 안내 RNA[gRNA] 및 Cas 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 하나 이상, 예컨대 한 개 내지 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA[gRNA])와 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 두 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 하나의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 변형된 핵산(예를 들어, 합성, 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.

[0447] 일부 구현예에서, gRNA는 Cas 결합을 위한 뼈대 서열 및 crRNA로 지정된 사용자-설계 스페이서 또는 상보적 부분으로 구성된 짧은 합성 RNA이다. cRNA는 변형될 유전체 표적을 정의하는 crRNA 표적화 서열(본원에서 또한 gRNA 표적화 서열로도 지칭됨, 일반적으로 약 20개 뉴클레오티드 길이) 및 crRNA 반복부의 영역(예를 들어, GUUUUAGAGCUA: 서열 번호 19)로 구성된다. gRNA에 존재하는 상보적 영역 서열(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 간단히 변화시킴으로써 Cas 단백질의 유전체 표적을 변화시킬 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 결합을 위한 뼈대 서열은, 이의 항-반복 서열을 통해 crRNA에 혼성화하는 tracrRNA 서열(예를 들어, UAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU: 서열 번호 20)으로 구성된다. crRNA:tracrRNA 사이의 복합체는 Cas 핵산분해효소(예를 들어, Cas9)를 유인하고 프로토스페이서-인접 모티프[PAM]의 상류를 절단한다. Cas 핵산분해효소가 기능하기 위해서는, 유전체 DNA에서 표적 서열의 바로 하류에 PAM이 있어야 한다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 유전체 서열을 탈안정화시켜, gRNA에 의한 서열의 조사를 가능하게 하고, 일치 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 짝짓기를 일으키는 것으로 여겨진다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 다르다. 예를 들어, S. 피오게네스에서 유래한 가장 통상적으로 사용되는 Cas9 핵산분해효소는 PAM 서열 NGG를 인식한다. 대안적인 PAM을 갖는 다른 Cas9 변이체 및 다른 핵산분해효소가 또한 특징화되었고, 유전체 편집에 성공적으로 사용되었다. 따라서, CRISPR/Cas 시스템은 표적 좌위에 대해 설계된 gRNA에 상보적인 특정 유전체 좌위에서 표적화된 DSB를 생성하는 데 사용될 수 있다. 상기 crRNA 및 tracrRNA는 키메라 단일 안내 RNA(sgRNA; 문헌[Hsu et al. 2013])인 gRNA의 생성을 위해 루프 서열(예를 들어, 테트라루프; GAAA)와 함께 연결될 수 있다. sgRNA는 DNA 기반 발현을 위해 또는 화학적 합성에 의해 생성될 수 있다.

[0448] 일부 구현예에서, gRNA의 상보적 부분 서열(예를 들어, gRNA 표적화 서열)은 관심 표적 부위에 따라 달라질 것이다. 일부 구현예에서, gRNA는 표 1a에 기재된 유전자의 서열에 특이적인 상보적 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 유전체 좌위는 기재된 바와 같은 임의의 좌위 또는 이의 영역의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내에 위치된다.

[0449] 본원에 개시된 방법은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화할 수 있는 임의의 리보핵산의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 포함한다.

[0450] 일부 구현예에서, Cas 단백질은 한 개 내지 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA[gRNA])와 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 두 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백

질은 한 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 변형된 핵산(예를 들어, 합성, 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.

[0451] 본원에 개시된 방법은 Cas 단백질을 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화할 수 있는 임의의 리보핵산의 용도를 고려한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 tracrRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 리보핵산 중 적어도 하나는 CRISPR RNA(crRNA)를 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 리보핵산은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 리보핵산은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산 둘 모두는 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 이에 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다. 본원에 제공된 리보핵산은 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이용된 특정 CRISPR/Cas 시스템, 및 표적 폴리뉴클레오티드의 서열에 따라, 다양한 상이한 표적 모티프를 혼성화하도록 선택될 수 있다. 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 또한 표적 폴리뉴클레오티드 서열 이외의 핵산 서열과의 혼성화를 최소화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 세포 내의 모든 다른 유전체 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 두 개의 불일치를 함유하는 표적 모티프에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 세포 내의 모든 다른 유전체 뉴클레오티드 서열과 비교할 때 적어도 한 개의 불일치를 함유하는 표적 모티프에 혼성화한다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산은 Cas 단백질에 의해 인식된 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화하도록 설계된다. 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산 각각은 표적 모티프 사이에 위치한 돌연변이체 대립유전자에 대해 측면 근접하는 Cas 단백질에 의해 인식된 데옥시리보핵산 모티프에 바로 인접한 표적 모티프에 혼성화하도록 설계된다.

[0452] 일부 구현예에서, 한 개 내지 두 개의 리보핵산 각각은 Cas 단백질을 세포 내 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 표적 모티프로 유도하고 혼성화하는 안내 RNA를 포함한다.

[0453] 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 동일 가닥상의 서열에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 마주보는 가닥상의 서열에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 마주보는 가닥상의 서열에 상보적이 아니고/아니거나 이에 혼성화되지 않는다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 중복 표적 모티프에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다. 일부 구현예에서, 한 개 또는 두 개의 리보핵산(예를 들어, 안내 RNA)는 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 상쇄 표적 모티프에 상보적이고/이거나 이에 혼성화된다.

[0454] 일부 구현예에서, Cas 단백질을 암호화하는 핵산 및 적어도 한 개 내지 두 개의 리보핵산을 암호화하는 핵산은 바이러스 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스 형질도입)을 통해 세포에 도입된다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 1-2개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 두 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 한 개의 리보핵산과 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, Cas 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 변형된 핵산(예를 들어, 합성, 변형된 mRNA)에 의해 암호화된다.

[0455] 본원에 기재된 유전자의 CRISPR/Cas-기반 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 서열은 표 6에 제공되어 있다. 서열은 2016년 5월 9일자로 출원된 제WO2016/183041호에서 찾을 수 있으며, 표, 부록 및 서열목록을 포함하는 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0456] [표 6] 유전자 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 서열

유전자 명칭	WO2016183041에서의 서열번호	WO2016183041
HLA-A	서열번호 2-1418	표 8, 부록 1
HLA-B	서열번호 1419-3277	표 9, 부록 2
HLA-C	서열번호 3278-5183	표 10, 부록 3
RFX-ANK	서열번호 95636-102318	표 11, 부록 4
NFY-A	서열번호 102319-121796	표 13, 부록 6
RFX5	서열번호 85645-90115	표 16, 부록 9
RFX-AP	서열번호 90116-95635	표 17, 부록 10
NFY-B	서열번호 121797-135112	표 20, 부록 13
NFY-C	서열번호 135113-176601	표 22, 부록 15
IRF1	서열번호 176602-182813	표 23, 부록 16
TAP1	서열번호 182814-188371	표 24, 부록 17
CIITA	서열번호 5184-36352	표 12, 부록 5
B2M	서열번호 81240-85644	표 15, 부록 8
NLRC5	서열번호 36353-81239	표 14, 부록 7

[0457]

[0458] 본원에 기재된 유전자의 CRISPR/Cas-기반 표적화에 유용한 추가의 예시적인 Cas9 안내 RNA 서열은 표 7에 제공되어 있다.

[0459] [표 7] 유전자 표적화에 유용한 예시적인 Cas9 안내 RNA 서열

유전자	가이드 서열	PAM	표적 부위	gRNA 절단 위치	서열 번호
ABO	UCUCUCCAUGUGCAGUAGGA	AGG	엑손 7	chr9:133,257,541	201
FUT1	CUGGAUGUCGGAGGAGUACG	CGG	엑손 4	chr19:48,750,822	202
RHD	GUCUCCGGAAACUCGAGGUG	AGG	엑손 2	chr1:25,284,622	203
F3 (CD142)	ACAGUGUAGACUUGAUUGAC	GGG	엑손 2	chr1:94,540,281	204
B2M	CGUGAGUAAACCUGAAUCUU	TGG	엑손 2	chr15:44,715,434	205
CIITA	GAUAUUGGCAUAAGCCUCCC	TGG	엑손 3	chr16:10,895,747	206
TRAC	AGAGUCUCUCAGCUGGUACA	CGG	엑손 1	chr14:22,5547,533	207

[0460]

[0461] 일부 구현예에서, 기재된 바와 같은 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 유전자 파괴 방법에서 사용하기 위한 새로운 좌위 및/또는 gRNA 표적화 서열을 확인하는 것은 당업자의 수준 내에 있는 것이다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우, (예를 들어, 표 1에 기재된 표적 유전자 내에서) 특정 좌위에 대해 존재하는 gRNA 표적화 서열을 알면, 보통 유전체에 걸쳐 100개의 염기쌍[bp]마다 발생하는 PAM 서열에 대한 좌위의 어느 하나의 측면상에서 측면 근접 영역을 스캐닝함으로써 이식유전자의 표적화된 삽입을 위한 추가적인 좌위를 확인하기 위해 '자벌레[inch worming]' 접근이 사용될 수 있다. PAM 서열은 사용되는 특정 Cas 핵산분해효소에 따라 달라질 것인데, 상이한 핵산분해효소는 대개 다른 상응 PAM 서열을 갖기 때문이다. 좌위의 어느 한 측면상에서의 측면 근접 영역은 약 500 내지 4000 bp 길이, 예를 들어, 약 500 bp, 약 1000 bp, 약 1500 bp, 약 2000 bp, 약 2500 bp, 약 3000 bp, 약 3500 bp 또는 약 4000 bp 길이일 수 있다. PAM 서열이 검색 범위 내에서 확인될 때, 유전자 파괴 방법에서의 사용을 위한 좌위의 서열에 따라 새로운 안내가 설계될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템이 예시로서 설명되지만, 기재된 바와 같은 임의의 유전자 편집 접근이 ZFN, TALEN, 메가핵산분해효소 및 전위효소를 이용하는 것을 비롯하여, 새로운 좌위를 확인하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0462] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN] 방법을 이용하여 생성된다. 'TALE-핵산분해효소'[TALEN]는 전형적으로 전사 활성자 유사 효과기[TALE]에서 유래한 핵산-결합 도메인 및 핵산 표적 서열을 절단하기 위한 하나의 핵산분해효소 촉매 도메인으로 이루어진 융합 단백질을 의도한다. 촉매 도메인은 핵산분해효소 도메인일 수 있고, 추가의 구현예에서 핵산내부분해효소 활성을 갖는 도메인으로, 예를 들어 I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-Ik이다. 구현예에서, TALE 도메인은 예를 들어 I-CreI 및 I-OnuI 또는 그의

기능적 변이체와 같은 메가핵산분해효소에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 핵산분해효소는 단량체성 TALE-핵산분해효소이다. 단량체성 TALE-핵산분해효소는 제WO2012138927호에 기재된 I-TevI의 촉매 도메인과 조작된 TAL 반복부의 융합체와 같이, 특이적 인식 및 절단을 위한 이량체화를 필요로 하지 않는 TALE-핵산분해효소이다. 전사 활성자 유사 효과기[TALE]는 박테리아 종인 잔토모나스 유래의 단백질이며, 복수의 반복된 서열을 포함하고, 각각의 반복부는 위치 12 및 13에 핵산 표적화된 서열의 각각의 뉴클레오티드 염기에 특이적인 두 개의 잔기(RVD)를 포함한다. 유사한 모듈형 염기당 염기 핵산 결합 특성을 갖는 결합 도메인[MBBBD]은 또한 상이한 박테리아 종에서 본 출원인에 의해 최근에 발견된 새로운 모듈형 단백질에서 유래될 수 있다. 새로운 모듈형 단백질은 TAL 반복부보다 더 많은 서열 가변성을 나타내는 이점을 갖는다. 구현예에서, 상이한 뉴클레오티드의 인식과 연관된 RVD는 C를 인식하기 위한 HD, T를 인식하기 위한 NG, A를 인식하기 위한 NI, G 또는 A를 인식하기 위한 NN, A, C, G 또는 T를 인식하기 위한 NS, T를 인식하기 위한 HG, T를 인식하기 위한 IG, G를 인식하기 위한 NK, C를 인식하기 위한 HA, C를 인식하기 위한 ND, C를 인식하기 위한 HI, G를 인식하기 위한 HN, G를 인식하기 위한 NA, G 또는 A를 인식하기 위한 SN 및 T를 인식하기 위한 YG, A를 인식하기 위한 TL, A 또는 G를 인식하기 위한 VT 및 A를 인식하기 위한 SW이다. 일부 구현예에서, 결정적 아미노산 12 및 13은 뉴클레오티드 A, T, C 및 G에 대한 특이성을 조절하기 위해, 특히 이러한 특이성을 향상시키기 위해 다른 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다. TALEN 키트는 시판된다.

[0463] 일부 구현예에서, 세포는 아연 집게 핵산분해효소[ZFN]를 사용하여 조작된다. '아연 집게 결합 단백질'은 아연 이온의 배위를 통한 단백질 구조의 안정화의 결과로서, 예를 들어 서열-특이적 방식으로 DNA, RNA 및/또는 단백질에 결합하는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 용어 아연 집게 결합 단백질은 종종 아연 집게 단백질 또는 ZFP로 약기된다. 개별 DNA 결합 도메인은 전형적으로 '핑거'로 지칭된다. ZFP는 적어도 한 개의 핑거, 전형적으로 두 개의 핑거, 세 개의 핑거, 또는 여섯 개의 핑거를 갖는다. 각각의 핑거는 2-4개의 DNA 염기쌍, 전형적으로 3-4개의 DNA 염기쌍에 결합한다. ZFP는 표적 부위 또는 표적 절편으로 명명되는 핵산 서열에 결합한다. 각각의 핑거는 전형적으로 대략 30개의 아미노산, 아연-킬레이팅, DNA-결합 하위도메인을 포함한다. 연구에 따르면 이 부류의 단일 아연 집게는 단일 베타 회전의 두 개의 시스테인 잔기와 함께 아연과 배위되는 두 개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하는 알파 나선으로 이루어져있음을 입증하였다(예를 들어, 문헌[Berg & Shi, Science 271:1081-1085 (1996)] 참조).

[0464] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 귀소 핵산내부분해효소를 사용하여 제조된다. 이러한 귀소 핵산내부분해효소는 당업계에 공지이다(문헌[Stoddard 2005]). 귀소 핵산내부분해효소는 DNA 표적 서열을 인식하고, 단일 가닥 또는 이중 가닥 파손을 생성한다. 귀소 핵산내부분해효소는 12 내지 45개의 염기쌍(bp) 길이, 일반적으로 14 내지 40 bp 길이 범위의 DNA 표적 부위를 매우 특이적으로 인식한다. 귀소 핵산내부분해효소는 예를 들어 LAGLIDADG 핵산내부분해효소, HNH 핵산내부분해효소, 또는 GIY-YIG 핵산내부분해효소에 상응할 수 있다. 일부 구현예에서, 귀소 핵산내부분해효소는 I-CreI 변이체일 수 있다.

[0465] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 메가핵산분해효소를 사용하여 제조된다. 메가핵산분해효소는 정의에 의하면 거대 서열을 인식하는 서열-특이적 핵산내부분해효소이다(문헌[Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, Nucleic Acids Res., 2001, 29, 3757-3774]). 이들은 살아있는 세포에서 독특한 부위를 절단할 수 있어, 절단 부위 부근에서 유전자 표적화를 1000배 이상 향상시킨다(문헌[Nucleic Acids Res., 1993, 21, 5034-5040; Rouet et al., Mol. Cell. Biol., 1994, 14, 8096-8106; Choulika et al., Mol. Cell. Biol., 1995, 15, 1968-1973; Puchta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 5055-5060; Sargent et al., Mol. Cell. Biol., 1997, 17, 267-77; Donoho et al., Mol. Cell. Biol, 1998, 18, 4070-4078; Elliott et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 93-101; Cohen-Tannoudji et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 1444-1448]).

[0466] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 폴리펩티드의 발현을 녹다운(예를 들어, 감소, 제거 또는 억제)하기 위해 RNA 사일런싱 또는 RNA 간섭[RNAi]을 사용하여 생성된다. 유용한 RNAi 방법은 짧은 합성 RNAi 분자, 짧은 간섭 RNA[siRNA], PIWI-상호작용 NRA[piRNA], 짧은 헤어핀 RNA[shRNA], 마이크로RNA(miRNA), 및 당업자가 인식하는 기타 일시적인 녹다운 방법을 이용하는 것들을 포함한다. 서열 특이적 shRNA, siRNA, miRNA 등을 포함하는 RNAi용 시약은 시판된다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드, 예컨대 상기 기재된 것 중 임의의 것, 예를 들어 CIITA, B2M 또는 NLRC5는 표적 폴리뉴클레오티드의 표적 모티프에 상보적인 억제 핵산, 예컨대 siRNA를 세포 내로 도입함으로써 RNA 간섭에 의해 세포 내에서 녹다운될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드, 예컨대 임의의 상기 기재된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, CIITA, B2M 또는 NLRC5는 shRNA-발현 바이러스를 세포 내로 형질도입함으로써 세포 내에서 녹다운될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA 간섭은 CIITA, B2M, 및 NLRC5로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 발현을 감소시키거나 억제하기 위해 사용된다.

[0467] 3. 예시적인 표적 폴리뉴클레오티드 및 발현을 감소시키기 위한 방법

[0468] a. MHC 클래스 I 분자

[0469] 특정 구현예에서, 변형은 보조 사슬 B2M을 표적화함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자를 암호화하는 하나 이상의 MHC 클래스 I 유전자)의 발현을 감소시키거나 제거하며, 예컨대 녹아웃시킨다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 일어난다. B2M의 발현을 감소시키거나 제거, 예컨대 녹아웃시킴으로써, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 표면 이동[surface trafficking]이 차단되고, 이러한 세포는 수용자 대상 내로 생착될 때 면역 내성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 투여 시 수용자 대상 또는 환자에서 저면역원성인 것으로 여겨진다.

[0470] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 변이체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 동족체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 B2M의 동원체이다.

[0471] 일부 구현예에서, B2M의 감소 또는 제거된 발현은 다음 MHC I 분자 - HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다.

[0472] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 B2M 유전자를 표적화하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 표적화하는 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 핵산분해효소 시스템을 이용하는 것에 의한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열(예를 들어, gRNA 표적화 서열)은 그 개시 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2016183041호의 부록 2 또는 표 15의 서열 번호 81240-85644로 이루어진 군에서 선택된다.

[0473] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드(예를 들어, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 다른 관용원성 인자)를 암호화하는 외인성 핵산 또는 이식유전자는 B2M 유전자에 삽입된다. B2M 좌위에서의 표적화된 삽입을 위한 예시적인 이식유전자는 섹션 II.B에 기재된 임의의 것을 포함한다.

[0474] B2M 유전자가 불활성화되었는지 여부를 시험하기 위한 분석은 알려져 있고 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 생성된 B2M 유전자의 유전자 변형은 PCR에 의해, HLA-I 발현의 감소는 유세포분석, 예컨대 FACS 분석에 의해 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, B2M 단백질 발현은 B2M 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 불활성화 유전자 변형의 존재를 확인한다.

[0475] 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자(세포가 인간 세포에서 유래한 경우 HLA I)의 발현 또는 기능의 감소는 당업계에 알려진 기술, 예를 들어 HLA 복합체에 결합하는 표지된 항체를 사용하는 FACS 기술, 예를 들어, 인간 주요 조직적합성 HLA 클래스 I 항원의 알파 사슬에 결합하는 시판되는 HLA-A, B, C 항체를 사용하여 측정될 수 있다. 추가로, HLA I 복합체가 세포 표면에서 발현되지 않는다는 것을 확인하기 위해 세포를 시험할 수 있다. 이는 상기 논의된 바와 같은 하나 이상의 HLA 세포 표면 구성요소에 대한 항체를 사용하여 FASC 분석에 의해 분석될 수 있다. HLA I(또는 MHC 클래스 I)의 감소에 추가하여, 본원에 제공된 조작된 세포는 대식세포 식세포 작용 및 NK 세포 사멸에 대해 감소된 감수성을 가질 수 있다. 조작된 세포의 저면역원성 표현형을 분석하기 위한 방법이 하기에 추가로 기재된다.

[0476] b. MHC 클래스 I 분자

[0477] 특정 양태에서, 변형은 클래스 II 전사활성자[CIITA]를 표적화함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키거나 제거하며, 예컨대 녹아웃시킨다. 일부 구현예에서, 변형은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 일어난다. CIITA는 단백질의 LR 또는 뉴클레오티드 결합 도메인[NBD] 루신-풍부 반복부[LRR]족의 구성원이며, MHC 인핸세오솜과 회합함으로써 하나 이상의 MHC 클래스 II 유전자의 전사를 조절한다. CIITA의 발현을 감소시키거나 제거, 예컨대 녹아웃시킴으로써, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현이 감소되고, 이에 의해 표면 발현도 감소된다. 일부 경우에서, 이러한 세포는 수용 대상에 생착될 때 면역 내성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 예컨대, 투여 시 수용자 대상 또는 환자에서 저면역원성인 것으로 여겨진다.

[0478] 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 변이체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 동족체이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 CIITA의 동원체이다.

[0479] 일부 구현예에서, CIITA의 감소 또는 제거된 발현은 다음의 MHC 클래스 II 분자, 즉 HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA,

HLA-DOB, HLA-DQ, 및 HLA-DR 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거한다.

[0480] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CIITA 유전자를 표적화하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 표적화하는 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 핵산분해효소 시스템을 이용하는 것에 의한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열(예를 들어, gRNA 표적화 서열)은 그 개시내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2016183041호의 부록 1 또는 표 12의 서열 번호 5184-36352로 이루어진 군에서 선택된다.

[0481] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드를 암호화하는 외생의 핵산 또는 이식유전자를 암호화하는 외인성 핵산(예를 들어, 키메라 항원 수용체, CD47, 또는 본원에 개시된 다른 관용원성 인자)는 CIITA 유전자에 삽입된다. B2M 좌위에서의 표적화된 삽입을 위한 예시적인 이식유전자는 섹션 II.B에 기재된 임의의 것을 포함한다.

[0482] CIITA 유전자가 불활성화되었는지 여부를 시험하기 위한 분석은 알려져 있고 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 생성된 CIITA 유전자의 유전자 변형은 PCR에 의해, HLA-II 발현의 감소는 유세포분석, 예컨대 FACS 분석에 의해 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, CIITA 단백질 발현은 CIITA 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄반응[RT-PCR]을 사용하여 불활성화 유전자 변형의 존재를 확인한다.

[0483] 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(세포가 인간 세포에서 유래한 경우 HLA II)의 발현 또는 기능의 감소는 당업계에 알려진 기술, 예를 들어 단백질에 대한 항체를 사용하는 웨스턴 블로팅, FACS 기술, RT-PCR 기술 등을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 HLA II 복합체가 세포 표면상에 발현되지 않음을 확인하기 위해 시험될 수 있다. 표면 발현을 평가하기 위한 방법은 당업계에 알려진 방법을 포함하고(예를 들어, 제WO2018132783호의 도 21 참조), 일반적으로 인간 HLA 클래스 II HLA-DR, DP 및 대부분의 DQ 항원에 결합하는 상업적 항체에 기반하여 웨스턴 블롯 또는 FACS 분석 중 하나를 이용하여 수행된다. HLA II(또는 MHC II)의 감소에 추가로, 본원에 제공된 조작된 세포는 대식세포 식세포 작용 및 NK 세포 사멸에 대해 감소된 감수성을 가질 수 있다. 조작된 세포의 저면역원성 표현형을 분석하기 위한 방법이 하기에 추가로 기재된다.

[0484] **B. 폴리뉴클레오티드의 과발현**

[0485] 일부 구현예에서, 본원에서 제공되는 조작된 세포는, 예컨대 세포 내로 하나 이상의 변형을 도입하여 세포에서 원하는 폴리뉴클레오티드를 과발현시키는 것에 의해, 유전적으로 변형되거나 조작된다. 일부 구현예에서, 변형되거나 조작될 세포는 이전에 하나 이상의 변형이 도입되지 않은 미변형된 세포 또는 조작되지 않은 세포이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 조작된 세포는 외인성 단백질을 암호화하는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드(또한, 용어 '이식유전자'와 상호 교환 가능하게 사용됨)를 포함하도록 유전자 변형된다. 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서, 세포는 수용체에서 면역 인식 및 내성에 영향을 미치는 관용원성(예를 들어, 면역) 인자인 특정 유전자의 발현을 증가시키도록 변형된다. 일부 구현예에서, T 세포 또는 NK 세포와 같은, 제공된 조작된 세포는 키메라 항원 수용체[CAR]을 또한 발현시킨다. 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 외인성 폴리뉴클레오티드는 상기 Section I.A에 기재된 표적 폴리뉴클레오티드, 예컨대 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 유전자 변형과 함께 조작된 세포에서 발현(예를 들어, 과발현)될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 수용자 대상에 투여 시 면역 반응을 촉발하거나 활성화하지 않는다.

[0486] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 과발현된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 과발현된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 과발현된 폴리뉴클레오티드는 외인성 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 외인성 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 과발현된 폴리뉴클레오티드는 세포에서 에피솜적으로 발현되는 외인성 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 과발현된 폴리뉴클레오티드는 조작된 세포의 하나 이상의 유전체 좌위에 삽입되거나 통합되는 외인성 폴리뉴클레오티드이다.

[0487] 일부 구현예에서, DNA-표적화 도메인 및 전사 활성자를 함유하는 융합 단백질을 사용하여 폴리뉴클레오티드의

발현이 증가, 즉 폴리뉴클레오티드가 과발현된다. 전사활성자 도메인을 사용하여 발현을 증가시키는 표적화된 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0488] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유하고, 여기서 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 렌티바이러스 벡터를 사용한 형질도입과 같은 비-표적화된 삽입 방법에 의해 세포의 유전체 좌위에 삽입되거나 통합된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 표적화된 삽입 방법, 예컨대 상동성 유도 복구[HDR]를 사용하여 세포의 유전체 내로 삽입되거나 통합된다. 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 HDR에 의해 조작된 세포의 유전체 좌위 내로 외인성 폴리뉴클레오티드를 삽입하기 위한 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 유전체 좌위, 예컨대 본원에 기재된 임의의 유전체 좌위(예를 들어, 표 2) 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 동일한 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 상이한 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 동일한 유전체 좌위, 예컨대 본원에 기재된 임의의 유전체 좌위(예를 들어, 표 2) 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 상이한 유전체 좌위, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 둘 이상의 유전체 좌위(예를 들어, 표 2) 내로 삽입된다.

[0489] 일부 구현예에서, 임의의 유전자 편집 기술은 기재된 바와 같이 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 또는 표적 단백질의 발현을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 핵산분해효소, 통합효소, 전위효소, 재조합효소를 수반하는 시스템을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 (예를 들어, 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 프로모터 또는 인핸서를 변형 또는 활성화시킴으로써) 내인성 유전자 활성을 증가시키는 변형을 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자-편집 기술은 (예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 표적 단백질을 암호화하는 작제물, 예컨대 조작된 세포에서의 증가된 발현을 위해 본원에 기재된 임의의 관용원성 인자 또는 임의의 다른 분자를 암호화하는 작제물을 도입하기 위해) 유전체 영역 내로의 DNA의 녹인 또는 통합에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 단일 가닥 파손[SSB]을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 비-상동성 단부 결합[NHEJ] 또는 상동성 유도 복구[HDR]와 관련된 것을 포함하는 이중 가닥 파손[DSB]을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 DNA-기반 편집 또는 프라임-편집을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE]를 포함할 수 있다. 예시적인 폴리뉴클레오티드 또는 과발현, 및 이를 과발현하는 방법이 다음 하위섹션에 기재된다.

[0490] 1. 관용원성 인자

[0491] 일부 구현예에서, 관용원성 인자의 발현은 세포에서 과발현 또는 증가된다. 관용원성 인자의 발현과 관련하여 변형된 세포에 관한 구현예는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 세포 유형, 또한 본원에 기재된 바와 같은 HIP 세포, CAR 세포, 안전 스위치 및 다른 변형된/유전자 편집된 세포에 용이하게 적용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0492] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현, 즉 과발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 면역계(예를 들어, 선천성 또는 적응성 면역계)에 의해 조작된 세포에 대한 내성을 촉진하거나 유도하는 것을 촉진하거나 기여하는 임의의 인자이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 또는 Serpinb9이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200 또는 Mfge8, 또는 그의 임의의 조합이다. 일부 구현예에서, 세포는 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 적어도 하나의 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나는 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다. 본원은, 수용 대상에게 투여 시 면역 반응을 촉발하거나 활성화시키지 않는 세포를 제공한다. 상기 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서, 세포는 수용자에서 면역 인식 및 내성에 영향을 미치는 유전자 및 관용원성(예를 들어 면역) 인자의 발현을 증가시키도록 변형된다.

[0493] 일부 구현예에서, 본 개시는 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절 폴리펩티드). 예컨대 CD47을 발현하도록 변형된 세포 또는 이의 집단을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시는 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절 폴리펩티드), 예컨대 CD47을 발현하도록 세포 유전체를 변경하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 외인성 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절성 폴리펩티드), 예컨대 외인성 CD47을 발현한다. 일부 예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드의 과발현 또는 발현 증가는 인간 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하

는 발현 벡터를 세포 내로 도입(예를 들어, 세포를 형질도입)함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터) 또는 비-바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유하도록 조작되고, 여기서 외인성 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나는 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 또는 Serpinb9이다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47, PD-L1, HLA-E 또는 HLA-G, CCL21, FasL, Serpinb9, CD200 또는 Mfge8 또는 이들의 임의의 조합에서 선택된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 중 적어도 하나는 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0494] 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD47, 예컨대 인간 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CD47은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은, 참조 또는 미변형된 세포와 같이 변형 조작되지 않은 동일한 세포 유형의 유사한 세포, 예를 들어 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드로 조작되지 않은 세포에 비교하여, 조작된 세포에서 과발현되거나 증가된다. CD47은 백혈구 표면 항원이고, 세포 접착 및 인테그린의 조절에서 일정 역할을 한다. 이는 세포의 표면에서 정상적으로 발현되며, 순환하는 대식세포에 세포를 먹지 말라는 신호를 보낸다. 인간 CD47에 대한 유용한 유전체, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어 NP_001768.1, NP_942088.1, NM_001777.3 및 NM_198793.2에 제공된다.

[0495] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현, 즉 과발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 적어도 하나의 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, Serpinb9 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 적어도 하나의 과발현된 (예를 들어, 외인성) 폴리뉴클레오티드는 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0496] 일부 구현예에서, 본 개시는 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절성 폴리펩티드), 예컨대 CD47을 발현하도록 변형된 세포 또는 이의 집단을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시는 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절성 폴리펩티드), 예컨대 CD47을 발현하도록 세포 유전체를 변경하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 외인성 관용원성 인자(예를 들어, 면역조절성 폴리펩티드), 예컨대 외인성 CD47을 발현한다. 일부 경우에서, 세포는 인간 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 발현한다.

[0497] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD47, 예컨대 인간 CD47을 암호화하는 과발현된 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD47, 예컨대 인간 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CD47은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CD47의 발현은, 참조 또는 미변형된 세포가 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않는다는 것을 제외하고는 유사한 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여 조작된 세포에서 증가된다. CD47은 백혈구 표면 항원이고, 세포 접착 및 인테그린의 조절에서 일정 역할을 한다. 이는 정상적으로 세포의 표면에서 발현되며, 순환하는 대식세포에 세포를 먹지 말라는 신호를 보낸다. 인간 CD47에 대해 유용한 유전체성 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, NP_001768.1, NP_942088.1, NM_001777.3 및 NM_198793.2에 제공된다.

[0498] 일부 구현예에서, 본원에 약술된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 약술된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NM_001777.3 및 NM_198793.2에 기재된 서열과 적어도 85%(예를 들어, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 CD47에 대한 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NM_001777.3 및 NM_198793.2에 기재된 CD47에 대한 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0499] 일부 구현예에서, 본원에 약술된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 기재된 바와 같은

아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 약술된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NM_001777.3 및 NM_198793.2에 기재된 서열과 적어도 85%(예를 들어, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 CD47에 대한 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NM_001777.3 및 NM_198793.2에 기재된 바와 같은 CD47에 대한 외인성 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0500] 일부 구현예에서, 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 외인성 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 약술된 세포는 NCBI Ref. 서열 번호 NP_001768.1 및 NP_942088.1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 외인성 CD47 폴리펩티드를 포함한다.

[0501] 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 과발현된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 과발현된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 1에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 CD47 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0502] 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 과발현된 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상) 서열 동일성을 갖는 외인성 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 과발현된 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 서열 번호 2에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 외인성 CD47 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는, 아래에 추가로 기재되는 바와 같이, 표적화된 또는 표적화되지 않은 삽입 방법에 의해 세포의 유전체 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 표적화된 삽입은 표적 좌위 내로 상동성 의존 삽입에 의한 것이며, 예컨대 표 2에 기술된 유전자좌, 예를 들어 B2M 유전자, CIITA 유전자, TRAC 유전자, TRBC 유전자 중 어느 하나 내로의 삽입에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 표적화된 삽입은 상동성 독립적 삽입, 예컨대 피난항 좌위 내로의 삽입에 의한 것이다. 일부 경우에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위 내로 삽입되며, 이에 제한되지는 않지만, 예컨대 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다.

[0503] 일부 구현예에서, CD47 전부 또는 이의 기능적 부분은 다른 구성성분, 예컨대 신호 펩티드, 리더 서열, 분비 신호, 표지(예를 들어, 보고자 유전자), 또는 이들의 임의의 조합에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, CD47의 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열은 이종성 단백질에서 유래한 신호 펩티드를 암호화하는 핵산 서열로 대체된다. 이종성 단백질은 예를 들어, CD8α, CD28, 조직 플라스미노겐 활성자[tissue plasminogen activator, tPA], 성장 호르몬, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자[granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF], GM-CSF 수용체[GM-CSFRa], 또는 면역글로불린(예를 들어, IgE 또는 IgK)일 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 면역글로불린(예컨대 IgG 중쇄 또는 IgG-카파 경쇄), 시토킨(예컨대, 인터루킨-2(IL-2), 또는 CD33), 혈청 알부민 단백질(예를 들어, HSA 또는 알부민), 인간 아주로시딘 단백질원[preprotein] 신호 서열, 발광효소, 트립시노겐(예를 들어, 키모트립시노겐 또는 트립시노겐) 또는 세포에 의해 또는 세포상에서 단백질을 효율적으로 발현할 수 있는 기타 신호 펩티드이다.

[0504] 특정 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0505] 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, 및 SHS231에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, CD47을 암호화하는

외인성 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0506] 일부 구현예에서, CD47 단백질 발현은 CD47 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 이용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 외인성 CD47 mRNA의 존재를 확인하기 위해 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]이 사용된다.

[0507] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD200, 예컨대 인간 CD200을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CD200은 세포에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CD200의 발현은, 참조 또는 미변형된 세포가 CD200을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 CD200에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC03P112332, HGNC 번호 7203, NCBI 유전자 ID 4345, Uniprot 번호 P41217, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_001004196.2, NM_001004196.3, NP_001305757.1, NM_001318828.1, NP_005935.4, NM_005944.6, XP_005247539.1, 및 XM_005247482.2에 제공된다. 특정 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0508] 일부 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 CD200을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0509] 일부 구현예에서, CD200 단백질 발현은 CD200 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 CD200 mRNA의 존재를 확인한다.

[0510] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 HLA-E, 예컨대 인간 HLA-E를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, HLA-E는 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, HLA-E의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 HLA-E를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 HLA-E에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC06P047281, HGNC 번호 4962, NCBI 유전자 ID 3133, Uniprot 번호 P13747, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_005507.3 및 NM_005516.5에 제공된다. 특정 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0511] 일부 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0512] 일부 구현예에서, HLA-E 단백질 발현은 HLA-E 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용

하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 HLA-E mRNA의 존재를 확인한다.

[0513] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 HLA-G, 예컨대 인간 HLA-G를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, HLA-G는 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, HLA-G의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 HLA-G를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 HLA-G에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC06P047256, HGNC 번호 4964, NCBI 유전자 ID 3135, Uniprot 번호 P17693, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_002118.1 및 NM_002127.5에 제공된다. 특정 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0514] 일부 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0515] 일부 구현예에서, HLA-G 단백질 발현은 HLA-G 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 HLA-G mRNA의 존재를 확인한다.

[0516] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 PD-L1, 예컨대 인간 PD-L1을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, PD-L1은 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, PD-L1의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 PD-L1을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 PD-L1 또는 CD274에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC09P005450, HGNC 번호 17635, NCBI 유전자 ID 29126, Uniprot 번호 Q9NZQ7, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_001254635.1, NM_001267706.1, NP_054862.1, 및 NM_014143.3에 제공된다. 특정 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0517] 일부 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0518] 일부 구현예에서, PD-L1 단백질 발현은 PD-L1 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 PD-L1 mRNA의 존재를 확인한다.

[0519] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 FasL, 예컨대 인간 FasL을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, FasL은 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, FasL의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 FasL을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 FasL 리간드(FasL, FASLG, CD178, TNFSF6, 등으로도 알려짐)에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어,

GeneCard 식별자 GC01P172628, HGNC 번호 11936, NCBI 유전자 ID 356, Uniprot 번호 P48023, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_000630.1, NM_000639.2, NP_001289675.1, 및 NM_001302746.1에 제공된다. 특정 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0520] 일부 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 Fas-L을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0521] 일부 구현예에서, Fas-L 단백질 발현은 Fas-L 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 Fas-L mRNA의 존재를 확인한다.

[0522] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CCL21, 예컨대 인간 CCL21을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CCL21은 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CCL21의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 CCL21을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 CCL21에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC09M034709, HGNC 번호 10620, NCBI 유전자 ID 6366, Uniprot 번호 O00585, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_002980.1 및 NM_002989.3에 제공된다. 특정 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0523] 일부 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 CCL21을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0524] 일부 구현예에서, CCL21 단백질 발현은 CCL21 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 CCL21 mRNA의 존재를 확인한다.

[0525] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CCL22, 예컨대 인간 CCL22를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, CCL22는 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, CCL22의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 CCL22를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 CCL22에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC16P057359, HGNC 번호 10621, NCBI 유전자 ID 6367, Uniprot 번호 O00626, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_002981.2, NM_002990.4, XP_016879020.1, 및 XM_017023531.1에 제공된다. 특정 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0526] 일부 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다.

구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 CCL22를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0527] 일부 구현예에서, CCL22 단백질 발현은 CCL22 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 CCL22 mRNA의 존재를 확인한다.

[0528] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 Mfge8, 예컨대 인간 Mfge8을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, Mfge8은 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, Mfge8의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 Mfge8을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 Mfge8에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC15M088898, HGNC 번호 7036, NCBI 유전자 ID 4240, Uniprot 번호 Q08431, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_001108086.1, NM_001114614.2, NP_001297248.1, NM_001310319.1, NP_001297249.1, NM_001310320.1, NP_001297250.1, NM_001310321.1, NP_005919.2, 및 NM_005928.3에 제공된다. 특정 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0529] 일부 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여 Mfge8을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0530] 일부 구현예에서, Mfge8 단백질 발현은 Mfge8 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 Mfge8 mRNA의 존재를 확인한다.

[0531] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 SerpinB9, 예컨대 인간 SerpinB9를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, SerpinB9는 세포 내에서 과발현된다. 일부 구현예에서, SerpinB9의 발현은 참조 또는 미변형된 세포가 SerpinB9를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하지 않음을 제외하고는 유사한, 참조 또는 미변형된 세포(임의의 다른 변형을 갖는 것 포함)에 비교하여, 조작된 세포에서 증가된다. 인간 SerpinB9에 대해 유용한 유전체성, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 정보는 예를 들어, GeneCard 식별자 GC06M002887, HGNC 번호 8955, NCBI 유전자 ID 5272, Uniprot 번호 P50453, 및 NCBI RefSeq 번호 NP_004146.1, NM_004155.5, XP_005249241.1, 및 XM_005249184.4에 제공된다. 특정 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 함께 작동 가능한 상태로 연결된다.

[0532] 일부 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 표 2에 기술된 유전자좌 중 어느 하나 내로 삽입된다. 일부 경우에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌에서 선택된 유전자좌 내로 삽입된다. 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 *CCR5* 유전자좌, *PPP1R12C*(*AAVS1*로도 알려짐) 유전자좌 또는 *CLYBL* 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 B2M 유전자좌 또는 CIITA 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포이며, SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 TRAC 유전자좌 또는 TRBC 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 적합한 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 유전자 편집 시스템 중 임의의 것)을 사용하여

SerpinB9를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 세포 유전체 좌위 내로의 삽입을 용이하게 한다.

[0533] 일부 구현예에서, SerpinB9 단백질 발현은 SerpinB9 단백질에 대한 항체로 탐침된 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 사용하여 검출된다. 일부 구현예에서, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응[RT-PCR]을 사용하여 외인성 SerpinB9 mRNA의 존재를 확인한다.

[0534] 2. 키메라 항원 수용체

[0535] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 키메라 항원 수용체[CAR]을 발현시키도록 추가로 변형된다. CAR 변형된 세포에 관한 구현예는 본원에 기재된 것과 같은 임의의 적합한 세포 유형뿐만 아니라, HIP 세포, 안전 스위치 및 본원에 기재된 것과 같은 기타 변형된/유전자 편집된 세포에 쉽게 적용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0536] 일부 구현예에서, 제공된 세포는 본원에 기재된 것과 같은 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, CAR을 발현하는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 유전자 변형을 함유한다. 일부 구현예에서, 세포는 그 안에서 B2M이 감소 또는 제거(예를 들어, 녹아웃)되고, CIITA가 감소 또는 제거(예를 들어, 녹아웃), CD47이 과발현되고, CAR이 발현되는 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 *B2M*$^{-/-}$, *CIITA*$^{-/-}$, *CD47tg*, CAR+세포이다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 추가로, 그 안에서 TRAC가 감소되거나 제거(예를 들어, 녹아웃)된 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 *B2*$^{-/-}$, *CIITA*, *CD47tg*, *TRAC*$^{-/-}$, CAR+세포이다.

[0537] 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포, 예컨대 일차 T 세포 또는 만능 세포(예를 들어, iPSC)에서 분화된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해[NK] 세포, 예컨대 일차 NK 세포 또는 만능 세포(예를 들어, iPSC)에서 분화된 T 세포이다.

[0538] 일부 구현예에서, CAR은 1세대 CAR, 2세대 CAR, 3세대 CAR, 및 4세대 CAR로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 신호전달 도메인(예컨대, 1, 2 또는 3개의 신호전달 도메인)을 포함하는 1세대 CAR이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 두 개의 신호전달 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 적어도 세 개의 신호전달 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 세 개 또는 네 개의 신호전달 도메인 및 CAR의 성공적인 신호전달 시 시토킨 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 포함하는 4세대 CAR. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 항체, 항체 단편, scFv 또는 Fab이거나, 이를 포함한다.

[0539] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 어느 하나는 CAR 또는 1세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 1세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다.

[0540] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 어느 하나는 CAR을 암호화하는 핵산 또는 2세대 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 2세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 두 개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공동자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공동자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 시토킨 생산, CAR T 세포 증식, 및/또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다.

[0541] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 어느 하나는 CAR 또는 3세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 3세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 세 개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공동자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공동자극 도메인은 T 세포 활성화 동안 시토킨 생산, CAR T 세포 증식, 및/또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 3세대 CAR은 적어도 두 개의 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 두 개의 공동자극 도메인은 동일하지 않다.

[0542] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 중 어느 하나는 CAR 또는 4세대 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 4세대 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 적어도 두 개, 세 개, 또는 네 개의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 동안 하류 신호전달을 매개한다. 일부 구현예에서, 신호전달 도메인은 공동자극 도메인이다. 일부 구현예에서, 공동자극 도메인은 T 세포 활성화 동안

시토킨 생산, CAR T 세포 증식, 및 또는 CAR T 세포 지속성을 향상시킨다.

[0543] 일부 구현예에서, 여기 제공된 조작된 세포(예를 들어, 일차 또는 iPSC-유래 T 세포 또는 일차 또는 iPSC-유래 NK 세포)는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 유전체 좌위 내에 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 이에 제한되지는 않지만 예컨대 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3(CD142로도 알려짐), MICA, MICB, LRP1(CD91로도 알려짐), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 또는 KDM5D 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD-1 또는 CTLA-4 유전자에 삽입된다. 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 저면역원성 세포의 유전체 좌위 내로 CAR을 삽입하기 위해 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다.

[0544] 일부 구현예에서, 1, 2, 3, 또는 4세대 CAR은, CAR의 성공적인 신호전달시 시토킨 유전자를 유도하는 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 시토킨 유전자는 CAR의 성공적인 신호전달시 시토킨 유전자의 발현을 유도하는 도메인을 포함한 CAR을 포함하는 표적 세포에 대해 내인성 또는 외인성이다. 일부 구현예에서, 시토킨 유전자는 전염증성[pro-inflammatory] 시토킨을 암호화한다. 일부 구현예에서, 시토킨 유전자는 IL-1, IL-2, IL-9, IL-12, IL-18, TNF, 또는 IFN-감마, 또는 이의 기능적 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, CAR의 성공적인 신호전달시 시토킨 유전자의 발현을 유도하는 도메인은 전사 인자 또는 이의 기능적 도메인 또는 단편이거나, 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR의 성공적인 신호전달시 시토킨 유전자의 발현을 유도하는 도메인은 전사 인자 또는 이의 기능적 도메인 또는 단편이거나, 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 전사 인자 또는 이의 기능적 도메인 또는 단편은 활성화된 T 세포의 핵 인자[nuclear factor of activated T cell, NFAT], NF-kB, 또는 이의 기능적 도메인 또는 단편이거나, 이를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Zhang. C. et al., Engineering CAR-T cells. Biomarker Research. 5:22 (2017); WO 2016126608; Sha, H. et al. Chimaeric antigen receptor T-cell therapy for tumour immunotherapy. Bioscience Reports Jan 27, 2017, 37 (1)]을 참조.

[0545] 숙련된 기술자는 CAR 및 CAR의 상이한 구성성분 및 구성을 잘 알고 있다. 임의의 알려진 CAR은 제공된 구현예와 관련하여 사용될 수 있다. 본원에 기재된 CAR에 추가하여, 다양한 CAR 및 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 당업계에 알려져 있고, 본원에 기재된 바와 같이 세포를 조작하는데 적합할 수 있다. 예를 들어, 제WO2013040557호, 제WO2012079000호, 제WO2016030414호, 문헌[Smith T, et al., Nature Nanotechnology. 2017. DOI: 10.1038/NNANO.2017.57]을 참조하며, 이의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. CAR의 예시적인 특징들 및 구성성분은 아래 하위섹션에 기재된다.

[0546] a. 항원 결합 도메인

[0547] 일부 구현예에서, CAR 항원 결합 도메인[antigent binding domain, ABD]은 항체 또는 이의 항원-결합 부분이거나, 이를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR 항원 결합 도메인은 scFv 또는 Fab이거나, 이를 포함한다.

[0548] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 세포의 세포 표면 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 세포 표면 항원은 구체적인 또는 특이적 세포 유형의 특징이다(예를 들어, 이에 의해 발현된다). 일부 구현예에서, 세포 표면 항원은 세포의 하나 이상의 유형의 특징이다.

[0549] 일부 구현예에서, 항원은 종양 세포상에서 배타적으로 또는 우선적으로 발현된 항원 또는 자가면역 또는 염증 질환에 특징적인 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인[ABD]은 신생물[neoplastic] 세포의 특징적인 항원을 표적화한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 신생물 또는 암 세포에 의해 발현되는 항원을 표적화한다. 일부 구현예에서, ABD는 종양 연관 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 신생물 세포(예를 들어, 신생물 또는 암 세포 연관 항원) 또는 종양 연관 항원의 특징적인 항원은 세포 표면 수용체, 이온 채널 연결 수용체, 효소 연결 수용체, G 단백질 연결 수용체, 수용체 티로신 키나제, 티로신 키나제 연관 수용체, 수용체-유사 티로신 인산염분해효소, 수용체 세린/트레오닌 키나제, 수용체 구아닐릴 고리화효소, 히스티딘 키나제 연관 수용체에서 선택된다.

[0550] 일부 구현예에서, 표적 항원은, 표피 성장 인자 수용체[Epidermal Growth Factor Receptors, EGFR](ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, 및 ErbB4/HER4 포함), 섬유아세포 성장 인자 수용체[Fibroblast Growth Factor Receptors, FGFR](FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF18, 및 FGF21 포함) 혈관 내피 성장 인자 수용체[Vascular Endothelial Growth Factor Receptors, VEGFR](VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, 및 PIGF 포함), RET 수용체 및 Eph 수용체 족(EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA9, EphA10, EphB1, EphB2. EphB3, EphB4, 및 EphB6 포함), CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CFTR, CIC-1, CIC-2, CIC-4, CIC-5, CIC-7, CIC-Ka, CIC-Kb, 베스트로

핀, TMEM16A, GABA 수용체, 글리신 수용체, ABC 수송체, NAV1.1, NAV1.2, NAV1.3, NAV1.4, NAV1.5, NAV1.6, NAV1.7, NAV1.8, NAV1.9, 스핑고신-1-인산염 수용체[sphingosin-1-phosphate receptor, S1P1R], NMDA 채널, 막관통 단백질, 다중스팬[multispan] 막관통 단백질, T-세포 수용체 모티프, T-세포 알파 사슬, T-세포 β 사슬, T-세포 γ 사슬, T-세포 δ 사슬, CCR7, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD11c, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD28, CD34, CD35, CD40, CD45RA, CD45RO, CD52, CD56, CD62L, CD68, CD80, CD95, CD117, CD127, CD133, CD137 (4-1 BB), CD163, F4/80, IL-4Ra, Sca-1 , CTLA-4, GITR, GARP, LAP, 그랜자임(granzyme) B, LFA-1, 트랜스페린 수용체, NKp46, 퍼포린, CD4+, Th1, Th2, Th17, Th40, Th22, Th9, Tfh, 표준 Treg, FoxP3+, Tr1, Th3, Treg17, $T_{RE}G$, CDCP, NT5E, EpCAM, CEA, gpA33, 뮤신, TAG-72, 탄산탈수효소 IX, PSMA, 폴레이트 결합 단백질, 강글리오사이드(예를 들어, CD2, CD3, GM2), 루이스-$γ^2$, VEGF, VEGFR 1/2/3, αVβ3, α5β1, ErbB1/EGFR, ErbB1/HER2, ErB3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, 테나신, PDL-1, BAFF, HDAC, ABL, FLT3, KIT, MET, RET, IL-1β, ALK, RANKL, mTOR, CTLA-4, IL-6, IL-6R, JAK3, BRAF, PTCH, 평활화[Smoothened], PIGF, ANPEP, TIMP1, PLAUR, PTPRJ, LTBR, 또는 ANTXR1, 폴레이트 수용체 알파[Folate receptor alpha, FRa], ERBB2(Her2/neu), EphA2, IL-13Ra2, 표피 성장 인자 수용체[epidermal growth factor receptor, EGFR], 메소텔린, TSHR, CD19, CD123, CD22, CD30, CD171, CS-1, CLL-1, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, MUC16(CA125), L1CAM, LeY, MSLN, IL13Ra1, L1-CAM, Tn Ag, 전립선 특이적 막 항원[prostate specific membrane antigen, PSMA], ROR1, FLT3, FAP, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, 인터루킨-11 수용체 a(IL-11Ra), PSCA, PRSS21, VEGFR2, 루이스Y, CD24, 혈소판 유래 성장 인자 수용체-베타[platelet-derived growth factor receptor-beta, PDGFR-beta], SSEA-4, CD20, MUC1, NCAM, 단백분해효소, PAP, ELF2M, 에프린(Ephrin) B2, IGF-1 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, 티로시나제, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 폴레이트 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, 레구메인(legumain), HPV E6, E7, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, 주조직적합성 복합체 클래스 I-관련 유전자 단백질[MR1], 우로키나제 유형 플라스미노겐 활성자 수용체[uPAR], Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이체, 프로스테인, 수르비빈, 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴(Galectin) 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전좌 절단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 시클린(Cyclin) B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 장 카르복실 에스테르분해효소, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, 신생항원, CD133, CD15, CD184, CD24, CD56, CD26, CD29, CD44, HLA-A, HLA-B, HLA-C, (HLA-A,B,C) CD49f, CD151 CD340, CD200, tkrA, trkB, 또는 trkC, 또는 이들의 항원 단편 또는 항원 부분을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0551] 일부 구현예에서, 예시적인 표적 항원은, CDS, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD70, 카파, 람다 및 B 세포 성숙 제제[B cell maturation agent, BCMA](백혈병과 연관됨), CS1/SLAMF7, CD38, CD138, GPRC5D, TACI 및 BCMA(흑색종과 연관됨), GD2, HER2, EGFR, EGFRvIII, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FRa, IL-13Ra, 메소텔린, MUC1, MUC16 및 ROR1(고형 종양과 연관됨)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0552] 일부 구현예에서, CAR은 CD19 CAR이다. 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD19, 예를 들어 인간 CD19에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커 펩티드에 의해 연결된 FMC63의 중쇄 가변 영역[heavy chain variable region, VH] 및 경쇄 가변 영역[light chain variable region, VL]을 포함하는, FMC63 단클론성 항체(FMC63)에서 유래한 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 펩티드는 '위트로(Whitlow)'링커 펩티드이다. FMC63 및 유래된 scFv는 문헌[Nicholson et al., Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997)] 및 PCT 출원 공개 번호 제WO2018213337호에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0553] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, SJ25C1(문헌[Bejcek et al., Cancer Res. 55:2346-2351 (1995)]), HD37(문헌[Pezutto et al., J. Immunol. 138(9):2793-2799 (1987)]), 4G7(문헌[Meeker et al., Hybridoma 3:305-320 (1984)]), B43(문헌[Bejcek (1995)]), BLY3(문헌[Bejcek (1995)]), B4(문헌[Freedman et al., 70:418-427 (1987)]), B4 HB12b(문헌[Kansas & Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102 (1991); Yazawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183 (2005); Herbst et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222 (2010)]), BU12(문헌[Gallard et al., J. Immunology, 148(10): 2983-2987 (1992)]), 및 CLB-CD19(문헌[De Rie Cell. Immunol. 118:368-381(1989)])을 포함하는 CD19-특이적 항체들 중 하나에서 유

래된 항체를 포함한다.

[0554] 일부 구현예에서, CAR은 CD22 CAR이다. 막관통 단백질인 CD22는 B 세포 수용체[B cell receptor, BCR] 신호전달을 위한 억제 수용체로서 기능하는 성숙 B 세포 표면상에서 대부분 발견된다. CD22는 B 세포 림프종 및 백혈병(예를 들어, B-만성 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병[acute lymphocytic leukemia, ALL], 및 버킷 림프종)의 60 내지 70%에서 발현되고, B 세포 발생 초기에 세포 표면상에 또는 줄기 세포상에 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, CD22 CAR은, CD22에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 막관통 도메인, 세포내 신호전달 도메인 및/또는 세포내 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커에 의해 연결되는 m971의 중쇄 가변 영역[VH] 및 경쇄 가변 영역[VL]을 포함하는 m971 단클론성 항체(m971)에서 유래한 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 부모 항체 m971에 비해 유의미하게 개선된(약 2 nM에서부터 50 pM 미만으로 개선됨) CD22 결합 친화도를 갖는 m971의 친화도 성숙 변이체인 m971-L7에서 유래한 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, m971-L7에서 유래한 scFv는 3xG4S 링커에 의해 연결된 m971-L7의 VH 및 VL을 포함한다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 면역독소 HA22 또는 BL22를 포함한다. 면역독소 BL22 및 HA22는 박테리아 독소에 융합된 CD22에 특이적인 scFv를 포함하는 치료제이고, 따라서 CD22를 발현하는 암세포 표면에 결합하고 암세포를 사멸시킬 수 있다. BL22는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소 A의 38-kDa 절두된 형태에 융합된 항-CD22 항체인 RFB4의 dsFv를 포함한다(문헌[Bang et al., Clin. Cancer Res., 11:1545-50 (2005)]). HA22(CAT8015, 목세투모맙 파수도톡스(moxetumomab pasudotox))는 BL22의 돌연변이된, 보다 고친화도의 형태이다(문헌[Ho et al., J. Biol. Chem., 280(1): 607-17 (2005)]). CD22에 특이적인 HA22 및 BL22의 항원 결합 도메인의 적합한 서열은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,541,034호, 제7,355,012호, 및 제7,982,011호에 개시되어 있다.

[0555] 일부 구현예에서, CAR은 BCMA CAR이다. BCMA는 말단 분화된 B 세포 또는 성숙 B 림프구상에서 가장 높은 발현을 갖는 B 세포 계통의 세포상에서 발현되는 종양 괴사 족 수용체[tumor necrosis family receptor, TNFR]이다. BCMA는 장기간 체액성 면역을 유지하기 위한 형질세포의 생존을 매개하는 데 관련된다. BCMA의 발현은 최근에 다수의 암, 예컨대, 다발성 골수종, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 다양한 백혈병 및 교모세포종과 연관되었다. 일부 구현예에서, BCMA CAR은 신호 펩티드, BCMA에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 막관통 도메인, 세포내 신호전달 도메인 및/또는 세포내 공동자극 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 BCMA, 예를 들어, 인간 BCMA에 특이적으로 결합한다. BCMA에 지정된 CAR은, PCT 출원 공개 번호 제WO2016/014789호, 제WO2016/014565호, 제WO2013/154760호, 및 제WO 2015/128653호에 기재되어 있다. BCMA-결합 항체 또한, PCT 출원 공개 번호 제2015/166073호 및 제WO2014/068079호에 개시되어 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)]에 기재된 바와 같은 쥣과의 단클론성 항체 유래의 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv 항체 단편은 쥣과의 단클론성 항체의 인간화된 형태이다(문헌[Sommermeyer et al., Leukemia 31:2191-2199 (2017)]). 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Zhao et al., J. Hematol. Oneal. 11(1):141 (2018)]에 기재된 바와 같이 BCMA의 두 개의 에피토프에 결합할 수 있는 두 개의 중쇄의 단일 가변 단편[VHH]을 포함한다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Lam et al., Nat. Commun. 11(1):283 (2020)]에 기재된 바와 같은 완전 인간 중쇄 가변 도메인[fully human heavy-chain variable domain, FHVH]을 포함한다.

[0556] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 자가면역 또는 염증성 장애의 특징적인 항원을 표적화한다. 일부 구현예에서, ABD는 자가면역 또는 염증성 장애와 연관된 항원에 결합한다. 어떤 경우에, 항원은 자가면역 또는 염증성 장애와 연관된 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 자가면역 또는 염증성 장애는 만성 이식편-대-숙주 질환[graft-vs-host disease, GVHD], 루푸스, 관절염, 면역 복합체 사구체신염, 굿파스처(goodpasture), 포도막염, 간염, 전신 경화증 또는 경피증, I형 당뇨병, 다발성 경화증, 한랭 응집소 질환, 심상성 천포창, 그레이브스병, 자가면역 용혈성 빈혈, 혈우병 A, 원발성 쇼그렌 증후군, 혈전성 혈소판 감소증 자반병, 시신경 척수염, 에반 증후군, IgM 매개 신경병증, 한랭글로불린혈증, 피부근염, 특발성 혈소판감소증, 강직성 척추염, 물집유사천포창, 후천성 맥관부종, 만성 두드러기, 항인지질 탈수초성 다발신경병증, 및 자가면역 혈소판감소증 또는 호중구감소증 또는 순수 적혈구 무형성증에서 선택되는 한편, 동종면역 질환의 예시적인 비제한적인 예는 조혈 또는 고형 장기 이식에서의 동종감작(예를 들어, 문헌[Blazar et al., 2015, Am. J. Transplant, 15(4):931-41] 참조) 또는 이종감작, 수혈, 태아 동종감작을 동반한 임신, 신생아 동종면역 혈소판감소증, 신생아의 용혈성 질환, 효소 또는 단백질 대체 치료법으로 치료된 유전성 또는 후천성 결핍 장애의 대체로 발생할 수 있는 외래 항원에 대한 감작. 혈액 제제, 및 유전자 치료법을 포함한다. 일부 경우에서, 동종감작은 수용자 대상 또는 임신한 대상의 면역계가 비-자가 항원인 것으로 간주하는 인간 백혈구 항원에 대한 면역 반응(예컨대 순환성 항체)

의 발달을 지칭한다. 일부 구현예에서, 자가면역 또는 염증성 장애의 특징적인 항원은 세포 표면 수용체, 이온 채널 연결 수용체, 효소 연결 수용체, G 단백질 연결 수용체, 수용체 티로신 키나제, 티로신 키나제 연관 수용체, 수용체-유사 티로신 인산염분해효소, 수용체 세린/트레오닌 키나제, 수용체 구아닐릴 고리화효소, 또는 히스티딘 키나제 연관 수용체에서 선택된다.

[0557] 일부 구현예에서, CAR의 항원 결합 도메인은 B 세포, 형질 세포, 또는 형질아세포상에 발현된 리간드에 결합한다. 일부 구현예에서, CAR의 항원 결합 도메인은 CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD27, CD38, CD45R, CD138, CD319, BCMA, CD28, TNF, 인터페론 수용체, GM-CSF, ZAP-70, LFA-1, CD3 감마, CD5 또는 CD2에 결합한다. 제US 2003/0077249호, 제WO 2017/058753호, 제WO 2017/058850호를 참조하며, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, CAR은 항-CD19 CAR이다. 일부 구현예에서, CAR은 항-BCMA CAR이다.

[0558] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 노화 세포의 특징적인 항원, 예를 들어, 우로키나제-유형 플라스미노겐 활성인자 수용체[urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR]를 표적화한다. 일부 구현예에서, ABD는 노화 세포와 관련된 항원에 결합한다. 일부 경우에는, 항원은 노화 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, CAR은 노화 세포의 비정상적인 축적을 특징으로 하는 장애, 예를 들어, 간 및 폐 섬유증, 죽상동맥경화증, 당뇨병 및 골관절염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.

[0559] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 감염성 질환의 특징적인 항원을 표적화한다. 일부 구현예에서, ABD는 감염성 질환과 관련된 연관된 항원에 결합한다. 일부 경우에서, 항원은 감염성 질환의 영향을 받는 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 여기서 감염성 질환은 HIV, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 8(HHV-8, 카포시 육종 연관 헤르페스 바이러스[Kaposi sarcoma-associated herpes virus, KSHV], 인간 T-림프영양성 바이러스-1[Human T-lymphotrophic virus-1, HTLV-1], 메르켈 세포 폴리오마바이러스[Merkel cell polyomavirus, MCV], 유인원 바이러스 40(SV40), 엡스타인-바 바이러스, CMV, 인간 인유두종바이러스에서 선택된다. 일부 구현예에서, 감염성 질환의 특징적인 항원은 세포 표면 수용체, 이온 채널 연결 수용체, 효소 연결 수용체, G 단백질 연결 수용체, 수용체 티로신 키나제, 티로신 키나제 연관 수용체, 수용체-유사 티로신 인산염분해효소, 수용체 세린/트레오닌 키나제, 수용체 구아닐릴 고리화효소, 히스티딘 키나제 연관 수용체, HIV Env, gp120, 또는 HIV-1 Env 상의 CD4-유도 에피토프로부터 선택된다.

[0560] 임의의 이러한 구현예에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 가질 수 있다.

[0561] 일부 구현예에서, CAR은 두 개의 표적 항원에 대해 이중특이적이다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 상이한 표적 항원이다. 임의의 이러한 일부 구현예에서, 두 개의 상이한 표적 항원은 상기 기재된 임의의 두 개의 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 상이하며, (i) CD19 및 CD20, (ii) CD20 및 L1-CAM, (iii) L1-CAM 및 GD2, (iv) EGFR 및 L1-CAM, (v) CD19 및 CD22, (vi) EGFR 및 C-MET, (vii) EGFR 및 HER2, (viii) C-MET 및 HER2, 또는 (ix) EGFR 및 ROR1에서부터의 상이한 두 개의 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 두 개의 상이한 항원 결합 도메인 각각은 scFv이다. 일부 구현예에서, 제1의 scFv의 하나의 가변 도메인(VH 또는 VL)의 C 말단은 폴리펩티드 링커를 통해 제2의 scFv(각각, VL 또는 VH)에 고정된다. 일부 구현예에서, 링커는 VH의 N-말단을 VL의 C-말단과 연결하거나, VH의 C-말단을 VL의 N-말단과 연결한다. 이들 scFv는 천연 항체의 중쇄 및 경쇄에 존재하는 불변 영역(Fc)을 결여한다. 적어도 두 개의 상이한 항원에 특이적인 scFv는 나란히 배열되고, 막관통 도메인을 통해 공동자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서 도메인은 항원-특이적 결합 영역 및 막관통 도메인 사이에 연결될 수 있다.

[0562] 일부 구현예에서, CAR의 각각의 항원-특이적 표적화 영역은 2가(또는 이가)의 단일사슬 가변 단편[디-scFvs, 이중-scFvs]를 포함한다. 디-scFv를 포함하는 CAR에서, 각각의 항원에 특이적인 두 개의 scFv는 두 개의 VH 및 두 개의 VL 영역을 갖는 단일 펩티드를 생성함으로써 함께 연결되어, 탠덤 scFv를 산출한다(문헌[Xiong, Cheng-Yi; Natarajan, A; Shi, X B; Denardo, G L; Denardo, S J (2006). "Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding". Protein Engineering Design and Selection 19 (8): 359-367; Kufer, Peter; Lutterbuese, Ralf; Baeuerle, Patrick A. (2004). "A revival of bispecific antibodies". Trends in Biotechnology 22 (5): 238-244]). 적어도 두 개의 항원-특이적 표적화 영역을 포함하는 CAR은 두 개의 항원 각각에 특이적인 두 개의 scFv를 발현할 수 있다. 생성된 항원-특이적 표적화 영역은, 적어도 두 개의 상이한 항원에 대해 특이적이며, 막관통 도메인을 통해 공동자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 결합된다. 일부 구현예에서, 세포외 스페이서 도메인은 항원-특이적 결합 도메인 및 막관통 도메인 사이에 연결될 수 있다.

[0563] 일부 구현예에서, CAR의 각각의 항원-특이적 표적화 영역은 이량항체[diabody]이다. 이량항체에서, scFv는 두 개의 가변 영역이 함께 접히기에는 너무 짧은 링커 펩티드를 이용하여 생성되어, scFv를 이량체화한다. 훨씬 더 짧은 링커(하나 이상의 아미노산)은 삼량항체(삼중항체 또는 삼중체)의 형성으로 이어진다. 사량항체가 사용될 수도 있다.

[0564] 일부 구현예에서, 세포는 하나 초과의 CAR, 예컨대 두 개의 상이한 CAR을 발현하도록 조작되며, 여기서 각각의 CAR은 상이한 표적 항원으로 지시되는 항원 결합 도메인을 갖는다. 임의의 이러한 일부 구현예에서, 두 개의 상이한 표적 항원은 상기 기재된 임의의 두 개의 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 상이하며, (i) CD19 및 CD20, (ii) CD20 및 L1-CAM, (iii) L1-CAM 및 GD2, (iv) EGFR 및 L1-CAM, (v) CD19 및 CD22, (vi) EGFR 및 C-MET, (vii) EGFR 및 HER2, (viii) C-MET 및 HER2, 또는 (ix) EGFR 및 ROR1에서부터의 두 개의 상이한 항원에 결합한다.

[0565] 일부 구현예에서, 상이한 CAR로 각각 조작된 제공된 변형을 함유하는 두 개의 상이한 조작된 세포가 제조된다. 일부 구현예에서, 두 개의 상이한 CAR 각각은 상이한 표적 항원으로 지시되는 항원 결합 도메인을 갖는다. 임의의 이러한 일부 구현예에서, 두 개의 상이한 표적 항원은 상기 기재된 두 개의 상이한 항원이다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 상이하며, (i) CD19 및 CD20, (ii) CD20 및 L1-CAM, (iii) L1-CAM 및 GD2, (iv) EGFR 및 L1-CAM, (v) CD19 및 CD22, (vi) EGFR 및 C-MET, (vii) EGFR 및 HER2, (viii) C-MET 및 HER2, 또는 (ix) EGFR 및 ROR1 유래의 두 개의 상이한 항원에 결합된다. 일부 구현예에서, 제1 표적 항원에 지정된 제1 CAR을 발현하는 조작된 세포 집단(예를 들어, 저면역원성) 및 제2 표적 항원에 지정된 제2 CAR을 발현하는 조작된 세포 집단(예를 들어, 저면역원성)이 대상에 각각 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 세포 집단은 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 예를 들어, 제2 CAR을 발현하는 세포 집단은 제1 CAR을 발현하는 세포 집단의 투여 후에 투여된다.

[0566] b. 스페이서

[0567] 일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의 스페이서를 추가로 포함하며, 예를 들어, 상기 스페이서는 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이의 제1 스페이서이다. 일부 구현예에서, 제1 스페이서는 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 변이체 또는 변형된 형태 중 적어도 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 막관통 도메인과 신호전달 도메인 사이의 제2 스페이서이다. 일부 구현예에서, 제2 스페이서는 올리고펩티드이며, 예를 들어, 상기 올리고펩티드는 이에 제한되지는 않지만, 글리신-세린 더블릿(doublet)과 같은 글리신 및 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 두 개 이상의 스페이서, 예를 들어, 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이의 스페이서 및 막관통 도메인과 신호전달 도메인 사이의 스페이서를 포함한다.

[0568] c. 막관통 도메인

[0569] 일부 구현예에서, CAR 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 이의 기능적 변이체의 막관통 영역을 적어도 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40/CD134, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, TCRβ, TCRζ, CD32, CD64, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS, 및 FGFR2B의 막관통 영역(들), 또는 이의 기능적 변이체를 적어도 포함한다.

[0570] d. 신호전달 도메인(들)

[0571] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 CAR은 하나 이상의 B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, PDCD6), 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB 리간드/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 리간드/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 리간드/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 리간드/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR 리간드/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, 림프독소-알파/TNF-베타, OX40/TNFRSF4, OX40 리간드/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-알파, TNF RII/TNFRSF1B), 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, SLAM/CD150), CD2, CD7, CD53, CD82/카이(Kai)-1, CD90/싸이(Thy)1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA 클래스 I, HLA-DR, 이카로스(Ikaros), 인테그린 알파 4/CD49d, 인테그린 알파 4 베타 1, 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, 덱틴-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, 림프구 기능 연관 항원-1

[lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1], NKG2C, CD3 제타 도메인, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM], CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-1[LFA-1], CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 또는 이들의 기능적 단편에서 선택된 하나 또는 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0572] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 CD3 제타 도메인 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

[0573] 일부 구현예에서, CAR은 공동자극 도메인인 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 제2 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 적어도 두 개의 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 적어도 세 개의 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1[LFA-1], CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 중 하나 이상에서부터 선택되는 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR이 두 개 이상의 공동자극 도메인을 포함하는 경우, 두 개의 공동자극 도메인은 상이하다. 일부 구현예에서, CAR이 두 개 이상의 공동자극 도메인을 포함하는 경우, 두 개의 공동자극 도메인은 동일하다.

[0574] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, 및 (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iv) 시토킨 또는 공동자극 리간드 이식유전자를 포함한다.

[0575] 일부 구현예에서, 적어도 두 개의 신호전달 도메인은 CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 적어도 두 개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, 및 (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 적어도 하나의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 두 개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iv) 시토킨 또는 공동자극 리간드 이식유전자를 포함한다.

[0576] 일부 구현예에서, 적어도 세 개의 신호전달 도메인은 CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 적어도 세 개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, 적어도 세 개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 세 개의 신호전달 도메인은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iv) 시토킨 또는 공동자극 리간드 이식유전자를 포함한다.

[0577] 일부 구현예에서, CAR은 CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, 및 (ii) CD28 도메인, 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

[0578] 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

[0579] 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 4-1BB 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및/또는 (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다.

[0580] 일부 구현예에서, CAR은 (i) CD3 제타 도메인, 또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], 또는 이의 기능적 변이체, (ii) CD28 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, (iii) 4-1BB 도메인, 또는 CD134 도메인, 또는 이의 기능적 변이체, 및 (iv) 시토킨 또는 공동자극 리간드 이식유전자를 포함한다.

[0581] e. 예시적인 CAR

[0582] 일부 구현예에서, CAR은 항원(예를 들어 종양 항원)에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인(예를 들어, 항체 또는 항체 단편, 예컨대 scFv), 스페이서(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것과 같은, 힌지 도메인 함유), 막관통 도메인(예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것), 및 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 일차 신호전달 도메인 또는 공동자극 신호전달 도메인과 같은, 임의의 세포내 신호전달 도메인)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 일차 세포질 신호전달 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, 공동자극 도메인)을 추가적으로 포함한다. 그러한 구성성분 중 어느 하나는 상기 기재된 것들 중 임의의 것일 수 있다.

[0583] CAR의 예시적인 구성성분의 예가 표 8에 기재된다. 제공된 양태에서, CAR의 각각의 구성성분의 서열은 표 8에 나열된 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0584] [표 8] CAR 구성성분 및 예시적인 서열

구성성분 세포외 결합 도메인	서열	서열 번호
항-CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGL VAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVF LKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYW GQGTSVTVSS	208
항-CD19 scFv (FMC63)	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ GTSVTVSS	209
스페이서 (예를 들어, 힌지)		
IgG4 힌지	ESKYGPPCPPCP	210
CD8 힌지	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE	211
CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKP	212
막관통		
CD8	ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYC	213
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	214
CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	215

[0585]

공동자극 도메인		
CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP RDFAAYRS	216
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCEL	217
일차 신호전달 도메인		
CD3제타	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	217
CD3제타	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR	218

[0586]

[0587] CAR(키메라 면역수용체, 키메라 T 세포 수용체, 또는 인공 T 세포 수용체로도 알려짐)은 특정 단백질을 표적화하는 새로운 능력을 숙주 세포(예를 들어, T 세포)에 제공하도록 조작된 수용체 단백질이다. 수용체는 항원-결합 및 T 세포 활성화 기능 모두를 단일 수용체 내로 조합하기 때문에 키메라이다. CAR은 표적 항원, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인('결합자'로도 지칭됨)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, CAR은 하나 이상의 신호 펩티드, 하나 이상의 세포외 힌지 도메인 및/또는 하나 이상의 세포내 공동자극 도메인을 포함하는 하나 이상의 추가적인 요소를 더 포함할 수 있다. 도메인은 서로 직접 인접할 수 있거나, 도메인을 연결하는 하나 이상의 아미노산이 존재할 수 있다. CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 포유동물 서열, 예를 들어, 마우스 서열, 영장류 서열, 인간 서열, 또는 이들의 조합에서 유래할 수 있다. CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 비-인간인 경우, CAR의 서열은 인간화될 수 있다. CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수도 있다. 이들 중 임의의 구현예에서, CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 본원에 개시된 임의의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일할 수 있다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일). 서열 변이는 코돈 최적화, 인간화, 제한 효소-기반 클로닝 상흔, 및/또는 기능적 도메인을 연결하는 추가의 아미노산 잔기로 인한 것일 수 있다.

[0588] 특정 구현예에서, CAR은 N-말단에서 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 신호 펩티드의 비제한적 예는 CD8α 신호 펩티드, IgK 신호 펩티드, 및 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 수용체 소단위 알파(콜로니 자극 인자 2 수용체 서브유닛 알파[colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha, CSF2RA]로도 알려진 GMCSFR-α) 신호 펩티드, 및 이들의 변이체를 포함하며, 아래의 표 9에 제공된 아미노산 서열을 포함한다.

[0589] [표 9] 신호 펩티드의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
219	MALPVTALLLPLALLLHAARP	CD8α 신호 펩티드
220	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	IgK 신호 펩티드
221	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR-α (CSF2RA) 신호 펩티드

[0590]

[0591] 특정 구현예에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 하나의 표적 항원 또는 다중 표적 항원에 특이적인 하나 이상의 항체를 포함할 수 있다. 항체는 항체 단편, 예를 들어 scFv, 또는 단일-도메인 항체 단편, 예를 들어, VHH일 수 있다. 특정 구현예에서, scFv는 링커에 의해 연결된 항체의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함할 수 있다. V_H 및 V_L은 V_H-링커-V_L 또는 V_L-링커-V_H의 순서 중 하나로 연결될 수 있다. 링커의 비제한적 예는 위트로 링커, $(G_4S)_n$(n은 양의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 등일 수 있음) 링커, 및 이들의 변이체를 포함한다. 특정 구현예에서, 항원은 종양 세포상에서 배타적으로 또는 우선적으로 발현된 항원, 또는 자가면역 또는 염증 질환에 특징적인 항원일 수 있다. 예시적인 표적 항원은 CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD70, 카파, 람다 및 B 세포 성숙 제제[BCMA], 및 G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[GPRC5D](백혈병과 연관됨), CS1/SLAMF7, CD38, CD138, GPRC5D, TACI 및 BCMA(흑색종과 연관됨), CD123, LeY, NKG2D 리간드, 및 WT1

(기타 혈액암과 연관됨), GD2, HER2, EGFR, EGFRvIII, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FRα, IL-13Rα, 메소텔린, MUC1, MUC16 및 ROR1, C-Met, CD133, Ep-CAM, GPC3, HPV16-E6, IL13Ra2, MAGEA3, MAGEA4, MART1, NY-ESO-1, VEGFR2, α-폴레이트 수용체, CD24, CD44v7/8, EGP-2, EGP-40, erb-B2, erb-B 2,3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, G_{D2}, G_{D3}, HMW-MAA, IL-11Rα, KDR, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자, MAGE-A1, 종양태아성 항원(h5T4), 및 TAG-72(고형 종양과 연관됨), A*02(장기 이식과 연관됨), 섬유아세포 활성화 단백질[fibroblast activation protein, FAP](섬유증과 연관됨), 우로키나제-유형 플라스미노겐 활성자 수용체[uPAR] (노화와 연관됨)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, CAR은 자가반응성 면역 세포를 선택적으로 고갈시키도록 키메라 자가항체 수용체[CAAR]로서 재조작될 수 있다. 특정 구현예에서, CAAR은 면역 세포 상에서 자가항체를 표적화하도록 조작된다. CAAR에 대한 예시적인 표적 항원은, DSG3(심상성 천포창과 연관됨), 인자 VIII[FVIII](혈우병과 연관됨)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 임의의 이러한 구현예에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나, 세포외 결합 도메인의 기능을 증가시키기 위해 변이체 서열을 가질 수 있다.

[0592] 특정 구현예에서, CAR은 스페이서로도 지칭되는, 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 용어 '힌지' 및 '스페이서'는 본 개시내용에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 힌지 도메인의 비제한적 예는 CD8α 힌지 도메인, CD28 힌지 도메인, IgG4 힌지 도메인, IgG4 힌지-CH2-CH3 도메인, 및 이들의 변이체를 포함하고, 이의 아미노산 서열은 아래의 표 10에 제공된다.

[0593] [표 10] 힌지 도메인의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
222	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	CD8α 힌지 도메인
223	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKP	CD28 힌지 도메인
224	AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPL FPGPSKP	CD28 힌지 도메인
225	ESKYGPPCPPCP	IgG4 힌지 도메인
226	ESKYGPPCPSCP	IgG4 힌지 도메인
227	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	IgG4 힌지 -CH2-CH3 도메인

[0594]

[0595] 특정 구현예에서, CAR의 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 이들의 기능적 변이체의 막관통 영역을 포함할 수 있으며, 이는 이들 서열 각각의 인간 형태를 포함한다. 다른 구현예에서, 막관통 도메인은 CD8α, CD8β, 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, FcεRIγ, CD16, OX40/CD134, CD3ζ, CD3ε, CD3γ, CD3δ, TCRα, TCRβ, TCRζ, CD32, CD64, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD37, CD80, CD86, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS, 및 FGFR2B의 막관통 영역을 포함하며, 이는 이들 서열 각각의 인간 형태를 포함한다. 표 11은 몇 가지 예시적인 막관통 도메인의 아미노산 서열을 제공한다.

[0596] [표 11] 막관통 도메인의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
228	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8α 막관통 도메인
229	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 막관통 도메인
230	MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 막관통 도메인

[0597]

[0598] 특정 구현예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 세포내 공동자극 도메인은 B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, PDCD6, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB 리간드/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF

R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 리간드/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 리간드/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 리간드/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR 리간드/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, 림프독소-알파/TNFβ, OX40/TNFRSF4, OX40 리간드/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNFα, TNF RII/TNFRSF1B, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, SLAM/CD150, CD2, CD7, CD53, CD82/카이-1, CD90/싸이1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA 클래스 I, HLA-DR, 이카로스, 인테그린 알파 4/CD49d, 인테그린 알파 4 베타 1, 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, 덱틴-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, 림프구 기능 연관 항원-1[LFA-1], NKG2C, CD3ζ, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM], CD27, CD28, 4-1BB, CD134/OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1[LFA-1], CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드, 및 이들의 기능적 변이체에서 선택된 하나 이상의 신호전달 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 이들 서열 각각의 인간 형태를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인 및/또는 세포내 공동자극 도메인은 CD3ζ 도메인, ITAM, CD28 도메인, 4-1BB 도메인 또는 이들의 기능적 변이체에서 선택된 하나 이상의 신호전달 도메인을 포함한다. 표 12는 몇몇 예시적인 세포내 공동자극 및/또는 신호전달 도메인의 아미노산 서열을 제공한다. 특정 구현예에서, 하기 기재된 바와 같은 티사젠렉루셀(tisagenlecleucel)의 경우에서와 같이, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인은 아미노산 위치 14에서 돌연변이, 예를 들어, 글루타민(Q)에서 리신(K)으로의 돌연변이를 가질 수 있다(서열 번호 234 참조).

[0599] [표 12] 세포내 공동자극 및/또는 신호전달 도메인의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
231	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	4-1BB 공동자극 도메인
232	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAP PRDFAAYRS	CD28 공동자극 도메인
233	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 신호전달 도메인
234	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 신호전달 도메인 (위치 14에서 Q에서 K로의 돌연변이를 가짐)

[0600]

[0601] f. CD19 CAR

[0602] 일부 구현예에서, CAR은 CD19 CAR이고, 이러한 구현예에서, 제2 이식유전자는 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19 CAR은 신호 펩티드, CD19에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공동자극 도메인, 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 나란히 포함할 수 있다.

[0603] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 신호 펩티드는 CD8α 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 신호 펩티드는 서열 번호 219에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 219에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 IgK 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, IgK 신호 펩티드는 서열 번호 220에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 220에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드이다. 일부 구현예에서, GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드는 서열 번호 221에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 221에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0604] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD19, 예를 들어, 인간 CD19에 특이적이다. CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나, 세포외 결합 도메인의 기능을 증가시

키기 위해 변이체 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다.

[0605] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은, 링커에 의해 연결되는 FMC63의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 FMC63 단클론성 항체(FMC63)에서 유래한 scFv를 포함한다. FMC63 및 유래된 scFv는 문헌[Nicholson et al., Mol. Immun. 34(16-17):1157-1165 (1997)] 및 PCT 출원 공개 번호 WO2018213337에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 전체 FMC63-유래 scFv(FMC63 scFv로도 지칭됨)의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래의 표 13에 제공된다. 일부 구현예에서, CD19-특이적 scFv는 서열 번호 235, 서열 번호 236, 또는 서열 번호 241에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 235, 서열 번호 236, 또는 서열 번호 241에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CD19-특이적 scFv는 서열 번호 237, 서열 번호 238, 서열 번호 239, 및 서열 번호 241, 서열 번호 243, 서열 번호 244에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD19-특이적 scFv는 서열 번호 237, 서열 번호 238, 서열 번호 239에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD19-특이적 scFv는 서열 번호 242, 서열 번호 243, 서열 번호 244에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 이들 임의의 구현예에서, CD19-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0606] 일부 구현예에서, scFv의 V_H 및 V_L 일부를 연결하는 링커는 서열 번호 240에 기재된 아미노산 서열을 갖는 위트로 링커이다. 일부 구현예에서, 위트로 링커는 상이한 링커, 예를 들어 서열 번호 246에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상이한 $3xG_4S$ 링커로 대체될 수 있으며, 이는 서열 번호 245에 기재된 아미노산 서열을 갖는 상이한 FMC63-유래 scFv를 초래한다. 이들 특정 구현예에서, CD19-특이적 scFv는 서열 번호 245에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 245에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0607] [표 13] 항-CD19 scFv 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
235	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVS WIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSR	항-CD19 FMC63 scFv 전체 서열, 위트로 링커 있음
	LTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	
236	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEIT	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 가변 영역
237	QDISKY	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 CDR1
238	HTS	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 CDR2
239	QQGNTLPYT	항-CD19 FMC63 scFv 경쇄 CDR3
240	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	위트로 링커
241	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDY GVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSAL KSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYC AKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 가변 영역
242	GVSLPDYG	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 CDR1
243	IWGSETT	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 CDR2
244	AKHYYYGGSYAMDY	항-CD19 FMC63 scFv 중쇄 CDR3
245	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYL NWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQ ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWI RQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLT IIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHY YYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	항-CD19 FMC63 scFv 전체 서열, 3xG4S 링커 있음
246	GGGGSGGGGSGGGGS	3xG4S 링커

[0608]

[0609] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 예를 들어, SJ25C1(문헌[Bejcek et al., Cancer Res. 55:2346-2351 (1995)]), HD37(문헌[Pezutto et al., J. Immunol. 138(9):2793-2799 (1987)), 4G7(문헌[Meeker et al., Hybridoma 3:305-320 (1984)]), B43(문헌[Bejcek (1995)]), BLY3(문헌[Bejcek (1995)]), B4(문헌[Freedman et al., 70:418-427 (1987)]), B4 HB12b(문헌[Kansas & Tedder, J. Immunol. 147:4094-4102 (1991); Yazawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:15178-15183 (2005); Herbst et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 335:213-222 (2010)]), BU12(문헌[Callard et al., J. Immunology, 148(10): 2983-2987 (1992)]), 및 CLB-CD19(문헌[De Rie Cell. Immunol. 118:368-381(1989)])를 포함하는 CD19에 특이적인 항체에서

유래한다. 임의의 이러한 구현예에서, CD19 CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H, V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0610] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 힌지 도메인은 CD8α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 힌지 도메인은 서열 번호 222에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 222에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 CD28힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 힌지 도메인은 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지 도메인은 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 227에 기재된 아미노산 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0611] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 막관통 도메인은 서열 번호 15A에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 15A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 막관통 도메인은 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0612] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포내 공동자극 도메인은 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. CD137로도 알려진 4-1BB는 강력한 공동자극 신호를 T 세포로 전달하여, 분화를 촉진시키고 T 림프구의 장기간 생존을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 4-1BB 공동자극 도메인은 인간이다. 일부 구현예에서, 4-1BB 공동자극 도메인은 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 세포내 공동자극 도메인은 CD28 공동자극 도메인을 포함한다. CD28은 T 세포상의 또 다른 공동자극 분자이다. 일부 구현예에서, CD28 공동자극 도메인은 인간이다. 일부 구현예에서, CD28 공동자극 도메인은 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포내 공동자극 도메인은 기재된 바와 같이 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD28 공동자극 도메인을 포함한다.

[0613] 일부 구현예에서, CD19 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인을 포함한다. CD3ζ은 T 세포 수용체[TCR]와 회합되어 신호를 생성하고 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프[ITAM]를 함유한다. CD3ζ 신호전달 도메인은 T 세포 활성화에 필수적인 초기 신호를 기능적으로 전달하기에 충분한 제타 사슬의 세포질 도메인에서 유래한 아미노산 잔기를 지칭한다. 일부 구현예에서, CD3ζ 신호전달 도메인은 인간이다. 일부 구현예에서, CD3ζ 신호전달 도메인은 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0614] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 235 또는 서열 번호 245에 기재된 서열을 갖는 CD19-특이적 scFv, 서열 번호 222의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 15A의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231

의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD19 CAR을 포함하는, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예에서, CD19 CAR은 기재된 바와 같이 신호 펩티드(예를 들어, CD8α 신호 펩티드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0615] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 235 또는 서열 번호 245에 기재된 서열을 갖는 CD19-특이적 scFv, 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A의 IgG4 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD19 CAR을 포함하는, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예에서, CD19 CAR은 기재된 바와 같이 신호 펩티드(예를 들어, CD8α 신호 펩티드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0616] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 235 또는 서열 번호 245에 제시된 서열을 갖는 CD19-특이적 scFv, 서열 번호 233의 CD28 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 232의 CD28 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD19 CAR을 포함하는, CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예에서, CD19 CAR은 기재된 바와 같이 신호 펩티드(예를 들어, CD8α 신호 펩티드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0617] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 서열 번호 247에 기재된 바와 같은 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 서열 번호 247에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)하다(표 14 참조). 암호화된 CD19 CAR은 서열 번호 248에 기재된 상응하는 아미노산 서열을 갖거나, 서열 번호 248에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)하며, 다음 구성성분, 즉 CD8α 신호 펩티드, FMC63 scFv(V_L-위트로 링커-V_H), CD8α 힌지 도메인, CD8α 막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는다.

[0618] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, CD19 CAR의 시판 구현예를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. T 세포에 의해 발현 및/또는 암호화되는 CD19 CAR의 시판되는 비제한적인 예는 티사젠렉루셀, 리소캅타진 마라루셀(lisocabtagene maraleucel), 악시캅타진 실로루셀(axicabtagene ciloleucel) 및 브렉수캅타진 오토루셀(brexucabtagene autoleucel)을 포함한다.

[0619] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 티사젠렉루셀 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 티사젠렉루셀은 다음의 구성성분, 즉 CD8α 신호 펩티드, FMC63 scFv(V_L-3xG_4S 링커-V_H), CD8α 힌지 도메인, CD8α 막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 CD19 CAR을 포함한다. 티사젠렉루셀에서 CD19 CAR의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 표 14에 제공되며, 서열의 주석은 표 15에 제공된다.

[0620] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 리소캅타진 마라루셀 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 리소캅타진 마라루셀은 다음의 구성성분, 즉 GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드, FMC63 scFv(V_L-위트로 링커-V_H), IgG4 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 CD19 CAR을 포함한다. 리소캅타진 마라루셀에서 CD19 CAR의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 표 14에 제공되며, 서열의 주석은 표 16에 제공된다.

[0621] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자 악시캅타진 실로루셀 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 악시캅타진 실로루셀은 다음의 구성성분, 즉 GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드, FMC63 scFv(V_L-위트로 링커-V_H), CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 CD19 CAR을 포함한다. 악시캅타진 실로루셀에서 CD19 CAR의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 표 14에 제공되며, 서열의 주석은 표 17에 제공된다.

[0622] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 브렉수캅타진 오토루셀 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을

포함한다. 브렉수캅타진 오토루셀은 다음의 구성성분, 즉 GMCSFR-α 신호 펩티드, FMC63 scFv, CD28 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 CD19 CAR을 포함한다.

[0623] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 서열 번호 249, 서열 번호 251, 또는 서열 번호 253에 기재된 바와 같은 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 서열 번호 249, 서열 번호 251, 또는 서열 번호 253에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일하다(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일함). 암호화된 CD19 CAR은 각각 서열 번호 250, 서열 번호 252 또는 서열 번호 254에 기재된 상응하는 아미노산 서열을 갖거나, 각각 서열 번호 250, 서열 번호 252 또는 서열 번호 254에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일함).

[0624] [표 14] CD19 CAR의 예시적인 서열

[0625]

서열번호	서열	설명
247	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgc cgccaggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctct ctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaa tatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctac catacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggt ctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgcc acttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggga ccaagctggagatcacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctg gcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctgg cctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtc tcattacccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtct ggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagct ctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttctt aaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaac attattactacggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctca gtcaccgtctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggc gcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggc cagcggcgggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtga tatctacatctgggcgccctttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcact ggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattca aacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtag ctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagtt cagcaggagcgcagacgccccccgcgtaccagcagggccagaaccagct	예시적인 CD19 CAR 뉴클레오티드 서열

	ctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaag agacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaac cctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggc ctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcac gatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcc cttcacatgcaggccctgcccccctcgc	
248	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSA SLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKL LIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGK PGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRG RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR	예시적인 CD19 CAR 아미노산 서열
249	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgc cgccaggccggacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctct ctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaa tatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctac catacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggt ctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgcc acttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggga ccaagctggagatcacaggtggcggtggctcgggcggtggtgggtcgggt ggcggcggatctgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggc gccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattaccc gactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtgg ctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatc cagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatga acagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattact acggtggtagctatgctatggactactggggccaaggaacctcagtcaccgt ctcctcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccacc atcgcgtcgcagccccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggc ggggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacat ctgggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatca ccctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaacca tttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatt tccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcagga gcgcagacgcccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacga gctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtgg ccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcagga	티사젠렉루셀 CD19 CAR 뉴클레오티드 서열

[0626]

	aggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtg agattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcc tttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacat gcaggccctgcccccctcgc	
250	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSA SLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKL LIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGG GSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSG VSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYY NSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQALPPR	티사젠렉루셀 CD19 CAR 아미노산 서열
251	atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgagctgccccacccgcct ttctgctgatccccgacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgc cagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccagccaggacatc agcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagct gctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagccggtttag cggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaac aggaagatatcgccacctacttttgccagcagggcaacacactgccctacac ctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcg gcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgc aggaaagcggccctggcctggtggcccccagccagagcctgagcgtgac ctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatcc ggcagccccccaggaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcag cgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatca aggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagacc gacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagc tacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagcg aatctaagtacggaccgcccctgccccccttgccctatgttctgggtgctggtg gtggtcggaggcgtgctggcctgctacagcctgctggtcaccgtggccttca tcatcttttgggtgaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaa ccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgcc gatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgcgggtgaagttcagca gaagcgccgacgcccctgcctaccagcagggccagaatcagctgtacaac gagctgaacctgggcagaagggaagagtacgacgtcctggataagcgga gaggccgggaccctgagatgggcggcaagcctcggcggaagaacccc aggaaggcctgtataacgaactgcagaaagacaagatggccgaggcctac agcgagatcggcatgaagggcgagcggaggcggggcaaggccacga	리소캅타진 마라루셀 CD19 CAR 뉴클레오티드 서열

[0627]

	cggcctgtatcagggcctgtccaccgccaccaaggatacctacgacgcctgcacatgcaggccctgcccccaagg	
252	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	리소칵타진 마라루셀 CD19 CAR 아미노산 서열
253	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcattcctcctgatcccagacatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagtaaatatttaaattggtatcagcagaaaccagatggaactgttaaactcctgatctaccatacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtgggtctggaacagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggtaatacgcttccgtacacgttcggaggggggactaagttggaaataacaggctccacctctggatccggcaagcccggatctggcgagggatccaccaagggcgaggtgaaactgcaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccgtcacatgcactgtctcaggggtctcattacccgactatggtgtaagctggattcgccagcctccacgaaagggtctggagtggctgggagtaatatggggtagtgaaaccacatactataattcagctctcaaatccagactgaccatcatcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagtctgcaaactgatgacacagccatttactactgtgccaaacattattactacggtggtagctatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagcggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtccctatttcccggaccttctaagccctttgggtgctggtggtggttgggggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgc	악시캅타진 실로루셀 CD19 CAR 뉴클레오티드 서열

[0628]

254	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSA SLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKL LIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGK PGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTA IYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAA IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPG PSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	악시캅타진 실로루셀 CD19 CAR 아미노산 서열

[0629]

[0630] [표 15] 티사젠렉루셀 CD19 CAR 서열의 주석

특징부	뉴클레오티드 서열 위치	아미노산 서열 위치
CD8α 신호 펩티드	1-63	1-21
FMC63 scFv (V_L-3xG_4S 링커 -V_H)	64-789	22-263
CD8α 힌지 도메인	790-924	264-308
CD8α 막관통 도메인	925-996	309-332
4-1BB 공동자극 도메인	997-1122	333-374
CD3ζ 신호전달 도메인	1123-1458	375-486

[0631]

[0632] [표 16] 리소캅타진 마라루셀 CD19 CAR 서열의 주석

특징부	뉴클레오티드 서열 위치	아미노산 서열 위치
GMCSFR-α 신호 펩티드	1-66	1-22
FMC63 scFv (V_L- 위트로 링커 -V_H)	67-801	23-267
IgG4 힌지 도메인	802-837	268-279
CD28 막관통 도메인	838-921	280-307
4-1BB 공동자극 도메인	922-1047	308-349
CD3ζ 신호전달 도메인	1048-1383	350-461

[0633]

[0634] [표 17] 악시캅타진 실로루셀 CD19 CAR 서열의 주석

특징부	뉴클레오티드 서열 위치	아미노산 서열 위치
CSF2RA 신호 펩티드	1-66	1-22
FMC63 scFv (V_L- 위트로 링커 -V_H)	67-801	23-267
CD28 힌지 도메인	802-927	268-309
CD28 막관통 도메인	928-1008	310-336
CD28 공동자극 도메인	1009-1131	337-377
CD3ζ 신호전달 도메인	1132-1467	378-489

[0635]

[0636] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 서열 번호 244, 서열 번호 246, 또는 서열 번호 248에 기재된 바와 같은

CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 서열 번호 244, 서열 번호 246, 또는 서열 번호 248에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일)하다. 암호화된 CD19 CAR은 서열 번호 245, 서열 번호 247, 또는 서열 번호 249에 각각 기재된 상응하는 아미노산 서열을 갖고, 서열 번호 245, 서열 번호 247, 또는 서열 번호 249에 각각 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일함).

[0637] g. CD20 CAR

[0638] 일부 구현예에서, CAR은 CD20 CAR이고, 이런 구현예에서, 제2 이식유전자는 CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. CD20은 전-B 기 초기에 B 세포 표면상에서 발견되고, B 세포 성숙까지 점진적으로 증가되는 수준에서뿐만 아니라 대부분의 B-세포 신생물의 세포상에서 발견되는 항원이다. CD20 양성 세포는 또한 때때로 호지킨병, 골수종 및 흉선종의 사례에서 발견된다. 일부 구현예에서, CD20 CAR은 신호 펩티드, CD20에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공동자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 나란히 포함할 수 있다.

[0639] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 신호 펩티드는 CD8α 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 신호 펩티드는 서열 번호 6A에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 6A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 IgK 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, IgK 신호 펩티드는 서열 번호 7A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 7A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드는 서열 번호 8A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 8A에 제시된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0640] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD20, 예를 들어, 인간 CD20에 특이적이다. CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 작용을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다.

[0641] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, Leu16, IF5, 1.5.3, 리툭시맙, 오비누투주맙, 이브리투모맙, 오파투무맙, 토시투무맙, 오드로넥스타맙, 벨투주맙, 우블리툭시맙 및 오크렐리주맙을 포함하는 CD20에 특이적인 항체에서 유래한다. 임의의 이러한 구현예에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H, V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이들로 이루어진다.

[0642] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커에 의해 연결되는 Leu16의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 Leu16 단클론성 항체에서 유래한 scFv를 포함한다. 문헌[Wu et al., Protein Engineering. 14(12):1025-1033 (2001)] 참조. 일부 구현예에서, 링커는 $3xG_4S$ 링커이다. 다른 구현예에서, 링커는 본원에 기재된 바와 같은 위트로 링커이다. 일부 구현예에서, 전체 Leu16-유래 scFv(Leu16 scFv로도 지칭됨)의 상이한 부분의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래의 표 18에 제공된다. 일부 구현예에서, CD20-특이적 scFv는 서열 번호 255, 서열 번호 256 또는 서열 번호 260에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 255, 서열 번호 256 또는 서열 번호 260에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예컨대, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CD20-특이적 scFv는 서열 번호 257, 서열 번호 258, 서열 번호 259, 서열 번호 261 및 서열 번호 262에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD20-특이적 scFv는 서열 번호 257, 서열 번호 258, 서열 번호 259에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD20-특이적 scFv는 서열 번호 261 및 서열 번호 262에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 구현예에서, CD20-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적

어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD20 CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0643] [표 18] 항-CD20 scFv 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
255	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYM DWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPT FGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQL QQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCAR SNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS	항-CD20 Leu16 scFv 전체 서열, 위트로 링커 가짐
256	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYM DWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPT FGGGTKLEIK	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 가변 영역
257	RASSSVNYMD	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 CDR1
258	ATSNLAS	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 CDR2
259	QQWSFNPPT	항-CD20 Leu16 scFv 경쇄 CDR3
260	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTS YNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYN	항-CD20 Leu16 scFv 중쇄
	QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAD YYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS	
261	SYNMH	항-CD20 Leu16 scFv 중쇄 CDR1
262	AIYPGNGDTSYNQKFKG	항-CD20 Leu16 scFv 중쇄 CDR2

[0644]

[0645] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 힌지 도메인은 CD8α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 힌지 도메인은 서열 번호 9A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 9A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 힌지 도메인은 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지 도메인은 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0646] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 막관통 도메인은 서열 번호 15A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 15A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일함) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한

다. 일부 구현예에서, CD28 막관통 도메인은 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0647] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 세포내 공동자극 도메인은 4-1BB 공동자극 도메인, 예를 들어 인간 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 4-1BB 공동자극 도메인은 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 세포내 공동자극 도메인은 CD28 공동자극 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 공동자극 도메인은 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0648] 일부 구현예에서, CD20 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인, 예를 들어, 인간 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3ζ 신호전달 도메인은 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0649] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 255에 기재된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열 번호 9A의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 15A의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 비롯한, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0650] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 255에 기재된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열 번호 223의 CD28 힌지 도메인, 서열 번호 15A의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 비롯한, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0651] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 255에 기재된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A의 IgG4 힌지 도메인, 서열 번호 15A의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 비롯한, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0652] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 255에 기재된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열 번호 9A의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 비롯한, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0653] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 255에 기재된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열 번호 223의 CD28 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 비롯한, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0654] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 서열 번호 255에 기재된 서열을 갖는 CD20-특이적 scFv, 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A의 IgG4 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도

98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD20 CAR을 비롯한, CD20 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0655] h. CD22 CAR

[0656] 일부 구현예에서, CAR은 CD22 CAR이고, 이들 구현예에서, 제2 이식유전자는 CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 막관통 단백질인 CD22는 B 세포 수용체[BCR] 신호전달을 위한 억제 수용체로서 기능하는 성숙 B 세포 표면상에서 대부분 발견된다. CD22는 B 세포 림프종 및 백혈병(예를 들어, B-만성 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병[ALL], 및 버킷 림프종)의 60 내지 70%에서 발현되고, B 세포 발생 초기에 세포 표면상에서나 줄기 세포상에는 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, CD22 CAR은 신호 펩티드, CD22에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공동자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 나란히 포함할 수 있다.

[0657] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 신호 펩티드는 CD8α 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 신호 펩티드는 서열 번호 6A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 6A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 IgK 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, IgK 신호 펩티드는 서열 번호 7A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 7A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드는 서열 번호 8A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 8A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0658] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 CD22, 예를 들어 인간 CD22에 특이적이다. CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 기능을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다.

[0659] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 예를 들어, SM03, 이노투주맙, 에프라투주맙, 목세투모맙 및 피나투주맙을 포함하는, CD22에 특이적인 항체에서 유래한다. 임의의 이러한 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 V_H, V_L 및/또는 임의의 항체의 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0660] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 링커에 의해 연결되는 m971의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 m971 단클론성 항체(m971)에서 유래한 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 $3xG_4S$ 링커이다. 다른 구현예에서, 위트로 링커가 대신 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 전체 m971-유래 scFv(m971 scFv로도 지칭됨)의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래 표 19에 제공된다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 263, 서열 번호 264, 또는 서열 번호 268에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 263, 서열 번호 264, 또는 서열 번호 268에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 265, 서열 번호 266, 서열 번호 267, 및 서열 번호 269, 서열 번호 270, 서열 번호 271에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 265, 서열 번호 266, 서열 번호 267에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 269, 서열 번호 270, 서열 번호 271에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나 또는 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0661] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 부모 항체 m971에 비해 유의미하게 개선된(약 2 nM에서부터

50 pM 미만으로 개선됨) CD22 결합 친화도를 갖는 m971의 친화도 성숙 변이체인 m971-L7에서 유래한 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, m971-L7에서 유래한 scFv는 $3xG_4S$ 링커에 의해 연결된 m971-L7의 V_H 및 V_L을 포함한다. 다른 구현예에서, 위트로 링커가 대신 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 전체 m971-L7-유래 scFv(m971-L7 scFv로도 지칭됨)의 아미노산 서열 및 이의 상이한 부분은 아래 표 19에 제공된다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 272, 서열 번호 273, 또는 서열 번호 277에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 272, 서열 번호 273, 또는 서열 번호 277에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 274, 서열 번호 275, 또는 서열 번호 276 및 서열 번호 278, 서열 번호 279, 서열 번호 280에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 274, 서열 번호 275, 서열 번호 276에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 서열 번호 278, 서열 번호 279, 서열 번호 280에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 이들 중 임의의 구현예에서, CD22-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0662] [표 19] 항-CD22 scFv 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
263	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVP SRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYS IPQTFGQGTKLEIK	항-CD22 m971 scFv 전체 서열, 3xG4S 링커 가짐
264	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSA AWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSS	항-CD22 m971 scFv 중쇄 가변 영역
265	GDSVSSNSAA	항-CD22 m971 scFv 중쇄 CDR1
266	TYYRSKWYN	항-CD22 m971 scFv 중쇄 CDR2
267	AREVTGDLEDAFDI	항-CD22 m971 scFv 중쇄 CDR3
268	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLN WYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS GTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQG TKLEIK	항-CD22 m971 scFv 경쇄
269	QTIWSY	항-CD22 m971 scFv 경쇄 CDR1
270	AAS	항-CD22 m971 scFv 경쇄 CDR2
271	QQSYSIPQT	항-CD22 m971 scFv 경쇄 CDR3
272	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNS VAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYNDYA VSMKSRITINPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQTIWSYLNWYRQRPGEAPNLLIYAASSLQSG VPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQS YSIPQTFGQGTKLEIK	항-CD22 m971-L7 scFv 전체 서열, 3xG4S 링커

[0663]

273	QVQLQQSGPGMVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNS VAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYNDYA VSMKSRITINPDTNKNQFSLQLNSVTPEDTAVY YCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSS	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 가변 영역
274	GDSVSSNSVA	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 CDR1
275	TYYRSTWYN	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 CDR2
276	AREVTGDLEDAFDI	항-CD22 m971-L7 scFv 중쇄 CDR3
277	DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLN WYRQRPGEAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS GTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQG TKLEIK	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 가변 영역
278	QTIWSY	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 CDR1
279	AAS	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 CDR2
280	QQSYSIPQT	항-CD22 m971-L7 scFv 경쇄 CDR3

[0664]

[0665] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포외 결합 도메인은 면역독소 HA22 또는 BL22를 포함한다. 면역독소 BL22 및 HA22는 박테리아 독소에 융합된 CD22에 특이적인 scFv를 포함하는 치료제이고, 따라서 CD22를 발현하는 암세포 표면에 결합하고 암세포를 사멸시킬 수 있다. BL22는 슈도모나스 외독소 A의 38-kDa 절두된 형태에 융합된 항-CD22 항체인 RFB4의 dsFv를 포함한다(문헌[Bang et al., Clin. Cancer Res., 11:1545-50 (2005)]). HA22(CAT8015, 목세투모맙 파수도톡스)는 BL22의 돌연변이된, 보다 고친화도의 형태이다(문헌[Ho et al., J. Biol. Chem., 280(1): 607-17 (2005)]). CD22에 특이적인 HA22 및 BL22의 항원 결합 도메인의 적합한 서열은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제7,541,034호, 제7,355,012호, 및 제7,982,011호에 개시되어 있다.

[0666] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 힌지 도메인은 CD8α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 힌지 도메인은 서열 번호 9A에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 9A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 힌지 도메인은 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지 도메인은 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도

90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0667] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인, 예를 들어 CD8α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 막관통 도메인은 서열 번호 228에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 228에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 막관통 도메인은 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0668] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포내 공동자극 도메인은 4-1BB 공동자극 도메인, 예를 들어 인간 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 4-1BB 공동자극 도메인은 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 공동자극 도메인은 CD28 공동자극 도메인, 예를 들어 인간 CD28 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 공동자극 도메인은 서열 번호 232에 개시된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0669] 일부 구현예에서, CD22 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인, 예를 들어 인간 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3ζ 신호전달 도메인은 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0670] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 263 또는 서열 번호 272에 기재된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열 번호 9A의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 228의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 비롯한, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0671] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 263 또는 서열 번호 272에 기재된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열 번호 223의 CD28 힌지 도메인, 서열 번호 228의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 비롯한, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0672] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 263 또는 서열 번호 272에 기재된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A의 IgG4 힌지 도메인, 서열 번호 228의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 비롯한, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0673] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 263 또는 서열 번호 272에 기재된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열 번호 9A의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 비롯한, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0674] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 263 또는 서열 번호 272에 기재된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열 번호 223의 CD28 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 비롯한, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0675] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어 서열 번호 263 또는 서열 번호 272에 기재된 서열을 갖는 CD22-특이적 scFv, 서열 번호 12A 또는 서열 번호 13A의 IgG4 힌지 도메인, 서열 번호 229의 CD28 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일한, 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 CD22 CAR을 비롯한, CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0676] i. BCMA CAR

[0677] 일부 구현예에서, CAR은 BCMA CAR이고, 이러한 구현예에서, 제2 이식유전자는 BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. BCMA는 최종 분화된 B 세포 또는 성숙 B 림프구상에서 가장 높은 발현을 갖는 B 세포 계통의 세포상에서 발현되는 종양 괴사 족 수용체[tumor necrosis family receptor, TNFR]이다. BCMA는 장기간 체액성 면역을 유지하기 위한 형질세포의 생존을 매개하는 데 관련된다. BCMA의 발현은 최근 다수의 암, 예컨대, 다발성 골수종, 호지킨 및 비호지킨 림프종, 다양한 백혈병 및 교모세포종과 연관지어졌다. 일부 구현예에서, BCMA CAR은 신호 펩티드, BCMA에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공동자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 나란히 포함할 수 있다.

[0678] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 신호 펩티드는 CD8α 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 신호 펩티드는 서열 번호 6A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 6A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 IgK 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, IgK 신호 펩티드는 서열 번호 7A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 7A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 신호 펩티드는 GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, GMCSFR-α 또는 CSF2RA 신호 펩티드는 서열 번호 8A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 8A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0679] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 BCMA, 예를 들어, 인간 BCMA에 특이적이다. BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 숙주 세포에서 발현을 위해 코돈-최적화될 수 있거나 세포외 결합 도메인의 기능을 증가시키기 위해 변이체 서열을 갖는다.

[0680] 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 면역글로불린 분자의 면역원성으로 활성인 부분, 예를 들어, scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은, 예를 들어, 벨란타맙(belantamab), 에를라나타맙(erlanatamab), 테클리스타맙(teclistamab), LCAR-B38M 및 실타캡타진(ciltacabtagene)을 포함하는 BCMA에 특이적인 항체에서 유래한다. 임의의 이러한 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 임의의 항체의 V_H, V_L 및/또는 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0681] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)]에 기재된 바와 같은 쥣과의 단클론성 항체인 C11D5.3에서 유래한 scFv를 포함한다. 또한, PCT 출원 공개 제WO2010/104949호 참조. C11D5.3-유래 scFv는 위트로 링커에 의해 연결되는 C11D5.3의 중쇄 가변 영역(V_H) 및 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함할 수 있으며, 이의 아미노산 서열은 아래 표 20에 제공된다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 281, 서열 번호 282, 또는 서열 번호 286에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 281, 서열 번호 282, 또는 서열 번호 286에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도

99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 283, 서열 번호 284, 서열 번호 285 및 서열 번호 287, 서열 번호 288, 서열 번호 289에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 283, 서열 번호 284, 서열 번호 285에 개시된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 287, 서열 번호 288, 서열 번호 289에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 구현예에서, BCMA-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0682] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Carpenter et al., Clin. Cancer Res. 19(8):2048-2060 (2013)] 및 PCT 출원 공개 제WO2010/104949호에 기재된 바와 같이 또 다른 쥣과의 단클론성 항체인 C12A3.2에서 유래한 scFv를 포함하며, 이의 아미노산 서열은 또한 아래 표 20에 제공된다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 290, 서열 번호 291, 또는 서열 번호 295에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 290, 서열 번호 291, 또는 서열 번호 295에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 292, 서열 번호 293, 서열 번호 294 및 서열 번호 296, 서열 번호 297, 서열 번호 298에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 292, 서열 번호 293, 서열 번호 294에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 296, 서열 번호 297, 서열 번호 298에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 구현예에서, BCMA-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0683] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 인간 BCMA에 대해 높은 특이성을 갖는 쥣과의 단일클론 항체를 포함하며, 이는 문헌[Friedman et al., Hum. Gene Ther. 29(5):585-601 (2018)]에서 BB2121로 지칭된다. 또한, PCT 출원 공개 제WO2012163805호 참조.

[0684] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Zhao et al., J. Hematol. Oncol. 11(1):141 (2018)]에 기재된 바와 같은 BCMA의 두 개의 에피토프에 결합할 수 있는 두 개의 중쇄(VHH)의 단일 가변 단편을 포함하며, LCAR-B38M으로도 지칭된다. 또한, PCT 출원 공개 제WO2018/028647호 참조.

[0685] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 문헌[Lam et al., Nat. Commun. 11(1):283 (2020)]에 기재된 바와 같은 완전 인간 중쇄 가변 도메인[FHVH]을 포함하며, FHVH33으로도 지칭된다. 또한, PCT 출원 공개 제WO2019/006072호 참조. FHVH33 및 이의 CDR의 아미노산 서열은 아래 표 20에 제공된다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 299에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 299에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 300, 서열 번호 301, 서열 번호 302에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 임의의 이러한 구현예 중에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 80% 이상 동일한(예컨대, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0686] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 미국 특허 제11,026,975 B2호에 기재된 바와 같이 CT103A(또는 CAR0085)에서 유래한 scFv를 포함하며, 이의 아미노산 서열은 아래 표 20에 제공된다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 303, 서열 번호 304 또는 서열 번호 308에 기재된 아미노산 서열

또는 서열 번호 303, 서열 번호 304 또는 서열 번호 308에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 305, 서열 번호 306, 서열 번호 307 및 서열 번호 309, 서열 번호 310, 서열 번호 311에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 305, 서열 번호 306, 서열 번호 307에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA-특이적 세포외 결합 도메인은 서열 번호 309, 서열 번호 310, 서열 번호 311에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄를 포함할 수 있다. 임의의 이러한 구현예에서, BCMA-특이적 scFv는 확인된 임의의 서열에 대해, 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 80% 이상 동일한(예컨대, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100% 동일한) 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포외 결합 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0687] 추가적으로, CAR 및 BCMA에 지정된 결합자는 미국 특허 출원 공개 제2020/0246381 A1호 및 제2020/0339699 A1호에 기재되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0688] [표 20] 항-BCMA 결합자 및 구성성분의 예시적인 서열

서열번호	아미노산 서열	설명
281	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGA HLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFS GSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRT FGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLV QSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVK RAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFA FSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSY AMDYWGQGTSVTVSS	항-BCMA C11D5.3 scFv 전체 서열 위트로 링커 가짐
282	DIVLTQSPASLAMSLGKRATISCRASESVSVIGA HLIHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLETGVPARFS GSGSGTDFTLTIDPVEEDDVAIYSCLQSRIFPRT FGGGTKLEIK	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 가변 영역
283	RASESVSVIGAHLIH	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 CDR1
284	LASNLET	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 CDR2
285	LQSRIFPRT	항-BCMA C11D5.3 scFv 경쇄 CDR3
286	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSI NWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDF RGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCA LDYSYAMDYWGQGTSVTVSS	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 가변 영역
287	DYSIN	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 CDR1
288	WINTETREPAYAYDFRG	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 CDR2
289	DYSYAMDY	항-BCMA C11D5.3 scFv 중쇄 CDR3

[0689]

290	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGS HLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFS GSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPR TFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQL VQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNW VKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDFKGRF AFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYL YSLDFWGQGTALTVSS	항-BCMA C12A3.2 scFv 전체 서열 위트로 링커 가짐
291	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGS HLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFS GSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPR TFGGGTKLEIK	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 가변 영역
292	RASESVTILGSHLIY	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 CDR1
293	LASNVQT	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 CDR2
294	LQSRTIPRT	항-BCMA C12A3.2 scFv 경쇄 CDR3
295	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYS MNWVKQAPGKGLKWMGRINTESGVPIYADDF KGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCS NDYLYSLDFWGQGTALTVSS	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 가변 영역
296	HYSMN	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 CDR1
297	RINTESGVPIYADDFKG	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 CDR2
298	DYLYSLDF	항-BCMA C12A3.2 scFv 중쇄 CDR3
299	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYIYYADSV KGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKEGTGANSSLADYRGQGTLVTVSS	항-BCMA FHVH33 전체 서열
300	GFTFSSYA	항 -BCMA FHVH33 CDR1
301	ISGSGDYI	항 -BCMA FHVH33 CDR2
302	AKEGTGANSSLADY	항 -BCMA FHVH33 CDR3
303	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGG	항-BCMA CT103A scFv 전체 서열 위트로 링커 가짐

[0690]

	TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQLQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQP PGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRGDTILDV WGQGTMVTVSS	
304	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKYDLLTFGGG TKVEIK	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 가변 영역
305	QSISSY	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 CDR1
306	AAS	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 CDR2
307	QQKYDLLT	항-BCMA CT103A scFv 경쇄 CDR3
308	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSY YWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR DRGDTILDVWGQGTMVTVSS	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 가변 영역
309	GGSISSSSYY	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 CDR1
310	ISYSGST	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 CDR2
311	ARDRGDTILDV	항-BCMA CT103A scFv 중쇄 CDR3

[0691]

[0692] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 힌지 도메인은 CD8α 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 힌지 도메인은 서열 번호 9A에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 9A에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 힌지 도메인은 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 223에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지 도메인은 서열 번호 225 또는 서열 번호 226에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 225 또는 서열 번호 226에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 힌지 도메인은 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인, 예를 들어, 인간 IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, IgG4 힌지-Ch2-Ch3 도메인은 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 227에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0693] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD8α 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD8α 막관통 도메인은 서열 번호 228에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 228에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 막관통 도메인은 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 229에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어

도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0694] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포내 공동자극 도메인은 4-1BB 공동자극 도메인, 예를 들어 인간 4-1BB 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 4-1BB 공동자극 도메인은 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 231에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, 세포내 공동자극 도메인은 CD28 공동자극 도메인, 예를 들어, 인간 CD28 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD28 공동자극 도메인은 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 232에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0695] 일부 구현예에서, BCMA CAR의 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타(ζ) 신호전달 도메인, 예를 들어, 인간 CD3ζ 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3ζ 신호전달 도메인은 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 233에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한) 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0696] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 기재된 바와 같은 임의의 BCMA-특이적 세포외 결합 도메인, 서열 번호 9A의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 228의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 231의 4-1BB 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 BCMA CAR를 비롯한, BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예에서, BCMA CAR은 기재된 바와 같이 신호 펩티드(예를 들어, CD8α 신호 펩티드)를 추가로 포함할 수 있다.

[0697] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 기재된 바와 같은 임의의 BCMA-특이적 세포외 결합 도메인, 서열 번호 9A의 CD8α 힌지 도메인, 서열 번호 228의 CD8α 막관통 도메인, 서열 번호 232의 CD28 공동자극 도메인, 서열 번호 233의 CD3ζ 신호전달 도메인, 및/또는 이들의 변이체(즉, 개시된 서열과 적어도 80% 동일, 예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99 동일한 서열을 가짐)를 포함하는 BCMA CAR을 비롯한, BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예에서, BCMA CAR은 기재된 바와 같은 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0698] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 서열 번호 312에 기재된 BCMA CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 서열 번호 312에 기재된 뉴클레오티드 서열과 적어도 80% 동일하다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일함)(표 21 참조). 암호화된 BCMA CAR은 서열 번호 313에 기재된 상응하는 아미노산 서열을 갖거나, 서열 번호 313에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 동일하며(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일), 다음 구성성분, 즉 CD8α 신호 펩티드, CT103A scFv(V_L-위트로 링커-V_H), CD8α 힌지 도메인, CD8α 막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는다.

[0699] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는, 예를 들어, 이데캅타진 비클루셀[ide-cel(idecabtagene vicleucel), bb2121로도 명명됨]을 포함하는, BCMA CAR의 시판 구현예를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 이데캅타진 비클루셀 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이데캅타진 비클루셀은 다음 구성성분, 즉 BB2121 결합자, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막관통 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는, BCMA CAR를 포함한다.

[0700] [표 21] BCMA CAR의 예시적인 서열

서열번호	서열	설명
312	atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacg ccgccaggccggacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagc agctatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctg atctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggca gtggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagtctgcaacctgaaga ttttgcaacttactactgtcagcaaaaatacgacctcctcacttttggcggag ggaccaaggttgagatcaaaggcagcaccagcggctccggcaagcctg gctctggcgagggcagcacaaagggacagctgcagctgcaggagtcgg gcccaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcactgtct ctggtggctccatcagcagtagtagttactactggggctggatccgccagc ccccagggaaggggctggagtggattgggagtatctcctatagtgggagc acctactacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatccgtagacacg tccaagaaccagttctccctgaagctgagttctgtgaccgccgcagacacg gcggtgtactactgcgccagagatcgtggagacaccatactagacgtatg gggtcagggtacaatggtcaccgtcagctcattcgtgcccgtgttcctgccc gccaaacctaccaccaccccctgcccctagacctcccaccccagccccaac aatcgccagccagcctctgtctctgcggcccgaagcctgtagacctgctgc cggcggagccgtgcacaccagaggcctggacttcgcctgcgacatctac atctgggcccctctggccggcacctgtggcgtgctgctgctgagcctggtg atcaccctgtactgcaaccaccggaacaaacggggcagaaagaaactcct	예시적인 BCMA CAR 뉴클레오티드 서열
	gtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaa gatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaact gagagtgaagttcagcagatccgccgacgcccctgcctaccagcaggga cagaaccagctgtacaacgagctgaacctgggcagacgggaagagtacg acgtgctggacaagcggagaggccgggaccccgagatgggcggaaag cccagacggaagaacccccaggaaggcctgtataacgaactgcagaaag acaagatggccgaggcctacagcgagatcggcatgaagggcgagcgga ggcgcggcaagggccacgatggcctgtaccagggcctgagcaccgcca ccaaggacacctacgacgcccctgcacatgcaggccctgcccccaga	
313	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQKYDLLTFGGGTKVEIKGSTSGSG KPGSGEGSTKGQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCT VSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSISYSG STYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARDRGDTILDVWGQGTMVTVSSFVPV FLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCNHRNKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	예시적인 BCMA CAR 아미노산 서열

[0701]

[0702]

[0703] j. 다중 CAR

[0704] 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 특이적 표적 항원을 표적화하는 CAR을 각각 암호화하는 둘 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이들 구현예에서, 제2 이식유전자는 상이한 표적 항원에 특이적인 둘 이상의 상이한 CAR(예를 들어, CD19 CAR 및 CD22 CAR)을 암호화한다. 둘 이상의 CAR은 특정 표적 항원에 특이적인 세포외 결합 도메인을 각각 포함할 수 있고, 동일하거나 하나 이상의 상이한 비-항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 예를

들어, 둘 이상의 CAR은 서열 유사성으로 인한 재조합 위험을 최소화하기 위해, 상이한 신호 펩티드, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 공동자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 또는, 대안적으로, 둘 이상의 CAR은 동일한 비-항원 결합 도메인을 포함할 수 있다. 동일한 비-항원 결합 도메인(들) 및/또는 골격이 사용되는 경우에, 재조합 위험을 최소화하기 위해 뉴클레오티드 서열 수준에서 코돈 확산[codon divergence]을 도입하는 것은 선택적이다. 하나의 비제한적인 예로서, 제2 이식유전자는 CD19 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 CD22 CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. CD19 CAR은 하나의 막관통 도메인(예를 들어, CD28 막관통 도메인)을 포함할 수 있는 한편, CD22 CAR은 상이한 막관통 도메인(예를 들어, CD8α 막관통 도메인)을 포함하며, 이 반대의 경우도 가능하다. 또 다른 비제한적 예로서, CD19 CAR은 한 개의 공동자극 도메인(예를 들어, 4-1BB 공동자극 도메인)을 포함할 수 있는 한편, CD22 CAR은 상이한 공동자극 도메인(예를 들어, CD28 공동자극 도메인)을 포함하며, 이 반대의 경우도 가능하다. 또는 대안적으로, CD22 CAR 및 CD19 CAR은 동일한 비-항원 결합 도메인을 포함할 수 있지만, 재조합 위험을 최소화하기 위해 뉴클레오티드 서열 수준에서 도입된 코돈 확산을 갖는다. 임의의 이러한 구현예에서, 제2 이식유전자의 둘 이상의 뉴클레오티드 서열은, 본원에 기재된 바와 같은 다중시스트론성 작제물 형태로, 기재된 바와 같은 하나 이상의 절단 부위(예를 들어, 2A 부위 및/또는 푸린 부위)에 의해 연결될 수 있다.

[0705] 3. 조절 요소

[0706] 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 제2 이식유전자는, 예를 들어 프로모터, 절연체, 인핸서, 폴리아데닐화(폴리(A)) 꼬리, 및/또는 편재성[ubiquitous] 염색질 개방 요소를 포함하는, 기재된 바와 같은 CAR 암호화 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 추가의 조절 요소를 포함할 수 있다.

[0707] 4. 유전체 삽입

[0708] 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 제2 이식유전자는 숙주 유전체 내로의 삽입을 위해 벡터의 형태로 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 삽입은 본원에 기재된 임의의 무작위[random] 또는 부위-유도 삽입 방법을 사용하여, 무작위화(즉, 숙주 세포의 무작위 유전체 좌위 내로 삽입) 또는 표적화(즉, 숙주 세포의 특정 유전체 좌위 내로 삽입)될 수 있다.

[0709] 일부 구현예에서, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자는 유전체 삽입을 위해 숙주 내로 별도로 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자는 단일 벡터 또는 다중 벡터를 통해 유전체 삽입을 위한 숙주 내로 동시에 도입될 수 있다. 제1 및 제2 이식유전자가 단일 벡터에서 함께 숙주 세포 내로 전달되는 경우에, 제1 및 제2 이식유전자는 아래 기재된 바와 같이 다중시스트론성 작제물로서 설계될 수 있다.

[0710] 5. 다중시스트론성 작제물

[0711] 일부 구현예에서, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자, 및/또는 제2 이식유전자의 서열을 암호화하는 다수의 CAR은 다중시스트론성 작제물의 형태일 수 있다. 다중시스트론성 벡터는 숙주 세포에서 관심 대상의 둘 이상의 단백질의 공동 발현을 위해 둘 이상의 발현 카세트를 갖는다. 일부 구현예에서, 다중시스트론성 작제물은 두 개의 발현 카세트를 포함하는, 즉, 이중시스트론성이다. 일부 구현예에서, 다중시스트론성 작제물은 세 개의 발현 카세트를 포함하는, 즉, 삼중시스트론성이다. 일부 구현예에서, 다중시스트론성 작제물은 네 개의 발현 카세트를 포함하는, 즉, 사중시스트론성이다. 일부 구현예에서, 다중시스트론성 작제물은 네 개 초과의 발현 카세트를 포함한다. 임의의 이러한 구현예에서, 발현 카세트 각각은 관심 단백질(예를 들어, 관용원성 또는 CAR)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 발현되는 둘 이상의 유전자는 단일 프로모터의 제어하에 있으며, 하나의 전사체에서부터 관심 단백질의 공동 발현을 달성하기 위해 하나 이상 절단 부위에 의해 서로 분리된다. 다른 구현예에서, 둘 이상의 유전자는 별개의 프로모터의 제어하에 있을 수 있다.

[0712] 일부 구현예에서, 다중시스트론성 작제물의 둘 이상의 발현 카세트는 하나 이상의 절단 부위에 의해 분리될 수 있다. 명칭이 시사하는 바와 같이, 다중시스트론성 작제물은 숙주 세포에서, 하나의 mRNA 전사체에서부터 둘 이상의 별개의 단백질의 동시 발현을 가능하게 한다. 절단 부위는 다수의 유전자의 이러한 공동 발현을 달성하기 위해 다중시스트론성 작제물의 설계에 사용될 수 있다.

[0713] 일부 구현예에서, 하나 이상의 절단 부위는 하나 이상의 자기-절단 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 자기-절단 부위는 2A 부위를 포함한다. 2A 펩티드는 피코르나바이러스에서 처음 발견된 18 내지 22개 아미노산 길이의 펩티드 부류이고, 단백질의 번역 동안 리보솜 스키핑(ribosome skipping)을 유도하여, 이에 따라 동일한 mRNA

전사체에서 동일한 양의 다수의 유전자를 생성할 수 있다. 2A 펩티드는, 리보솜이 글리신(G)과 프롤린(P) 잔기 사이의 C-말단에서 펩티드 결합의 합성을 건너뛰게 함으로써, mRNA 전사체를 '절단'하는 기능을 하여, 2A 서열의 단부와 그 다음 펩티드 하류 사이의 분리를 발생시킨다. 분자 생물학에서 통상적으로 사용되는 네 개의 2A 펩티드, 즉, T2A, P2A, E2A 및 F2A가 있으며, 이들의 서열은 표 22에 요약하였다. 글리신-세린-글리신(GSG) 링커는 절단 효율을 증가시키기 위해 2A 펩티드의 N-말단에 임의적으로 첨가된다. 본 개시내용의 서열 주변에서 '()'의 사용은 괄호 안의 서열이 임의적임을 의미한다.

[0714] [표 22] 2A 펩티드의 서열

[0715]

서열번호	아미노산 서열	2A 펩티드
314	(GSG) EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
315	(GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
316	(GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
317	(GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A

[0716] 일부 구현예에서, 하나 이상의 절단 부위는 하나 이상의 단백질분해효소 부위를 추가로 포함한다. 하나 이상의 단백질분해효소 부위는 5'에서 3' 순서로 자기-절단 부위(예를 들어, 2A 부위)에 선행하거나 뒤에 올 수 있다. 단백질분해효소 부위는, 제1 발현 산물이 다음 발현 카세트의 번역 전에 방출되도록 전체 전사체의 번역 후에 또는 각각의 발현 카세트의 번역 후에 단백질분해효소에 의해 절단될 수 있다. 이들 구현예에서, 2A 부위에 추가로 단백질분해효소 부위를 갖는 것, 특히 5'에서 3' 순서로 2A 부위에 선행하는 것은 관심의 발현된 단백질에 부착된 여분의 아미노산 잔기의 수를 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소 부위는 짝지어진 염기성 아미노산 절단 효소[Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme, PACE] 부위로도 알려진 푸린 부위를 포함한다. 적어도 세 개의 푸린 절단 서열, 즉, FC1, FC2 및 FC3가 있으며, 이의 아미노산 서열은 표 23에 요약하였다. 2A 부위와 유사하게, 절단 효율을 위해 하나 이상의 임의적인 글리신-세린-글리신(GSG) 서열이 포함될 수 있다.

[0717] [표 23] 푸린 부위의 서열

[0718]

서열번호	아미노산 서열	푸린 부위
318	RRRR (GSG)	FC1
319	RKRR (GSG)	FC2
320	RKRR (GSG) TPDPW (GSG)	FC3

[0719] 일부 구현예에서, 하나 이상의 절단 부위는 하나 이상의 자기-절단 부위, 하나 이상의 단백질분해효소 부위 및/또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, 절단 부위는 2A 부위를 단독으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 절단 부위는 FC2 또는 FC3 부위, 이어서 2A 부위를 포함할 수 있다. 이들 구현예에서, 하나 이상의 자기-절단 부위는 동일하거나 상이할 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 단백질분해효소 부위는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0720] 일부 구현예에서, 다중시스트론성 작제물은 벡터의 형태일 수 있다. 예를 들어, 플라스미드, 아데노바이러스 벡터, 아데노바이러스-연관 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 파지 및 상동성 유도 복구[HDR]-기반 공여자 벡터를 비롯한, 숙주 세포에 뉴클레오티드 서열을 도입하는 데 적합한 임의의 유형의 벡터가 사용될 수 있다.

[0721] 6. 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가(예를 들어, 과발현)시키는 방법

[0722] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 증가된 발현은 임의의 다양한 기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 유전자 및 인자 (단백질)의 발현을 조정하는 방법은 유전체 편집 기술, 및 RNA 또는 단백질 발현 기술 등을 포함한다. 이러한 모든 기술에 대해, 주지의 재조합 기술이 사용되어, 본원에 약술된 바와 같은 재조합 핵산을 생성한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 과발현 또는 증가된 발현을 위한 하나 이상의 변형으로 조작된 세포는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 공급원 세포이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 섹션 II.C에 기재된 임의의 세포이다.

[0723] 일부 구현예에서, 유전자의 발현은 내인성 유전자 활성을 증가시킴으로써(예를 들어, 외인성 유전자의 전사를 증가시킴으로써) 증가된다. 일부 경우에서, 내인성 유전자 활성은 내인성 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 프로모터 또는 인핸서의 활성을 증가시킴으로써 증가된다. 일부 구현예에서, 프로모터 또는 인핸서의 활성을 증

가시키는 것은 내인성 프로모터 또는 인핸서의 활성을 증가시키는 내인성 프로모터 또는 인핸서에 대한 하나 이상의 변형을 만드는 것을 포함한다. 일부 경우에서, 내인성 유전자의 유전자 활성을 증가시키는 것은 유전자의 내인성 프로모터를 변형시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 내인성 유전자의 유전자 활성을 증가시키는 것은 이종 프로모터를 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 프로모터는 CAG 프로모터, 거대세포바이러스[CMV] 프로모터, EF1a 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[Epstein-Barr virus, EBV] 프로모터, 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터 및 UBC 프로모터로 이루어진 군에서 선택된다.

[0724] 일부 구현예에서, 표적 유전자(예를 들어, CD47, 또는 또 다른 관용원성 인자)의 발현은 (1) 내인성 CD47에 특이적인 부위-특이적 결합 도메인, 또는 다른 유전자 및 (2) 전사 활성자를 함유하는 융합 단백질 또는 단백질 복합체의 발현에 의해 증가된다.

[0725] 일부 구현예에서, 조절 인자는 부위-특이적 DNA-결합 핵산 분자, 예컨대 안내 RNA[gRNA]로 구성된다. 일부 구현예에서, 방법은 아연 집게 단백질[ZFP] 또는 아연 집게 핵산분해효소[ZFN]로도 알려져 있는, ZFP를 함유하는 융합 단백질과 같은, 부위 특이적 DNA-결합 표적화 단백질에 의해 달성된다.

[0726] 일부 구현예에서, 조절 인자는 표적 영역에서 유전자에 특이적으로 결합하거나 그에 혼성화하는, DNA 결합 단백질 또는 DNA-결합 핵산을 사용하는 것과 같은 부위-특이적 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 부위-특이적 핵산분해효소, 예컨대 변형된 핵산분해효소에 연결되거나 이와 복합체를 형성한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 투여는 변형된 핵산분해효소, 예컨대 메가핵산분해효소 또는 RNA-안내 핵산분해효소, 예컨대 군집화된 규칙적으로 산재된 짧은 회문 핵산 (CRISPR)-Cas 시스템, 예컨대 CRISPR-Cas9 시스템의 DNA-표적화 단백질을 포함하는 융합체를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 핵산분해효소는 핵산분해효소 활성을 결여하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 변형된 핵산분해효소는 촉매적으로 사멸된 dCas9이다.

[0727] 일부 구현예에서, 부위-특이적 결합 도메인은 핵산분해효소로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 귀소 핵산내부분해효소 및 메가핵산분해효소의 인식 서열, 예컨대, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII. 또한, 미국 특허 번호 제5,420,032호, 미국 특허 번호 제6,833,252호, 문헌[Belfort et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al., (1989) Gene 82:115-118; Perler et al, (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180; Argast et al, (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 및 New England Biolabs 카탈로그] 참조. 추가로, 귀소 핵산내부분해효소 및 메가핵산분해효소의 DNA-결합 특이성은 비-자연 발생 표적 부위에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Chevalier et al, (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al, (2003) Nucleic Acids Res. 31 :2952-2962; Ashworth et al, (2006) Nature 441 :656-659; Paques et al, (2007) Current Gene Therapy 7:49-66], 미국 특허 공개 번호 제2007/0117128호 참조.

[0728] 아연 집게, TALE 및 CRISPR 시스템 결합 도메인은 예를 들어, 자연 발생 아연 집게 또는 TALE 단백질의 인식 나선 영역의 조작(하나 이상의 아미노산을 변경시킴)을 통해, 예정된 뉴클레오티드 서열에 결합하도록 '조작'될 수 있다. 조작된 DNA 결합 단백질(아연 집게 또는 TALE)은 자연 발생하지 않는 단백질이다. 합리적인 설계 기준은 기존 ZFP 및/또는 TALE 설계와 결합 데이터에 관한 정보를 저장하는 데이터베이스에서 정보 처리를 위한 치환 규칙 및 컴퓨터화 알고리즘의 적용을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제6,140,081호, 제6,453,242호, 및 제6,534,261호 참조, 또한 제WO 98/53058호, 제WO 98/53059호, 제WO 98/53060호, 제WO 02/016536호 및 제WO 03/016496호 및 미국 공개 번호 제20110301073호 참조.

[0729] 일부 구현예에서, 부위-특이적 결합 도메인은 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 하나 이상의 아연 집게 단백질[ZFP] 또는 그의 도메인을 포함한다. ZFP 또는 이의 도메인은, 구조가 아연 이온의 배위를 통해 안정화되는 결합 도메인 내의 아미노산 서열의 영역인, 하나 이상의 아연 집게를 통해 서열-특이적 방식으로 DNA를 결합시키는, 단백질 또는 더 큰 단백질 내의 도메인이다.

[0730] ZFP 중에는 개별 핑거의 조립에 의해 생성된, 전형적으로 9-18개 뉴클레오티드 길이의 특정 DNA 서열을 표적화하는 인공 ZFP 도메인이 있다. ZFP는 단일 핑거 도메인이 길이가 대략 30개의 아미노산이고 단일 베타 회전의 두 개의 시스테인과 아연을 통해 배위된 두 개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하고, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 핑거를 갖는 알파 나선을 함유하는 것을 포함한다. 일반적으로, ZFP의 서열-특이성은 아연

집게 인식 나선상의 네 개의 나선 위치(-1, 2, 3 및 6)에서 아미노산 치환을 만듦으로써 변경될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, ZFP 또는 ZFP-함유 분자는 비-자연 발생적으로 발생하며, 예를 들어, 선택된 표적 부위에 결합하도록 조작된다. 예를 들어, 문헌[Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; 미국 특허 번호 제6,453,242호, 제6,534,261호, 제6,599,692호, 제6,503,717호, 제6,689,558호, 제7,030,215호, 제6,794,136호, 제7,067,317호, 제7,262,054호, 제7,070,934호, 제7,361,635호, 제7,253,273호, 및 미국 특허 공개 번호 제2005/0064474호, 제2007/0218528호, 제2005/0267061호를 참조하며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0731] 많은 유전자-특이적 조작된 아연 집게는 시판된다. 예를 들어, Sangamo Biosciences(Richmond, CA, USA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)와 협력하여, 연구자들이 아연 집게 구성 및 검증을 모두 우회하는 것을 가능하게 하는, 아연 집게 구성을 위한 플랫폼(CompoZr)을 개발하여, 수천 개의 단백질에 대해 특이적으로 표적화된 아연 집게를 제공한다(문헌[Gaj et al., Trends in Biotechnology, 2013, 31(7), 397-405]). 일부 구현예에서, 시판되는 아연 집게가 사용되거나 맞춤 설계된다.

[0732] 일부 구현예에서, 부위-특이적 결합 도메인은 전사 활성자-유사 단백질 효과기[TALE] 단백질과 같은, 자연 발생 또는 조작된(비-자연 발생) 전사 활성자-유사 단백질[TAL] DNA 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 제20110301073호를 참조하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0733] 일부 구현예에서, 부위-특이적 결합 도메인은 CRISPR/Cas 시스템에서 유래한다. 일반적으로, 'CRISPR 시스템'은 Cas 유전자를 암호화하는 서열, tracr(트랜스-활성화 CRISPR) 서열(예를 들어, tracrRNA 또는 활성 부분적 tracrRNA), tracr-메이트 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 '직접 반복물' 및 tracrRNA-처리된 부분 직접 반복물을 포함), 안내 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 '스페이서' 또는 '표적화 서열'로도 지칭됨) 및/또는 CRISPR 좌위에서부터의 기타 서열 및 전사물을 비롯한, CRISPR-연관된 ('Cas') 유전자의 발현에 관련된 또는 이의 활성을 지시하는 전사물 및 기타 요소를 총체적으로 지칭한다.

[0734] 일반적으로, 안내 서열은, 표적 서열과 혼성화하고 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열 특이적 결합을 지시하기 위해, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과 충분한 상보성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 안내 서열과 그의 상응하는 표적 서열 사이의 상보성의 정도는, 적합한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬되는 경우, 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상이다. 일부 예에서, gRNA의 표적화 도메인(예를 들어, 표적화 서열)은 표적 핵산 상의 표적 서열에 상보적, 예를 들어, 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 상보적, 예를 들어, 완전히 상보적이다.

[0735] 일부 구현예에서, gRNA는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 것일 수 있다. 구현예에서, gRNA는 서열 번호 200784-231885(제WO2016183041호의 표 29, 부록 22) 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 CD47의 표적 부위에 상보적인 표적화 서열, 서열 번호 189859-193183(제WO2016183041호의 표 19, 부록 12) 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 HLA-E, 서열 번호 688808-699754(제WO2016183041호의 표 45, 부록 38) 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 HLA-F; 서열 번호 188372-189858(제WO2016183041호의 표 18, 부록 11)중 어느 하나에 기재된 바와 같은 HLA-G; 또는 서열 번호 193184-200783(제WO2016183041의 표 21, 부록 14) 중 어느 하나에 기재된 바와 같은 PD-L1을 갖는다.

[0736] 일부 구현예에서, 표적 부위는 표적 유전자의 전사 개시 부위의 상류에 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 유전자의 전사 개시 부위에 인접한다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 유전자의 전사 개시 부위의 하류에 있는 RNA 중합효소 휴지[pause] 부위에 인접한다.

[0737] 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 전사 개시, 하나 이상의 전사 인핸서 또는 활성자의 결합, 및/또는 RNA 중합효소를 촉진하기 위해 표적 유전자의 프로모터 영역을 표적화하도록 구성된다. 하나 이상의 gRNA는 유전자의 프로모터 영역을 표적화하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자의 하나 이상의 영역이 표적화될 수 있다. 특정 구현예에서, 표적 부위는 유전자의 전사 시작 부위[transcription start site, TSS]의 어느 한 쪽에서 600개 염기쌍 이내에 있다.

[0738] 프로모터 및 활성자를 포함하는 조절 영역의 서열 및 엑손 서열을 포함하는, 유전자를 표적화하는 서열이거나 이를 포함하는 gRNA 서열을 설계하거나 확인하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. CRISPR 유전체 편집을 위한 유전체 전범위의 gRNA 데이터베이스가 공개적으로 이용 가능하며, 이는 인간 유전체 또는 마우스 유전체 내의 유

전자의 구성적 엑손 내의 예시적인 단일 안내 RNA[sgRNA] 표적 서열을 함유한다(예를 들어, genescript.com/gRNA-database.html, 또한, 문헌[Sanjana et al. (2014) Nat. Methods, 11:783-4], www.e-crisp.org/E-CRISP/, crispr.mit.edu/ 참조). 일부 구현예에서, gRNA 서열은 비-표적 유전자에 대한 최소한의 표적이탈 결합을 갖는 표적화 서열이거나 이를 포함한다.

[0739] 일부 구현예에서, 조절 인자는 기능적 도메인, 예를 들어, 전사 활성자를 더 포함한다.

[0740] 일부 구현예에서, 전사 활성자는 표적 유전자의 하나 이상의 전사 제어 요소와 같은 하나 이상의 조절 요소이거나 이를 함유하며, 이로써 상기 제공된 바와 같은 부위-특이적 도메인은 이러한 유전자의 발현을 유도하는 것으로 인식된다. 일부 구현예에서, 전사 활성자는 표적 유전자의 발현을 유도한다. 일부 경우에서, 전사 활성자는 이종성 전사활성화 도메인의 전부 또는 일부일 수 있거나 이를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 전사 활성자는 단순 헤르페스 유래 전사활성화 도메인, Dnmt3a 메틸기전달효소 도메인, p65, VP16, 및 VP64에서 선택된다.

[0741] 일부 구현예에서, 조절 인자는 아연 집게 전사 인자[zinc finger transcription factor, ZF-TF]이다. 일부 구현예에서, 조절 인자는 VP64-p65-Rta (VPR)이다.

[0742] 특정 구현예에서, 조절 인자는 전사 조절 도메인을 더 포함한다. 공통 도메인은, 예를 들어, 전사 인자 도메인(활성자, 억제인자, 공동-활성자, 공동-억제인자), 사일런서[silencer], 발암유전자(예컨대, myc, jun, fos, myb, max, mad, rel, ets, bcl, myb, mos 족, 등), DNA 복구 효소 및 이들의 연관된 인자 및 변경자, DNA 재배열 효소 및 이들의 연관된 인자 및 변경자, 염색질 회합된 단백질 및 이들의 변형자(예컨대, 키나제, 아세틸화효소 및 탈아세틸화효소), 및 DNA 변형 효소(예컨대, DNMT 족의 구성원과 같은 메틸기전달효소 (예컨대, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L 등, 국소이성질화효소, 나선효소, 리가제, 키나제, 인산염분해효소, 중합효소, 핵산내부분해효소) 및 이들의 연관된 인자 및 변형자를 포함한다. 예를 들어, 미국 공개 번호 2013/0253040을 참조하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0743] 활성화를 달성하기 위한 적합한 도메인은, HSV VP 16 활성화 도메인(문헌[Hagmann et al, J. Virol. 71, 5952-5962 (1 97)]참조) 핵 호르몬 수용체(예를 들어, 문헌[Torchia et al., Curr. Opin. Cell. Biol. 10:373-383 (1998)] 참조); 핵 인자 카파 B의 p65 소단위 (문헌[Bitko & Bank, J. Virol. 72:5610-5618 (1998) 및 Doyle & Hunt, Neuroreport 8:2937-2942 (1997)]; Liu et al., Cancer Gene Ther. 5:3-28 (1998)]), 또는 인공 키메라 기능적 도메인, 예컨대, VP64 (문헌[Beerli 등, (1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14623-33]), 및 데그론(degron) (문헌[Molinari 등, (1999) EMBO J. 18, 6439-6447])을 포함한다. 추가의 예시적인 활성화 도메인은, Oct 1, Oct-2A, Spl, AP-2 및 CTF1(문헌[Seipel etal, EMBOJ. 11, 4961-4968 (1992)])뿐만 아니라, p300, CBP, PCAF, SRC1 PvALF, AtHD2A 및 ERF-2를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Robyr et al, (2000) Mol. Endocrinol. 14:329-347; Collingwood et al, (1999) J. Mol. Endocrinol 23:255-275; Leo et al, (2000) Gene 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) Acta Biochim. Pol. 46:77-89; McKenna et al, (1999) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69:3-12; Malik et al, (2000) Trends Biochem. Sci. 25:277-283; 및 Lemon et al, (1999) Curr. Opin. Genet. Dev. 9:499-504] 참조. 추가의 예시적인 활성화 도메인은 OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5,-6,-7 및 -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, 그리고 TRAB1을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Ogawa et al. (2000) Gene 245:21-29; Okanami et al. (1996) Genes Cells 1:87-99; Goff et al. (1991) Genes Dev. 5:298-309; Cho et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40:419-429; Ulmason et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5844-5849; Sprenger-Haussels et al. (2000) Plant J. 22:1-8; Gong et al. (1999) Plant Mol. Biol. 41:33-44; 및 Hobo et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:15,348-15,353] 참조.

[0744] 유전적 억제인자를 만들기 위해 사용될 수 있는 예시적인 억제 도메인은 KRAB A/B, KOX, TGF-베타-유도성 초기 유전자[TIEG], v-erbA, SID, MBD2, MBD3, DNMT 족의 구성원(예를 들어, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, 등), Rb, 및 MeCP2를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 문헌[Bird et al. (1999) Cell 99:451-454; Tyler et al. (1999) Cell 99:443-446; Knoepfler et al. (1999) Cell 99:447-450; 및 Robertson et al. (2000) Nature Genet. 25:338-342] 참조. 추가의 예시적인 억제 도메인은, ROM2 및 AtHD2A를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Chem et al, (1996) Plant Cell 8:305-321; 및 Wu et al, (2000) Plant J. 22:19-27] 참조.

[0745] 일부 경우에서, 도메인은 염색체의 후성적 조절에 관여한다. 일부 구현예에서, 도메인은 히스톤 아세틸기전이효소[histone acetyltransferase, HAT], 예를 들어, 핵 국소화된 A형, 예컨대, MYST 족 구성원 MOZ, Ybf2/Sas3, MOF 및 Tip60, GNAT 족 구성원 Gcn5 또는 pCAF, p300 족 구성원 CBP, p300 또는 Rtt109이다(문헌[Bemdsen and

Denu (2008) Curr Opin Struct Biol 18(6):682-689] 참조). 다른 예에서, 도메인은 히스톤 탈아세틸화효소[histone deacetylase, HD AC], 예컨대 클래스 I(HDAC-1, 2, 3, 및 8), 클래스 II(HDAC IIA (HDAC-4, 5, 7 및 9), HD AC IIB(HDAC 6 및 10)), 클래스 IV(HDAC-l 1), 클래스 III(시르투인(SIRT)으로도 알려짐, SIRT1-7)(문헌[Mottamal 등, (2015) Molecules 20(3):3898-3941] 참조)이다. 일부 구현예에서 사용되는 또 다른 도메인은 히스톤 가인산분해효소 또는 키나제이며, 여기서 예는 MSK1, MSK2, ATR, ATM, DNA-PK, Bubl, VprBP, IKK-a, PKCpi, Dik/Zip, JAK2, PKC5, WSTF 및 CK2를 포함한다. 일부 구현예에서, 메틸화 도메인이 사용되며, 이는 Ezh2, PRMT1/6, PRMT5/7, PRMT 2/6, CARM1, set7/9, MLL, ALL-1, Suv 39h, G9a, SETDB1, Ezh2, Set2, Dotl, PRMT 1/6, PRMT 5/7, PR-Set7 및 Suv4-20h과 같은 군에서 선택될 수 있고, 수모일화 및 비오티닐화에 관여하는 도메인(Lys9, 13, 4, 18 및 12)이 또한 일부 구현예에서 사용될 수 있다(문헌[Kousarides (2007) Cell 128:693-705] 참조).

[0746] 융합 분자는 당업자에게 주지의 클로닝 및 생화학적 접합[conjugation]의 방법에 의해 구성된다. 융합 분자는 DNA 결합 도메인 및 기능적 도메인(예를 들어, 전사 활성화 또는 억제 도메인)을 포함한다. 융합 분자는 또한 핵 국재화 신호(예를 들어, SV40 중간 T-항원 유래의 신호와 같은 것) 및 에피토프 태그(예를 들어, FLAG 및 적혈구응집소)를 임의로 포함한다. 융합 단백질 (및 이들을 암호화하는 핵산)은 번역 해독틀이 융합체의 구성성분 사이에서 보존되도록 설계된다.

[0747] 한편으로는 기능적 도메인(또는 이의 기능적 단편)의 폴리펩티드 성분, 및 다른 한편으로는 비-단백질 DNA 결합 도메인(예를 들어, 항생제, 삽입제[intercalator], 작은 홈 결합자[minor groove binder], 핵산)간의 융합은 당업자에게 알려진 생화학적 구성 방법에 의해 구성된다. 예를 들어, 문헌[Pierce Chemical Company (Rockford, IL) 카달로그] 참조. 작은 홈 결합자와 폴리펩티드간의 융합체를 만드는 방법 및 조성물이 설명되었다. 문헌[Mapp et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935]. 마찬가지로, CRISPR/Cas TF 및 폴리펩티드 구성성분 기능 도메인과 연관된 sgRNA 핵산 성분을 포함하는 핵산분해효소는 또한 당업자에게 공지되어 있고, 본원에 상세히 설명되어 있다.

[0748] a. 외인성 폴리펩티드

[0749] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드의 증가된 발현(즉, 과발현)은 과발현될 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입함으로써 매개된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 재조합 핵산이다. 주지의 재조합 기술을 사용하여 본원에 약술된 바와 같은 재조합 핵산을 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에서 외인성 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 코돈-최적화된 핵산 서열을 포함한다.

[0750] 특정 구현예에서, 관용원성 인자 또는 키메라 항원 수용체와 같은 외인성 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 핵산은 발현 작제물 내의 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열에 작동 가능한 상태로 연결될 수 있다. 조절 뉴클레오티드 서열은 일반적으로 치료될 숙주 세포 및 수용자 대상에 적절할 것이다. 수많은 유형의 적당한 발현 벡터 및 적합한 조절 서열은 다양한 숙주 세포에 대해 당업계에 알려져 있다. 전형적으로, 하나 이상의 조절 뉴클레오티드 서열은 프로모터 서열, 리더 또는 신호 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 종결 서열, 번역 시작 및 종결 서열, 및 인핸서 또는 활성자 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 당업계에 알려진 항구적 프로모터 또는 유도성 프로모터도 또한 고려된다. 프로모터는 자연 발생 프로모터, 또는 하나 초과의 프로모터의 요소들을 조합한 혼성 프로모터일 수 있다. 발현 작제물은 플라스미드와 같은 에피솜 상의 세포에 존재할 수 있거나, 발현 작제물은 염색체에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 발현 벡터는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 허용하는 선택가능한 마커 유전자를 포함한다. 특정 구현예는 적어도 하나의 조절 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 변이체 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 본원에서 사용하기 위한 조절 서열은 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현 벡터는 형질전환될 숙주 세포, 발현하고자 하는 특정 변이체 폴리펩티드, 벡터의 복제 수, 그 복제 수를 제어하는 능력, 및/또는 항생제 마커와 같은 벡터로 암호화된 임의의 다른 단백질의 발현의 선택을 위해 설계된다.

[0751] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 조작된 세포에서 외인성 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결된다. 적합한 포유동물 프로모터의 예는 예를 들어, 아래 유전자에서부터의 프로모터: 신장 인자 1 α[EF1α], 햄스터의 유비퀴틴/S27a 프로모터(제WO97/15664호), 유인원 공포 바이러스 40[SV40] 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV)의 긴 말단 반복 영역, 마우스 유방 종양 바이러스 프로모터[MMTV], 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 긴 말단 반복 영역, 및 인간 거대세포바이러스[CMV]의 초기 프로모터를 포함한다. 다른 이종 포유동물 프로모터

의 예는 액틴, 면역글로불린 또는 열 충격 프로모터(들)이다. 추가의 구현예에서, 포유동물 세포에 사용하기 위한 프로모터는 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스(1989년 7월 5일 공개된 제UK2,211,504호), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 거대세포바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 유인원 바이러스 40[SV40]과 같은 바이러스의 유전체에서 수득될 수 있다. 추가 구현예에서, 이종 포유동물 프로모터가 사용된다. 예로는 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터 및 열 충격 프로모터가 있다. SV40의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기원을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다(문헌[Fiers et al., Nature 273: 113-120 (1978)]). 인간 거대세포바이러스의 즉시 초기 프로모터는 HindIII 제한 효소 단편으로서 편리하게 수득된다 (문헌[Greenaway et al., Gene 18: 355-360 (1982)]). 상기 참조문헌은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0752] 일부 구현예에서, 발현 벡터는 이중시스트론성 또는 멀티시스트론성 발현 벡터이다. 이중시스트론성 또는 멀티시스트론성 발현 벡터는 (1) 각각의 오픈 리딩 프레임에 융합된 다수의 프로모터, (2) 유전자 사이의 스플라이싱 신호의 삽입, (3) 단일 프로모터에 의해 발현이 유도되는 유전자의 융합, 및/또는 (4) 유전자 사이의 단백질 분해 절단 부위의 삽입(자기-절단 펩티드) 또는 유전자 사이의 내부 리보솜 진입 부위[IRES]의 삽입을 포함할 수 있다.

[0753] 일부 구현예에서, 본원에서 발현 벡터 또는 작제물은 멀티시스트론성 작제물이다. 용어 '멀티시스트론성 작제물' 및 '멀티시스트론성 벡터'는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 단일 mRNA 분자로 전사될 재조합 DNA 작제물을 지칭하며, 여기서 단일 mRNA 분자는 둘 이상의 유전자(예를 들어, 둘 이상의 이식유전자)를 암호화한다. 멀티시스트론성 작제물은 두 개의 유전자를 암호화하는 경우 이중시스트론성 작제물, 세 개의 유전자를 암호화하는 경우 삼중시스트론성 작제물, 네 개의 유전자를 암호화하는 경우 사중시스트론성 작제물, 등으로 지칭된다.

[0754] 일부 구현예에서, 벡터 또는 작제물(예를 들어, 이식유전자)에 의해 포함된 둘 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드는 각각 멀티시스트론성 분리 요소[multicistronic separation element]에 의해 분리된다. 몇몇 구현예에서, 멀티시스트론성 분리 요소는 IRES 또는 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소를 암호화하는 서열이다. 일부 구현예에서, 멀티시스트론성 분리 요소는 IRES, 예컨대 뇌심근염[EMCV] 바이러스 IRES이다. 일부 구현예에서, 멀티시스트론성 분리 요소는 절단가능한 펩티드, 예컨대 2A 펩티드이다. 예시적인 2A 펩티드는 P2A 펩티드, T2A 펩티드, E2A 펩티드, 및 F2A 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드는 T2A이다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드)는 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결된다. 일부 구현예에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드는 각각 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 동일한 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 EF1 프로모터이다.

[0755] 일부 경우에서, 외인성 폴리펩티드를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 본원에 기재된 관용원성 인자 또는 보체 억제제를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드)는 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소, 예컨대 T2A를, 멀티시스트론성 벡터에 의해 암호화된 외인성 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에서 암호화한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스킵 요소의 포함은 단일 번역 개시 부위에서 둘 이상의 폴리펩티드의 발현을 허용한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드는 T2A이다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 17에 기재된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 18에 기재된 아미노산 서열을 갖는다.

[0756] 일부 구현예에서, 벡터 또는 작제물은 외인성 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 전사 단위의 발현을 유도하는 단일 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 벡터 또는 작제물은 멀티시스트론성(이중시스트론성 또는 삼중시스트론성, 예를 들어 미국 특허 제6,060,273호 참조)일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터 전사된 RNA 유래의 유전자 산물(예를 들어, 하나 이상의 관용원성 인자, 예컨대 CD47 및/또는 하나 이상의 보체 억제제, 예컨대 CD46, CD59, 및 DAF/CD55)의 동시발현을 허용하는, IRES[내부 리보솜 진입 부위]를 함유하는 이중시스트론성 단위로서 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 벡터 또는 작제물은 이중시스트론성이어서, 벡터 또는 작제물이 두 개의 별개의 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용한다. 일부 경우에서, 벡터 또는 작제물에 의해 암호화되는 두 개의 별개의 폴리펩티드는 관용원성 인자(예를 들어, A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 및 Serpinb9에서 선택되는 두 개의 인자)이다. 일부 경우에서, 벡터 또는 작제물에 의해 암호화되는 두 개의 별개의 폴리펩티드는 CD46 및 CD59이

다. 일부 구현예에서, 벡터 또는 작제물에 의해 암호화된 두 개의 별개의 폴리펩티드는 관용원성 인자(예를 들어, CD47) 및 CD46, CD59, 및 DAF/CD55에서 선택된 보체 억제제이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 벡터 또는 작제물은 삼중시스트론성으로, 벡터 또는 작제물이 세 개의 별개의 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용한다. 일부 경우에서, 삼중시스트론성 벡터 또는 작제물의 세 개의 핵산 서열은 CD47, CD46 및 CD59와 같은 관용원성 인자이다. 일부 경우에서, 삼중시스트론성 벡터 또는 작제물의 세 개의 핵산 서열은 CD46, CD59, 및 DAF/CD55이다. 일부 구현예에서, 삼중시스트론성 벡터 또는 작제물의 세 개의 핵산 서열은 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 및 Serpinb9에서 선택된 세 개의 관용원성 인자이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 벡터 또는 작제물은 사중시스트론성으로, 벡터 또는 작제물이 네 개의 별개의 폴리펩티드를 발현하는 것을 허용한다. 일부 경우에서, 사중시스트론성 벡터 또는 작제물의 네 개의 별개의 폴리펩티드는 CD47, CD46, CD59, 및 DAF/CD55이다. 일부 경우에서, 사중시스트론성 벡터 또는 작제물의 네 개의 별개의 폴리펩티드는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 및 Serpinb9에서 선택된 네 개의 관용원성 인자이다.

[0757] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 벡터 또는 작제물을 포함하고, 여기서 각각의 벡터 또는 작제물은 상기 기재된 바와 같은 단일시스트론성 또는 멀티시스트론성 작제물이고, 단일시스트론성 또는 멀티시스트론성 작제물은 임의의 조합 또는 순서로 하나 이상의 관용원성 인자, 보체 억제제를 암호화한다.

[0758] 일부 구현예에서, 단일 프로모터는 단일 열린 해독틀[open reading frame, ORF]에, 자기-절단 펩티드(예를 들어, 2A 서열) 또는 단백질분해효소 인식 부위(예를 들어, 푸린)를 암호화하는 서열에 의해 서로 분리된 두 개, 세 개, 또는 네 개의 유전자(예를 들어, 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 암호화하는 유전자 및/또는 CD46, CD59, 및 DAF/CD55에서 선택된 하나 이상의 보체 억제제)를 함유하는 RNA의 발현을 지시한다. 따라서, ORF는 단일 폴리펩티드를 암호화하며, 이는 번역 동안(2A의 경우) 또는 번역 후에 개별 단백질로 가공된다. 일부 경우에서, 펩티드, 예컨대 T2A는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩티드 결합의 합성을 건너뛰게(리보솜 스키핑)하여, 2A 서열의 말단과 그 다음 펩티드 하류 사이의 분리를 야기할 수 있다(예를 들어, 문헌[de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) and deFelipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)]참조). 많은 2A 요소가 당업계에 알려져 있다. 본원에 개시된 방법 및 핵산에 사용될 수 있는 2A 서열의 예는, 비제한적으로, 미국 특허 공개 번호 제20070116690호에 기재된 바와 같은 구제역 바이러스(F2A, 예를 들어, 서열 번호 16), 말 비염 A 바이러스(E2A, 예를 들어, 서열 번호 15), 후세아 아지나(thosea asigna) 바이러스(T2A, 예를 들어, 서열 번호 11, 12, 17 또는 18), 및 돼지 테스코바이러스-1(P2A, 예를 들어, 서열 번호 13 또는 14)로부터의 2A 서열을 포함한다.

[0759] 벡터 또는 작제물(예를 들어, 이식유전자)이 단백질을 암호화하는 하나 초과의 핵산 서열, 예를 들어, CD46을 암호화하는 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 CD59를 암호화하는 제2 외인성 폴리뉴클레오티드, 또는 CD47을 암호화하는 제1 외인성 폴리뉴클레오티드, CD56을 암호화하는 제2 외인성 폴리뉴클레오티드, 및 CD59를 암호화하는 제3 외인성 폴리뉴클레오티드를 함유하는 경우, 벡터 또는 작제물(예를 들어, 이식유전자)은 제1 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드 사이에 위치된 핵산 서열은 번역 동안 또는 번역 후에 제1 및 제2 외인성 폴리뉴클레오티드의 번역 생성물을 분리하는 펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 자기-절단 펩티드 또는 리보솜 스키핑을 야기하는 펩티드(리보솜 스키핑 요소), 예컨대 T2A 펩티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 절단가능한 펩티드 또는 리보솜 스키핑 요소의 포함은 단일 번역 개시 부위에서 둘 이상의 폴리펩티드의 발현을 허용한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 T2A 펩티드인 자기-절단 펩티드이다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 12에 기재된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 17에 기재된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, T2A는 서열 번호 18에 기재된 아미노산 서열이거나 이를 포함한다.

[0760] 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하는 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질주입, 전기천공, 융합원 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스 형질도입)을 통해 세포 내로 도입되거나, 그렇지 않으면 바이러스 벡터상에 전달된다(예를 들어, 융합원-매개 전달). 적합한 기술

은 인산칼슘 또는 지질-매개 형질주입, 전기천공, 전위효소-매개 전달, 및 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 형질도입(예를 들어, 렌티바이러스 형질도입)을 통해 세포 내로 도입되거나, 그렇지 않으면 바이러스 벡터상에 전달된다(예를 들어, 융합원-매개 전달). 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 패키징하는 벡터는 패키징된 폴리뉴클레오티드를 세포 또는 세포 집단에 전달하기 위해 사용될 수 있다. 이들 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 바이러스 벡터 및 입자를 비롯한 임의의 종류일 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 나노입자는 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 외인성 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 데 사용될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당 분야에서 주지이며, 문헌[Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 설명된다. 벡터로서 유용한 바이러스는, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스[adeno-associated viral, AAV] 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 종양세포붕괴성[oncolytic] 바이러스, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포로의 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입은 특이적(표적화) 또는 비-특이적(예를 들어, 비-표적화된)일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포로의 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입은 세포 내의 유전체 내로의 통합 또는 삽입을 초래할 수 있다. 다른 구현예에서, 도입된 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포에서 비-통합 또는 에피좀일 수 있다. 당업자는 본원에 기재된 임의의 예시적인 방법을 비롯한 핵산 이식유전자를 세포 내로 도입하는 방법에 익숙하며, 적합한 방법을 선택할 수 있다.

[0761] 1) 비-표적화된 전달

[0762] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 임의의 다양한 비-표적화된 방법에 의해 세포(예를 들어, 공급원 세포) 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포의 무작위 유전체 좌위에 삽입된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 비롯한 바이러스 벡터는 유전자 물질을 숙주 세포에 전달하기 위해 통상적으로 사용되고, 외래 또는 외인성 유전자를 숙주 세포 유전체에 무작위로 삽입하여 유전자의 안정한 발현 및 복제를 촉진시킨다. 일부 구현예에서, 세포 내로 외인성 폴리뉴클레오티드의 비-표적화된 도입은 세포에서 외인성 폴리뉴클레오티드의 안정한 발현을 위한 조건 하에 있다. 일부 구현예에서, 세포에서 안정한 발현을 위해 핵산을 도입시키는 방법은 핵산이 세포의 유전체 내로 안정적으로 통합되게 하는 임의의 방법을 수반하여, 세포가 분열체[divide] 내로 통합되는 경우에 핵산이 전파될 수 있다.

[0763] 일부 구현예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 렌티바이러스 벡터는 전달된 핵산 전사체 내에 함유된 유전자의 안정한 발현을 허용하기 때문에 성공적인 바이러스 형질도입을 위한 유용한 수단이다. 렌티바이러스 벡터는 전달된 핵산 전사체 내에 함유된 유전자의 안정적인 발현에 필요한 두 가지 효소인 역전사효소 및 통합효소를 발현한다. 역전사효소는 RNA 전사체를 DNA로 전환시키는 반면, 통합효소는 DNA를 표적 세포의 유전체내로 삽입하여 통합시킨다. DNA가 유전체에 안정적으로 통합되면 숙주와 함께 분열된다. 통합된 DNA 내에 포함된 관심 유전자는 구성적으로 발현될 수 있거나 유도가능할 수 있다. 숙주 세포 유전체의 일부로서, 이는 표적 세포의 다수의 인자에 따라, 활성화 또는 억제를 포함한 세포 조절의 대상이 될 수 있다.

[0764] 렌티바이러스는 숙주 유전체에 통합되기 전에 바이러스 RNA 유전체의 DNA로의 역전사가 필요하기 때문에 명명된, 레트로비리대(Retroviridae) 바이러스 계열의 하위군이다. 이와 같이, 렌티바이러스 비히클/입자의 가장 중요한 특징은 표적/숙주 세포의 유전체내로의 이들의 유전 물질의 통합이다. 렌티바이러스의 일부 예는, 인간 면역결핍 바이러스(HIV 1형 및 HIV 2형을 포함), 유인원 면역결핍 바이러스[Simian Immunodificiency virus, SIV], 고양이 면역결핍 바이러스[FIV], 소 면역 결핍 바이러스[BIV], 젬브라나 질환 바이러스[Jembrana Disease Virus, JDV], 말 전염성 빈혈 바이러스[EIAV], 말 전염성 빈혈, 바이러스, 비스나-매디(visna-maedi) 및 염소 관절염-뇌염 바이러스[CAEV]을 포함한다.

[0765] 일반적으로 유전자 전달 비히클을 구성하는 렌티바이러스 입자는 자체적으로 복제 결함이 있다('자기 불활성화'로도 지칭됨). 렌티바이러스는 온전한 숙주 핵 외피를 통한 진입 메커니즘에 의해 분열 및 비-분열 세포 둘 다를 감염시킬 수 있다(문헌[Naldini L et al., Curr. Opin. Bioiecknol, 1998, 9: 457-463]). 재조합 렌티바이러스 비히클/입자는 HIV 독성 유전자, 예를 들어, Env, Vif, Vpr, Vpu, Nef 및 Tat 유전자가 결실되어 벡터를 생물학적으로 안전하게 함으로써, 다중 감쇠시킴으로써 생성되었다. 이에 상응하여, 예를 들어, HIV-1/HIV-2에서 유래한 렌티바이러스 비히클은 비-분열 세포내로의 트랜스유전자의 효율적인 전달, 통합 및 장기간 발현을 매개할 수 있다.

[0766] 렌티바이러스 입자는 바이러스 패키징 요소 및 벡터 유전체 자체를 인간 HEK293T 세포와 같은 생산자 세포에서

공동-발현시킴으로써 생성될 수 있다. 이들 요소는 보통 세 개(2세대 렌티바이러스 시스템에서) 또는 네 개의 별개의 플라스미드(3세대 렌티바이러스 시스템에서)로 제공된다. 생산자 세포는 바이러스의 코어(core)(즉, 구조 단백질) 및 효소 구성성분, 및 외피 단백질[envelope protein](들)(패키징 시스템으로 지칭됨)을 포함하는 렌티바이러스 구성성분을 암호화하는 플라스미드, 및 비히클 자체(전달 벡터로도 지칭됨)인, 표적 세포로 전달될 외래 이식유전자를 포함하는 유전체를 암호화하는 플라스미드로 공동-형질감염된다. 일반적으로, 플라스미드 또는 벡터는 생산자 세포주에 포함된다. 플라스미드/벡터는 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 생산자 세포주 내로 도입된다. 형질감염, 형질도입 또는 감염 방법은 당업자에게 주지이다. 비제한적인 예로서, 패키징 및 전달 작제물은, 일반적으로 네오마이신(neo), 디히드로폴레이트 환원효소[dihydrofolate reductase, DHFR], 글루타민 합성효소 또는 아데노신 탈아미노효소[ADA]와 같은 우성 선발 마커와 함께, 인산칼슘 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공에 의해 생산자 세포주 내로 도입된 후, 적절한 약물의 존재하에 선별하고 클론을 단리할 수 있다.

[0767] 생산자 세포는 외래 유전자, 예를 들어 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 재조합 바이러스 입자를 생산한다. 재조합 바이러스 입자는 배지로부터 회수되고, 이들에 의해 사용되는 표준 방법에 의해 적정된다. 재조합 렌티바이러스 비히클은 표적 세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있으며, 그러한 공급원 세포는 섹션 II.C에 기재된 임의의 것을 포함한다.

[0768] 고역가 렌티바이러스 입자를 생산하기 위해 사용될 수 있는 세포는, HEK293T 세포, 293G 세포, STAR 세포(문헌[Relander et al., Mol Ther. 2005, 11: 452-459]), FreeStyle™ 293 발현 시스템(ThermoFisher, Waltham, MA), 및 기타 HEK293T-기반 생산자 세포주(예를 들어, 문헌[Stewart et al., Hum Gene Ther. _2011, 2,2.(3):357~369; Lee et al, Biotechnol Bioeng, 2012, 10996): 1551-1560; Throm et al., Blood. 2009, 113(21): 5104-5110)를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0769] 렌티바이러스 입자에 제공된 추가의 요소는 5' 또는 3' 말단에서의 레트로바이러스 LTR[긴 말단 반복부], 레트로바이러스 유출 요소, 임의로 렌티바이러스 역반응 요소[reverse response element, RRE], 그의 프로모터 또는 활성 부분, 및 좌위 제어 영역[locus control region, LCR] 또는 그의 활성 부분을 포함할 수 있다. 기타 요소로는 비-분열 세포에서 형질도입 효율을 향상시키기 위한 중심 폴리푸린관[central polypurine tract, cPPT] 서열, 이식유전자의 발현을 향상시키고 역가를 증가시키는 우드척 간염 바이러스[Woodchuck Hepatitis Virus, WHP] 전사후 조절 요소[Post Transcriptional Regulatory Element, WPRE]를 포함한다.

[0770] 재조합 렌티바이러스 입자를 생성하는 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 번호 제8,846,385호, 제7,745,179호, 제7,629,153호, 제7,575,924호, 제7,179,903호, 및 제6,808,905호가 있다. 사용된 렌티바이러스 벡터는, pLVX, pLenti, pLenti6, pLJM1, FUGW, pWPXL, pWPI, pLenti CMV 푸로(puro) DEST, pLJM1-EGFP, pULTRA, pInducer2Q, pHIV-EGFP, pCW57.1, pTRPE, pELPS, pRRL, 및 pLionII에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 임의의 알려진 렌티바이러스 비히클이 또한 사용될 수 있다(미국 특허 번호 제9,260,725호, 제9,068,199호, 제9,023,646호, 제8,900,858호, 제8,748,169호, 제8,709,799호, 제8,420,104호, 제8,329,462호, 제8,076,106호, 제6,013,516호, 및 제5,994,136호, 국제 특허 공개 번호 제WO2012079000호 참조).

[0771] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포의 일시적 발현을 위한 조건 하에, 예컨대 외인성 폴리뉴클레오티드의 에피솜 전달을 초래하는 방법에 의해 세포 내로 도입된다.

[0772] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 아데노-연관 바이러스[rAAV] 벡터 내로 패키징될 수 있다. 이러한 벡터 또는 바이러스 입자는 임의의 알려진 혈청형 캡시드 또는 혈청형 캡시드의 조합을 이용하도록 설계될 수 있다. 혈청형 캡시드는 임의의 확인된 AAV 혈청형 및 이의 변이체, 예를 들어 AAV1, AAV2, AAV2G9, AAV3, AAV4, AAV4-4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 및 AAVrh10에서부터의 캡시드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 혈청형은 미국 공개 번호 제US20030138772호, 문헌[Pulicherla et al. Molecular Therapy, 2011, 19(6): 1070-1078], 미국 특허 번호 제6,156,303호, 제7,198,951호, 미국 특허 공개 번호 제US2015/0159173호 및 제US2014/0359799호, 및 국제 특허 공개 번호: 제WO1998/011244호, 제WO2005/033321호 및 제WO2014/14422호에 기재된 것과 같은 서열일 수 있거나, 이를 가질 수 있다.

[0773] AAV 벡터는 단일 가닥 벡터뿐만 아니라 자기-상보적 AAV 벡터[scAAV]를 포함한다. scAAV 벡터는 함께 어닐링되어 이중 가닥 벡터 유전체를 형성하는 DNA를 함유한다. 제2 가닥 합성을 건너뜀으로써, scAAV는 세포에서 신속한 발현을 허용한다. rAAV 벡터는 당업계의 표준 방법, 예컨대 sf9 곤충 세포 또는 인간 세포, 예컨대 HEK293

세포의 현탁 세포 배양물에서 삼중 형질감염에 의해 제조될 수 있다.

[0774] 일부 구현예에서, 비-바이러스 기반 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는, 물리적 방법, 예컨대 바늘, 전기천공, 초음파천공, 유체천공[hydroporation], 화학적 담체, 예컨대 무기 입자(예를 들어, 인산칼슘, 실리카, 금) 및/또는 화학적 방법에 의해, 비-바이러스 방법으로 세포로 전달될 수 있다. 다른 양태에서, 합성 또는 천연 생분해성 제제가 양이온성 지질, 지질 나노 에멀젼, 나노입자, 펩티드 기반 벡터, 또는 중합체 기반 벡터와 같은 전달을 위해 사용될 수 있다.

[0775] 일부 구현예에서, mRNA 기반 방법이 사용될 수 있다.

[0776] 2) 비-표적화된 전달

[0777] 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포의 임의의 적합한 표적 유전체 좌위 내로 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 표적 좌위 내로의 표적화된 통합에 의해 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 표적화된 통합은 상동성-의존성 또는 상동성-비의존성 재조합을 포함하는 공정에서 하나 이상의 핵산분해효소 및/또는 틈내기효소 및 공여자 주형을 사용하는 유전자 편집에 의해 달성될 수 있다.

[0778] 선택된 특정 유전체 좌위 내로 외인성 폴리뉴클레오티드를 삽입하기 위해, 예를 들어 상동성 유도 복구[HOR], 상동성-매개 말단-연결[HMEJ], 상동성-비의존성 표적화 통합[HITI], 절대 결찰-개폐 재조합[obligate ligation-gated recombination, ObliGaRe], 또는 표적 염색체 내로의 정확한 통합[PITCh]을 포함하는 다수의 유전자 편집 방법이 사용될 수 있다.

[0779] 일부 구현예에서, 핵산분해효소는 유전체 내의 원하는 위치(예를 들어, 표적 부위)에서 특이적 이중 가닥 파손[DSB]을 생성하고, 세포의 내인성 메커니즘을 이용하여 유도된 파손을 복구한다. 틈내기효소는 유전체 내의 원하는 위치에서 특정 단일 가닥 파손을 생성한다. 비제한적인 하나의 예에서, 두 개의 틈내기효소가 표적 DNA의 대향 가닥상에 두 개의 단일 가닥 파손을 생성하는데 사용되어, 이에 의해 평활 말단 또는 점착성 말단을 생성할 수 있다. 임의의 적합한 핵산분해효소가 세포 내로 도입되어 표적 DNA 서열의 유전체 편집을 유도할 수 있으며, 이는 CRISPR-연관 단백질[Cas] 핵산분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, 기타 엔도- 또는 엑소-핵산분해효소, 이들의 변이체, 단편, 및 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산분해효소 또는 틈내기효소가 내인성 유전체 표적 좌위, 예를 들어 피난항 좌위에 또는 그 근처에서 서열에 상동성인 상동성 서열(예를 들어, 상동성 팔)에 의해 측면 근접된 외인성 폴리뉴클레오티드 서열(또한 이식유전자로 지칭됨)을 함유하는 공여자 주형과 함께 도입되는 경우, DNA 손상 복구 경로는 세포 내의 표적 부위에서 이식유전자 서열의 통합을 초래할 수 있다. 이는 상동성 의존적 과정에 의해 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 공여체 주형은 원형 이중 가닥 플라스미드 DNA, 단일 가닥 공여자 올리고뉴클레오티드[ssODN], 선형 이중 가닥 중합효소 연쇄 반응[PCR] 단편, 또는 온전한 자매 염색분체의 상동 서열이다. 상기 상동성-매개 유전자 삽입 및 대체는, 공여자 주형의 형태에 따라, 상동성 유도 복구[HDR], 합성 의존성 가닥 어닐링[synthesis-dependent strand annealing, SDSA], 미세상동성-매개 단부 결합[microhomology-mediated end joining, MMEJ], 상동성-매개 단부 결합[homology-mediated end joining, HMEJ] 경로와 같은 특정 DNA 복구 경로를 통해 수행될 수 있다.

[0780] 예를 들어, DNA 복구 메커니즘은 (i) 각각의 가닥상에 SSB가 존재하여, 단일 가닥 오버행을 유도하는 두 개의 SSB, 또는 (ii) 양 가닥 모두에서의 동일한 절단 부위에서 발생하여, 평활 말단 파손을 유도하는 DSB 후에, 핵산분해효소에 의해 유도될 수 있다. 이들 작용제 중 하나에 의한 절단 시, SSB 또는 DSB를 갖는 표적 좌위는 DNA 손상 복구를 위한 두 개의 주요 경로: (1) 오류 경향 비-상동성 단부 결합[NHEJ], 또는 (2) 고정확도 상동성 유도 복구[HDR] 경로 중 하나를 겪는다. 일부 구현예에서, SSB 또는 DSB가 존재하는 세포 내로 도입된 공여자 주형(예를 들어, 원형 플라스미드 DNA 또는 선형 DNA 단편, 예컨대 ssODN)은 표적 좌위 내로의 공여자 주형의 HDR 및 통합을 초래할 수 있다. 일반적으로, 공여자 주형이 없는 경우, NHEJ 공정은 절단된 DNA 가닥의 단부를 재결찰하며, 이는 종종 절단 부위에서 뉴클레오티드 결실 및 삽입을 초래한다.

[0781] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 부위-유도 삽입은 HDR-기반 접근법을 통해 달성될 수 있다. HDR은 세포가 DNA에서 이중 가닥 파손[DSB]을 복구하기 위한 메커니즘이며, 군집화된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부[CRISPR]/Cas 시스템, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, 및 전위효소를 비롯한, 다양한 유전자 편집 시스템을 사용하여 많은 생물에서 유전체를 변형시키는 데 사용될 수 있다.

[0782] 일부 구현예에서, 표적화된 통합은 표적 유전자의 적어도 하나의 표적 부위(들) 서열에 표적화되도록 특이적으

로 설계된, DNA-결합 표적화된 핵산분해효소 및 유전자 편집 핵산분해효소, 예컨대 아연 집게 핵산분해효소[ZFN] 및 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 및 RNA-안내 핵산분해효소, 예컨대 CRISPR-연관 핵산분해효소[Cas] 시스템을 비롯한, 하나 이상의 서열-특이적 또는 표적화된 핵산분해효소를 도입함으로써 수행된다. 예시적인 ZFN, TALE, 및 TALEN은 예를 들어, 문헌[Lloyd et al., Frontiers in Immunology, 4(221): 1-7 (2013)]에 기재되어 있다. 구현예에서, 표적 부위에서 또는 그 근처에서 표적화된 유전적 파괴는 군집화된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부[CRISPR] 및 CRISPR-연관[Cas] 단백질을 사용하여 수행된다. 문헌[Sander and Jung, (2014) Nature Biotechnology, 32(4): 347-355] 참조.

[0783] 섹션 II. A.1에 기재된 유전자 파괴를 위한 시스템 중 임의의 것이 사용될 수 있고, 또한 외인성 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 이식유전자 서열을 갖는 적절한 공여자 주형과 함께 도입될 때, 유전자 파괴의 표적 부위에서 또는 그 근처에서 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적화된 통합을 초래할 수 있다. 구현예에서, 유전자 파괴는 하나 이상의 안내 RNA[gRNA] 및 Cas 단백질을 함유하는 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 매개된다. 예시적인 Cas 단백질 및 gRNA는 상기 섹션 II.A에 기재되어 있으며, 이들 중 임의의 것이, Crispr/Cas 시스템이 그에 대해 특이적인, 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적 좌위 내로의 HDR 매개된 통합에 사용될 수 있다. 예컨대 HDR에 의한 외인성 폴리뉴클레오티드의 절단 및 통합을 위한 특정 표적 좌위 및 표적 부위에 따라, 적절한 Cas 핵산분해효소 및 gRNA를 선택하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 또한, 표적 좌위에 따라, 당업자는 아래에 추가로 기재되는 바와 같이 적절한 공여체 주형을 용이하게 제조할 수 있다.

[0784] 일부 구현예에서, DNA 편집 시스템은 RNA-안내 CRISPR/Cas 시스템(예컨대 RNA-기반 CRISPR/Cas 시스템)이며, 여기서 CRISPR/Cas 시스템은 표적 좌위(예를 들어, 피난항 좌위)에서 이중 가닥 파손을 생성하여, 표적 좌위 내로 이식유전자의 삽입을 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산분해효소 시스템은 CRISPR/Cas9 시스템이다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 플라스미드-기반 Cas9를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 RNA-기반 Cas9를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9 mRNA 및 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 단백질/RNA 복합체, 또는 플라스미드/RNA 복합체, 또는 단백질/플라스미드 복합체를 포함한다. 일부 구현예에서, 이식 유전자 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형, 및 DNA 핵산분해효소 시스템(예를 들어, Cas9)와 좌위-특이적 gRNA를 포함하는 DNA 핵산분해효소 시스템을, 공급원 세포(예를 들어, 일차 세포 또는 만능 줄기 세포, 예를 들어 iPSC) 내로 도입하는 것을 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, Cas9는 mRNA로서 도입된다. 일부 구현예에서, Cas9는 gRNA와의 리보핵산단백질 복합체로서 도입된다.

[0785] 일반적으로, 삽입되는 공여자 주형은 적어도 관심있는 외인성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 관용원성 인자 또는 CAR)을 함유하는 이식유전자 카세트를 포함할 것이고, 임의로 또한 프로모터를 포함할 것이다. 이러한 특정 구현예에서, 삽입될 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 프로모터를 함유하는 이식유전자 카세트는, 표적 절단 부위의 바로 상류 및 하류의 서열들에 상동성인 서열을 갖는 상동성 팔, 즉 좌측 상동성 팔[left homology arm, LHA] 및 우측 상동성 팔[right homology arm, RHA]에 의해, 공여자 주형에서 측면 근접될 것이다. 전형적으로, 공여자 주형의 상동성 팔은 HDR에 대한 주형으로서 작용하도록 표적 유전체 좌위에 대해 특이적으로 설계된다. 각각의 상동성 팔의 길이는 일반적으로 도입되는 삽입의 크기에 따르며, 삽입이 클수록 더 긴 상동성 팔을 필요로 한다.

[0786] 일부 구현예에서, 공여자 주형(예를 들어, 재조합 공여자 복구 주형)은, (i) 외인성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 프로모터, 예를 들어, 이종 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결된 이식유전자)을 포함하는 이식유전자 카세트, 및 (ii) 이식유전자 카세트를 측면 근접하고, DNA 핵산분해효소(예를 들어, Cas 핵산분해효소, 예컨대 Cas9 또는 Cas12) 절단 부위의 어느 하나의 측면에서 표적 좌위(예를 들어, 피난항 좌위)의 일부에 상동성인 두 개의 상동성 팔을 포함한다. 공여자 주형은 선발 마커, 검출 마커, 및/또는 정제 마커를 추가로 포함할 수 있다.

[0787] 일부 구현예에서, 상동성 팔은 동일한 길이이다. 다른 구현예에서, 상동성 팔은 상이한 길이이다. 상동성 팔은 적어도 약 10 염기쌍[bp], 예를 들어, 적어도 약 10 bp, 15 bp, 20 bp, 25 bp, 30 bp, 35 bp, 45 bp, 55 bp, 65 bp, 75 bp, 85 bp, 95 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp, 550 bp, 600 bp, 650 bp, 700 bp, 750 bp, 800 bp, 850 bp, 900 bp, 950 bp, 1000 bp, 1.1 킬로베이스(kb), 1.2 kb, 1.3 kb, 1.4 kb, 1.5 kb, 1.6 kb, 1.7 kb, 1.8 kb, 1.9 kb, 2.0 kb, 2,1 kb, 2,2 kb, 2,3 kb, 2,4 kb, 2,5 kb, 2,6 kb, 2.7 kb, 2.8 kb, 2.9 kb, 3.0 kb, 3.1 kb, 3.2 kb, 3.3 kb, 3.4 kb, 3.5 kb, 3.6 kb, 3.7 kb, 3.8 kb, 3.9 kb, 4.0 kb 이상일 수 있다. 상동성 팔은 약 10 bp 내지 약 4 kb, 예를 들어 약 10 bp 내지 약 20 bp, 약 10 bp 내지 약 50 bp, 약 10 bp 내지 약 100 bp, 약 10 bp 내지 약 200 bp, 약 10 bp 내지 약

500 bp, 약 10 bp 내지 약 I kb, 약 10 bp 내지 약 2 kb, 약 10 bp 내지 약 4 kb, 약 100 bp 내지 약 200 bp, 약 100 bp 내지 약 500 bp, 약 100 bp 내지 약 1 kb, 약 100 bp 내지 약 2 kb, 약 100 bp 내지 약 4 kb, 약 500 bp 내지 약 I kb, 약 500 bp 내지 약 2 kb, 약 500 bp 내지 약 4 kb, 약 1 kb 내지 약 2 kb, 약 1 kb 내지 약 2 kb, 약 1 kb 내지 약 4 kb, 또는 약 2 kb 내지 약 4 kb일 수 있다.

[0788] 일부 구현예에서, 공여자 주형은 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 당업자에게 알려진 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 발현 벡터가 사용될 수 있다.

[0789] 일부 구현예에서, 통합을 위해 표적화된 표적 좌위는 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자의 통합을 표적화하는 것이 허용가능하거나 바람직한 임의의 좌위일 수 있다. 표적 좌위의 비제한적 예는 CXCR4 유전자, 알부민 유전자, SHS231 유전자좌, F3 유전자(CD142로도 알려짐), MICA 유전자, MICB 유전자, LRP1 유전자(CD91로도 알려짐), HMGB1 유전자, ABO 유전자, RHD 유전자, FUT1 유전자, KDM5D 유전자(HY로도 알려짐), B2M 유전자, CIITA 유전자, TRAC 유전자, TRBC 유전자, CCR5 유전자, F3(즉, CD142) 유전자, MICA 유전자, MICB 유전자, LRP1 유전자, HMGB1 유전자, ABO 유전자, RHD 유전자, FUT1 유전자, KDM5D(즉, HY) 유전자, PDGFRa 유전자, OLIG2 유전자, 및/또는 GFAP 유전자를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 인트론, 엑손 및/또는 유전자 코딩 영역(코딩 서열[Coding Sequence] 또는 'CDS'로도 알려짐)을 포함하는, 표적 좌위(예를 들어, 피난항 좌위)의 적합한 영역에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 삽입은 표적 유전체 좌위의 하나의 대립유전자에서 일어난다. 일부 구현예에서, 삽입은 표적 유전체 좌위의 두 대립유전자 모두에서 일어난다. 이들 중 어느 하나의 구현예에서, 표적 유전체 좌위에 삽입된 이식유전자의 배향은 해당 좌위에서 유전자의 방향과 동일하거나 반대일 수 있다.

[0790] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 피난항 유전자좌의 인트론, 엑손, 또는 코딩 서열 영역에 관심이 있다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 내인성 유전자 내로 삽입되며, 여기서 삽입은 내인성 유전자의 사일런싱 또는 감소된 발현을 유발한다. 외인성 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위한 예시적인 유전체 좌위는 표 24에 나타낸다.

[0791] [표 24] 외인성 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위한 예시적인 유전체 좌위

번호	종	명칭	Ensembl ID	절단을 위한 표적 영역	아래로도 알려짐
1	인간	B2M	ENSG00000166710	CDS	
2	인간	CIITA	ENSG00000179583	CDS	
3	인간	TRAC	ENSG00000277734	CDS	
4	인간	PPP1R12C	ENSG00000125503	인트론 1 및 2	AAVS1
5	인간	CLYBL	ENSG00000125246	인트론 2	
6	인간	CCR5	ENSG00000160791	엑손 1-3, 인트론 1-2, 및 CDS	
7	인간	THUMPD3-AS1	ENSG00000206573	인트론 1	ROSA26
8	인간	Ch-4:58,976,613		500 bp 범위	SHS231
9	인간	F3	ENSG00000117525	CDS	CD142
10	인간	MICA	ENSG00000204520	CDS	
11	인간	MICB	ENSG00000204516	CDS	
12	인간	LRP1	ENSG00000123384	CDS	
13	인간	HMGB1	ENSG00000189403	CDS	
14	인간	ABO	ENSG00000175164	CDS	
15	인간	RHD	ENSG00000187010	CDS	
16	인간	FUT1	ENSG00000174951	CDS	
17	인간	KDM5D	ENSG00000012817	CDS	HY

[0792]

[0793] 일부 구현예에서, 표적 좌위는 피난항 좌위이다. 일부 구현예에서, 피난항 좌위는 근처 또는 인접한 내인성 유전자, 조절 요소 등에 최소한의 영향을 미치면서 통합된 DNA의 안정적인 발현을 허용하는 유전체 위치이다. 일부 경우에서, 피난항 유전자는 지속 가능한 유전자 발현을 가능하게 하고, 이의 유도체 및 이의 분화된 세포를 비롯한, 일차 세포 및 만능성 줄기 세포를 포함하는 다양한 세포 유형에서 유전자 변형을 위한 조작된 핵산분해효소에 의해 표적화될 수 있다. 피난항 좌위의 비제한적인 예는, CCR5 유전자좌, PPP1R12C(AAVS1로도 알려짐) 유전자좌, CLYBL 유전자좌, 및/또는 로사(Rosa) 유전자좌(예컨대, ROSA26 유전자좌)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 피난항 좌위는 AAVS1 좌위, CCR5 좌위, 및 CLYBL 좌위로 이루어지는 군에서 선택된다. 일부 경우에서, SHS231은 많은 세포 유형에서 피난항 좌위로서 표적화될 수 있다. 일부 경우에서, 특정 좌위는 특정 세포 유형에서 피난항 좌위로 기능할 수 있다. 예를 들어, PDGFRa는 신경아교 전구세포[glial progenitor cell, GPC]에 대한 피난항이고, OLIG2는 희소돌기아교세포에 대한 피난항 좌위이고, GFAP는 별아교세포에 대한 피난항 좌위이다. 특정 조작된 세포 유형에 따라 적절한 피난항 좌위를 선택하는 것은 숙련된 기술자의 수준 내에 있다. 일부 경우에서, 하나 초과의 피난항 유전자가 표적화될 수 있고, 이에 의해 하나 초과의 이식유전자가 유전자 변형된 세포에 도입된다.

[0794] 일부 구현예에서, 이식 유전자 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형, 및 DNA 핵산분해효소 시스템(예를 들어, Cas9)과 CCR5 유전자좌, PPP1R12C(AAVS1로도 알려짐) 유전자좌, CLYBL 유전자좌, 및/또는 로사 유전자좌(예를 들어, ROSA26 유전자좌)에 특이적인 상보적 부분(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 포함하는 좌위-특이적 gRNA를 포함하는 DNA 핵산분해효소 시스템을, 공급원 세포(예를 들어, 일차 세포 또는 만능 줄기 세포, 예를 들어, iPSC) 내로 도입하는 것을 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 유전체 좌위는 기재된 바와 같은 임의의 좌위의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내에 위치된다.

[0795] 일부 구현예에서, 이식유전자의 HDR-매개 삽입을 위해 본원에 사용되는 gRNA는 AAVS1에서 표적 서열을 인식하는 상보적 영역(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, 표적 서열은 AAVS1의 인트론

1에 위치된다. AAVS1은 염색체 19: 55,090,918 내지 55,117,637 역가닥에 위치되며, AAVS1 인트론 1(전사체 ENSG00000125503에 기반)은 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796 역가닥에 위치된다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 19: 55,117,222 내지 55,112,796의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내의 유전체 좌위를 표적화한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내의 유전체 좌위를 표적화한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 19: 55,115,674에서, 또는 염색체 19: 55,115,674의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 뉴클레오티드 내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에서, gRNA는 문헌[Li et al., Nat. Methods 16:866-869 (2019)]에 기재된, 'sgAAVS1-1'로도 알려진 GET000046이다. 이 gRNA는 서열 번호 36(표 25에 나타냄)에 기재된 핵산 서열을 갖는 상보적 부분(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 포함하고, AAVS1의 인트론 1(PPP1R12C로도 알려짐)을 표적화한다.

[0796] 일부 구현예에서, 이식유전자의 HDR-매개 삽입을 위해 본원에 사용된 gRNA는 CLYBL에서 표적 서열을 인식하는 상보적 부분(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, 표적 서열은 CLYBL의 인트론 2에 위치된다. CLYBL은 염색체 13: 99,606,669 내지 99,897,134 정방향 가닥에 위치되고, CLYBL 인트론 2(전사체 ENST00000376355.7에 기반함)는 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860 정방향 가닥에 위치된다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 13: 99,773,011 내지 99,858,860의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내의 유전체 좌위를 표적화한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 13: 99,822,980에서, 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내의 유전체 좌위를 표적화한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 13: 99,822,980에서 또는 염색체 13: 99,822,980의 5, 0, 15, 20, 30, 40 또는 50 뉴클레오티드 내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에서, gRNA는 GET000047이며, 이는 서열 번호 36(표 25에 제시됨)에 기재된 핵산 서열을 갖는 상보적 부분(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 포함하고, CLYBL의 인트론 2를 표적화한다. 표적 부위는 문헌[Cerbini et al., PLoS One, 10(1): e0116032 (2015)]에 기재된 바와 같이 TALEN의 표적 부위와 유사하다.

[0797] 일부 구현예에서, 이식유전자의 HDR-매개 삽입을 위해 본원에서 사용되는 gRNA는 CCR5에서 표적 서열을 인식하는 상보적 부분(예를 들어, gRNA 표적화 서열)을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, 표적 서열은 CCR5의 엑손 3에 위치된다. CCR5는 염색체 3: 46,370,854 내지 46,376,206 정방향 가닥에 위치되고, CCR5 엑손 3(전사체 ENST00000292303.4에 기반함)은 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206 정방향 가닥에 위치된다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 3: 46,372,892 내지 46,376,206의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내의 유전체 좌위를 표적화한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 3: 46,373,180의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내 또는 500 bp 내의 유전체 좌위를 표적화한다. 특정 구현예에서, gRNA는 염색체 3: 46,373,180에서 또는 염색체 3: 46,373,180의 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 뉴클레오티드 내의 위치에서 절단 부위를 생성하도록 구성된다. 특정 구현예에서, gRNA는 문헌[Mandal et al., Cell Stem Cell 15:643-652 (2014)]에 기재된 'crCCR5_D'로도 알려진 GET000048이다. 이러한 gRNA는 서열 번호 37(표 17에 나타냄)에 기재된 핵산 서열을 갖는 상보적 부분을 포함하고, CCR5의 엑손 3(또는, Ensembl 유전체 데이터베이스에서 엑손 2로 주석이 달림)을 표적화한다. 문헌[Gomez-Ospina et al., Nat. Comm. 10(1):4045 (2019)]을 참조.

[0798] 표 25는 예시적인 gRNA 표적화 서열을 기재한다. 일부 구현예에서, gRNA 표적화 서열은 표 17에 기재된 상보적 부분 서열에서, 우라실로 치환되는, 하나 이상의 티민을 함유할 수 있다. 우라실과 티민 둘 모두는, 우라실에 대해 'u' 및 티민에 대한 't' 대신에, 't'로 표현될 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이며, 리보핵산의 맥락에서, 't'는 달리 나타내지 않는 한 우라실을 나타내기 위해 사용되는 것으로 이해될 것이다.

[0799] [표 25] CCR5에 대한 예시적인 gRNA 표적화 서열

[0800]

설명	핵산 서열	서열번호
GET000046 안내	(5' →3') accccacagtggggccacta	321
GET000047 안내	(5' →3') tgttggaaggatgaggaaat	322
GET000048 안내	(5' →3') tcactatgctgccgcccagt	323

[0801] 일부 구현예에서, 표적 좌위는 세포에서 녹아웃되기를 원하는 좌위이다. 이러한 구현예에서, 이러한 표적 좌위는 예컨대 세포의 표현형 또는 기능을 조정하기 위해 세포에서 파괴 또는 제거가 요구되는 임의의 표적 좌위이

다. 예를 들어, 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 섹션 II.A에 기재된 임의의 유전자 변형은 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적화된 통합을 위한 원하는 표적 유전자좌일 수 있으며, 여기서 표적 유전자의 유전자 파괴 또는 녹아웃 및 외인성 폴리뉴클레오티드의 표적화된 삽입에 의한 과발현은 세포 내의 동일한 표적 부위 또는 유전자좌에서 달성될 수 있다. 예를 들어, HDR 과정은, 유전자 파괴의 표적 부위에서 또는 가까이에서 핵산 서열에 상동성인 측면 근접하는 상동성 팔을 갖는 공여자 주형을 사용함으로써 외인성 폴리뉴클레오티드를 표적 유전자 내로 통합(예를 들어, 녹인)시키는 한편, 표 1에 기재된 임의의 표적 유전자의 발현을 제거 또는 감소시키기 위한 유전적 파괴(예를 들어, 녹아웃)를 초래하는데 사용될 수 있다.

[0802] 일부 구현예에서, 이식 유전자 또는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형, 및 DNA 핵산분해효소 시스템(예를 들어, Cas9)과 B2M 좌위, CIITA 좌위, TRAC 좌위, TRBC 좌위에 특이적인 상보적 부분을 포함하는 좌위-특이적 gRNA를 포함하는 DNA 핵산분해효소 시스템을, 공급원 세포(예를 들어, 일차 세포 또는 만능 줄기 세포, 예를 들어 iPSC) 내로 도입하는 것을 포함하는, 조작된 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 유전체 좌위는 기재된 바와 같은 임의의 좌위의 4000 bp 내, 3500 bp 내, 3000 bp 내, 2500 bp 내, 2000 bp 내, 1500 bp 내, 1000 bp 내, 또는 500 bp 내에 위치된다.

[0803] 구현예에서, 표적 유전자좌는 B2M이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 B2M 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 핵산분해효소 시스템을 이용하는 것에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, B2M 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산[gRNA] 서열은, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2016/183041호의 부록 2 또는 표 15의 서열 번호 81240-85644로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 측면 근접하는 상동성 팔을 갖는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 B2M 좌위 내로 통합된다.

[0804] 구현예에서, 표적 유전자좌는 CIITA이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CIITA 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 핵산분해효소 시스템을 이용하는 것에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, CIITA 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열은, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2016183041호의 부록 1 또는 표 12의 서열 번호 5184-36352로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 측면 근접하는 상동성 팔을 갖는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 CIITA 좌위 내로 통합된다.

[0805] 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이고, 내인성 TRAC 또는 TRBC 좌위의 발현은 유전자 편집 방법에 의해 세포에서 감소되거나 제거된다. 예를 들어, HDR 과정을 사용하여, 유전자 파괴의 표적 부위에 또는 그 근처에서 핵산 서열에 상동성인 측면 근접하는 상동성 팔을 갖는 공여자 주형을 사용함으로써 외인성 폴리뉴클레오티드를 동일한 유전자좌 내로 통합(예를 들어, 녹인)시키는 한편, TRAC 또는 TRBC 유전자의 발현을 제거 또는 감소(예를 들어, 녹아웃)시키는 유전자 파괴를 초래할 수 있다. 본원에 기재된 유전자의 CRISPR/Cas-기반 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 서열은 표 26에 제공된다. 서열은 제US20160348073호에서 찾을 수 있으며, 서열 목록을 포함하는 그 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0806] [표 26] 유전자 표적화에 유용한 예시적인 gRNA 표적화 서열

[0807]

유전자 명칭	US 20160348073에서의 서열번호
TRAC	서열번호 532-609 및 9102-9797
TRB (또한 TCRB, 및 TRBC)	서열번호 610-765 및 9798-10532

[0808] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 TRAC 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TRAC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 핵산분해효소 시스템을 이용하는 것에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, TRAC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안

내 리보핵산 서열(예를 들어, 서열을 표적화하는 gRNA)는, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US20160348073호의 서열 번호 532 내지 609 및 9102 내지 9797로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 측면 근접하는 상동성 팔을 갖는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 TRAC 좌위 내로 통합된다.

[0809] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 TRBC 유전자를 표적화하는 유전자 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자를 표적화하는 유전자 변형은 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 TRBC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열을 포함하는 표적화된 핵산분해효소 시스템을 이용하는 것에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, TRBC 유전자를 특이적으로 표적화하기 위한 적어도 하나의 안내 리보핵산 서열(예를 들어, 서열을 표적화하는 gRNA)는, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US20160348073호의 서열 번호 610 내지 765 및 9798 내지 10532로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 gRNA에 의해 표적화된 표적 부위에 인접한 서열에 상동성인 측면 근접하는 상동성 팔을 갖는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 공여자 주형을 도입함으로써 HDR에 의해 파괴된 TRBC 좌위 내로 통합된다.

[0810] 일부 구현예에서, 기술된 바와 같은 HDR-매개 통합 접근법에서 사용하기 위한 새로운 좌위 및/또는 gRNA 서열을 확인하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우, (예를 들어, 표 1에 기재된 표적 유전자 내에서) 특정 좌위에 대해 존재하는 gRNA를 알면, 보통 유전체에 걸쳐 100개의 염기쌍[bp]마다 발생하는 PAM 서열에 대한 좌위의 어느 하나의 측면상에서 측면 근접 영역을 스캐닝함으로써 이식유전자의 표적화된 삽입을 위한 추가적인 좌위를 확인하기 위해 '자벌레' 접근이 사용될 수 있다. PAM 서열은 사용되는 특정 Cas 핵산분해효소에 따라 달라질 것인데, 상이한 핵산분해효소는 대개 다른 상응 PAM 서열을 갖기 때문이다. 좌위의 어느 한 측면상에서의 측면 근접 영역은 약 500 내지 4000 bp 길이, 예를 들어, 약 500 bp, 약 1000 bp, 약 1500 bp, 약 2000 bp, 약 2500 bp, 약 3000 bp, 약 3500 bp 또는 약 4000 bp 길이일 수 있다. PAM 서열이 검색 범위 내에서 확인될 때, 유전자 파괴 방법에서의 사용을 위한 좌위의 서열에 따라 새로운 안내가 설계될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템이 예시로서 설명되지만, 기재된 바와 같은 임의의 HDR-매개 접근은 ZFN, TALEN, 메가핵산분해효소 및 전위효소를 이용하는 것을 비롯하여, 새로운 좌위를 확인하는 방법에서 사용될 수 있다.

[0811] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 외인성 CD47 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 CD47 폴리펩티드)를 암호화하고, 외인성 폴리펩티드는 본원에 개시된 바와 같은 피난항 유전자좌 또는 피난항 부위, 또는 내인성 유전자의 사일런싱 또는 감소된 발현을 유발하는 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드는 CCR5 유전자좌, PPP1R12C(AAVS1로도 알려짐) 유전자좌, CLYBL 유전자좌, 및/또는 로사 유전자좌(예를 들어, ROSA26 유전자좌)에 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRBC, PD1 또는 CTLA-4 유전자좌에 삽입된다.

[0812] **C. 세포**

[0813] 일부 구현예에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 유전자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 유전자)의 발현이 감소되거나 결실되도록 세포의 유전체가 변형되거나, 또는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드가 과발현되거나 발현이 증가되도록 조작된(또는 변형된) 세포(예를 들어, 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 이러한 줄기 세포 유래 또는 이들에서부터 생산된 분화된 세포, 조혈 줄기 세포, 또는 일차 세포), 또는 이의 집단을 제공한다(예를 들어, 관용원성 인자, 예컨대 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드).

[0814] 본원에 개시된 줄기 세포에 관한 구현예는 세포가 이러한 줄기 세포에서 유래한 상응하는 구현예를 또한 개시하는 것으로 여겨질 수 있다.

[0815] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조작된 세포는 베타 섬 세포이고, CD47 폴리펩티드를 암호화하는 제1 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 보체 억제제 또는 다른 관용원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 추가의 외인성 폴리뉴클레오티드를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 추가의 외인성 폴리뉴클레오티드는 동일한 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 추가의 외인성 폴리뉴클레오티드는 상이한 유전체 좌위 내로 삽입된다. 예시적인 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 세포는 일차 베타 섬 세포 또는 조작된(예를 들어, 저면역원성) 만능 세포(예를 들어, iPSC)에서 유래한 베타 섬 세포이다.

[0816] 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조작된 세포는 간세포이고, CD47 폴리펩티드를 암호화하는 제1 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 간세포는 본원에 기재된 하나 이상의 보체 억제제 또는 다른 관용원성 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 추가의 외인성 폴리뉴클레오티드를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 추가의 외인성 폴리뉴클레오티드는 동일한 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 추가의 외인성 폴리뉴클레오티드는 상이한 유전체 좌위 내로 삽입된다. 예시적인 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 세포는 일차 간세포 또는 조작된(예를 들어, 저면역원성) 만능 세포(예를 들어, iPSC)에서 유래한 간세포이다.

[0817] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 것과 같은 조작된 또는 변형된 세포는 만능 줄기 세포, 또는 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 세포이다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 일차 세포이다.

[0818] 세포는 척추동물 세포, 예를 들어 인간 세포 또는 마우스 세포와 같은 포유동물 세포일 수 있다. 세포는 또한 척추동물 줄기 세포, 예를 들어 포유동물 줄기 세포, 예컨대 인간 줄기 세포(또는 이러한 줄기 세포에서 유래한 세포), 또는 마우스 줄기 세포(또는 이러한 줄기 세포에서 유래한 세포)일 수 있다. 구현예에서, 세포 또는 줄기 세포, 또는 이러한 줄기 세포에서 유래한 세포는 변형 가능하다.

[0819] 구현예에서, 세포 또는 줄기 세포, 또는 이러한 줄기 세포에서 유래한 세포는 치료적 가치를 갖거나 갖는 것으로 여겨지며, 따라서 세포 또는 줄기 세포 또는 이러한 줄기 세포에서 유래한 또는 분화된 세포는 질환, 장애, 결손 또는 상해의 치료를 필요로 하는 대상에서 이를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0820] 일부 구현예에서, 세포는 줄기 세포 또는 전구세포(예를 들어, iPSC, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 줄기 또는 전구세포, 생식세포계열 줄기 세포, 폐 줄기 또는 전구세포, 유방 줄기 세포, 후각 성체 줄기 세포, 모낭 줄기 세포, 다능[multipotent] 줄기 세포, 양막 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 또는 신경 줄기 세포 또는 전구세포)이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 성체 줄기 세포(예를 들어, 체세포 줄기 세포 또는 조직 특이적 줄기 세포)이다. 일부 구현예에서, 줄기 또는 전구세포는 분화될 수 있다(예를 들어, 줄기 세포는 전능[totipotent], 만능[pluripotent], 또는 다능이다). 일부 구현예에서, 세포는 배아 또는 신생아 조직에서 단리된다. 일부 구현예에서, 세포는 섬유아세포, 단핵구 전구체, B 세포, 외분비 세포, 췌장 전구체, 내분비 전구체, 간모세포, 근아세포, 지방전구세포, 전구세포, 간세포, 연골세포, 평활근 세포, K562 인간 적혈구 백혈병 세포주, 뼈 세포, 활막 세포, 건 세포, 인대 세포, 반월상 연골[meniscus] 세포, 지방 세포, 수지상 세포, 또는 자연 살해 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 근육세포, 적혈구-거핵구 세포, 호산구, iPS 세포, 대식세포, T 세포, 섬 베타-세포, 신경세포, 심근 세포, 혈액 세포, 내분비 전구, 외분비 전구, 췌관 세포[ductal cell], 포상[acinar] 세포, 알파 세포, 베타 세포, 델타 세포, PP 세포, 또는 간세포, 담관세포 또는 갈색 지방세포로 조작(예를 들어, 전환 또는 분화)된다. 일부 구현예에서, 세포는 근육 세포(예를 들어, 골격, 평활근 또는 심근 세포), 적혈구-거핵구 세포, 호산구, iPS 세포, 대식세포, T 세포, 섬 베타-세포, 신경세포, 심근 세포, 혈액 세포(예를 들어, 적혈구 세포, 백혈구 또는 혈소판), 내분비 전구체, 외분비 전구체, 췌관 세포, 포상 세포, 알파 세포, 베타 세포, 델타 세포, PP 세포, 간세포, 담관세포, 또는 백색 또는 갈색 지방세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 호르몬-분비 세포(예를 들어, 인슐린, 옥시토신, 엔도르핀, 바소프레신, 세로토닌, 소마토스타틴, 가스트린, 세크레틴, 글루카곤, 갑상선 호르몬, 봄베신, 콜레시스토키닌, 테스토스테론, 에스트로겐, 또는 프로게스테론, 레닌, 그렐린, 아밀린, 또는 췌장 폴리펩티드를 분비하는 세포), 표피 각질형성세포, 상피 세포(예를 들어, 외분비 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 각질화 상피 세포, 담낭 상피 세포, 또는 각막의 표면 상피 세포, 혀, 구강, 식도, 항문관, 원위 요도, 또는 질), 신장 세포, 생식 세포, 골격 관절 활막 세포, 골막 세포, 뼈 세포(예를 들어, 파골세포 또는 조골세포), 연골막 세포(예를 들어, 연골모세포 또는 연골 세포), 연골 세포(예를 들어, 연골세포), 섬유아세포, 내피 세포, 심장막 세포, 수막 세포, 각질형성세포 전구세포, 각질형성세포 줄기 세포, 주피 세포[pericyte], 신경아교 세포, 뇌실막 세포, 양막 또는 태반막으로부터 단리된 세포, 또는 장막 세포 (예를 들어, 체강 라이닝을 형성하는 장막 세포)이다.

[0821] 일부 구현예에서, 세포는 체세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 피부 또는 다른 장기, 예를 들어, 심장, 뇌 또는 척수, 간, 폐, 신장, 췌장, 방광, 골수, 비장, 장, 또는 위에서 유래한다. 세포는 인간 또는 다른 포유동물(예를 들어, 설치류, 비-인간 영장류, 소 또는 돼지 세포) 유래일 수 있다.

[0822] 일부 구현예에서, 세포는 T 세포, NK 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포, 예컨대 RPE, 갑상선, 피부,

또는 간세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 조작된 iPSC에서 분화된 iPSC-유래 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 일차 세포에서 변형된 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 관용원성 인자의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 관용원성 인자는 CD47이다.

[0823] 일부 구현예에서, 세포는 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 하나 또는 그 이상의 보체 억제제의 과발현 또는 증가된 발현을 포함한다.

[0824] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 iPSC-유래 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 일차 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 보체 억제제의 과발현 또는 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포는 본원에 기재된 임의의 것을 포함하는 키메라 항원 수용체[CAR]로 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) T 세포는 본원에 기재된 임의의 것, 예를 들어 섹션 IV를 포함하는 동종 세포 치료법으로 다양한 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) T 세포를 사용하여 암을 치료할 수 있다.

[0825] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 iPSC-유래 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 일차 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 보체 억제제의 과발현 또는 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포는 본원에 기재된 임의의 것을 포함하는 키메라 항원 수용체[CAR]로 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) NK 세포는 본원에 기재된 임의의 것, 예를 들어 섹션 V를 포함하는 동종 세포 치료법으로 다양한 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) NK 세포를 사용하여 암을 치료할 수 있다.

[0826] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 iPSC-유래 베타-섬 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 일차 베타-섬 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 보체 억제제의 과발현 또는 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 베타-섬 세포는 본원에 기재된 임의의 것, 예를 들어 섹션 V를 포함하는 동종 세포 치료법으로 다양한 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 베타-섬 세포를 사용하여 당뇨병, 예컨대 I형 당뇨병을 치료할 수 있다.

[0827] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 iPSC-유래 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 일차 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 내피 세포는 본원에 기재된 임의의 것, 예를 들어 섹션 V를 포함하는 동종 세포 치료법으로 다양한 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 내피 세포를 사용하여 혈관 신생 또는 안구 질환을 치료할 수 있다.

[0828] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 iPSC-유래 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 일차 상피 세포이다. 일부 구현예에서, 상피 세포는 RPE이다. 일부 구현예에서, 상피 세포는 갑상선 세포이다. 일부 구현예에서, 상피 세포는 피부 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 상피 세포는 본원에 기재된 임의의 것, 예를 들어 섹션 V를 포함하는 동종 세포 치료법으로 다양한 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 상피 세포를 사용하여 갑상선 질환 또는 피부 질환을 치료할 수 있다.

[0829] 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 iPSC-유래 간세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된 일차 간세포이다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 상피 세포는 본원에 기재된 임의의 것, 예를 들어 섹션 V를 포함하는 동종 세포 치료법으로 다양한 증상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된(예를 들어, 저면역원성) 간세포를 사용하여 간 질환을 치료할 수 있다.

[0830] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 건강한 대상, 예컨대 치료될 특정 질환 또는 병태를 갖는 것으로 알려져 있지 않거나 의심되지 않는 대상 유래의 세포이다. 예를 들어, 세포 베타 섬 세포가 예컨대 당뇨병을 치료하기 위해 공여자 대상에서 분리되거나 수득되는 경우, 공여자 대상은 대상이 당뇨병 또는 다른 질환 또는 병태를 앓고 있는 것으로 알려지거나 의심되지 않는 경우 건강한 대상이다.

[0831] 1. 일차 세포

[0832] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작된 세포는 하나 이상의 개별 대상 또는 공여자에게서 수득되거나 단리된 일차 세포에서 유래한 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상(예를 들어, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 50 이상, 또는 100 이상)의 상이한 공여자 대상에서 수득한 단리된 일차 세포의 풀(pool)에서 유래한다. 일부 구현예에서, 복수의 상이한 공여자 대상에서 단리되거나 수득된 일차 세포(예를 들어, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 50 이상, 또는 100 이상)는 배치(batch)로 함께 풀화되고[pooled], 제공된 방법에 따라 조작된다.

[0833] 일부 구현예에서, 일차 세포는 수용자 대상(예를 들어, 세포가 투여된 환자)와 상이한 하나 이상의 공여자 대상 유래의 일차 세포의 풀에서 유래한다. 일차 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100명 이상의 공여자 대상에서 수득할 수 있고, 함께 풀화된다. 일차 세포는 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 20 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 공여자 대상에서부터 수득될 수 있고, 함께 풀화될 수 있다. 일부 구현예에서, 일차 세포는 하나 또는 복수의 개인에게서 수확되고, 일부 경우에서, 일차 세포 또는 일차 T 세포의 풀은 생체외에서 배양된다. 일부 구현예에서, 일차 세포 또는 일차 T 세포의 풀은 본원에 제공된 방법에 따라 조작되거나 변형된다.

[0834] 일부 구현예에서, 방법은 개별 공여자 대상에게서 목적하는 유형의 일차 세포(예를 들어, T 세포, NK 세포, NKT 세포, 내피 세포, 섬 세포, 베타 섬 세포, 간세포 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 일차 세포)를 수득하거나 단리하는 단계, 세포를 풀화하여 일차 세포 유형의 배치를 수득하는 단계, 및 본원에 제공된 방법에 의해 세포를 조작하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 목적하는 유형의 일차 세포(예를 들어, T 세포, NK 세포, 내피 세포, 베타 섬 세포, 간세포 또는 본원에 기재된 바와 같은 다른 일차 세포)를 수득하거나 단리하는 단계, 본원에 제공된 방법에 의해 각각의 개별 공여자의 세포를 조작하는 단계, 및 둘 이상의 개별 샘플의 조작된(변형된) 세포를 풀화하여 일차 세포 유형의 조작된 세포의 배치를 수득하는 단계를 포함한다.

[0835] 일부 구현예에서, 일차 세포는 개인에게서, 또는 하나 초과의 개별 공여자에게서 단리되거나 수득된 일차 세포의 풀에서 단리되거나 수득된다. 일차 세포는 섹션 II.C.3에 기재된 임의의 것을 포함하여, 본원에 기재된 임의의 유형의 일차 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 일차 세포는 T 세포, NK 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포, 예컨대 RPE, 갑상선, 피부, 또는 간세포에서 선택된다. 일부 구현예에서, 개별 공여자 또는 개별 공여자들의 풀에서 유래한 일차 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작된다.

[0836] 2. 유도 만능 줄기 세포의 생성

[0837] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작된 세포는 유도 만능 줄기 세포이거나, 유도 만능 줄기 세포에서 유래되거나 분화된 조작된 세포이다. 마우스 및 인간 만능 줄기 세포(일반적으로 iPSC로 지칭됨; 쥣과 세포의 경우 miPSC 또는 인간 세포의 경우 hiPSC)의 생성은 일반적으로 당업계에 알려져 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, iPSC의 생성을 위한 다양한 상이한 방법이 존재한다. 원래의 유도는 네 가지 전사 인자, Oct3/4, Sox2, c-Myc 및 Klf4의 바이러스 도입을 사용하여 마우스 배아 또는 성체 섬유아세포에서 수행되었으며, 그 전체 및 특히 그 안에 약술된 기술이 본원에 참조로 포함되는, 문헌[Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676 (2006)]을 참조한다. 이후, 다수의 방법이 개발되었으며, 검토를 위해, 문헌[Seki et al, World J. Stem Cells 7(1): 116-125 (2015)], 및 문헌[Lakshmipathy and Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013] 둘 모두를 참조하고, 특히 hiPSC를 생성하는 방법을 참조하며(예를 들어, 후자 참조문헌의 3장 참조), 이들은 명시적으로 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0838] 일반적으로, iPSC는 보통 에피솜 벡터를 이용하여 도입된 숙주 세포에서 하나 이상의 '재프로그래밍 인자'의 일시적 발현에 의해 생성된다. 이들 조건 하에서, 소량의 세포는 iPSC가 되도록 유도된다(일반적으로, 선발 마커가 사용되지 않기 때문에, 이 단계의 효율은 낮다). 세포가 일단 '재프로그래밍'되고 만능성이 되면, 이들은 에피솜 벡터(들)을 잃고 내인성 유전자를 사용하여 인자를 생산한다.

[0839] 당업자에 의해 또한 이해되는 바와 같이, 사용되거나 사용될 수 있는 재프로그래밍 인자의 수는 변할 수 있다. 통상적으로, 더 적은 재프로그래밍 인자가 사용될 때, 세포가 만능 상태로 형질전환하는 효율이 떨어지고, 또한 '만능성'도 떨어지며, 예를 들어, 더 적은 재프로그래밍 인자는 완전히 만능이 아니지만 단지 더 적은 수의 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포를 초래할 수 있다.

[0840] 일부 구현예에서, 단일 재프로그래밍 인자, OCT4가 사용된다. 다른 구현예에서, 두 개의 재프로그래밍 인자인 OCT4 및 KLF4가 사용된다. 다른 구현예에서, 세 개의 재프로그래밍 인자인 OCT4, KLF4 및 SOX2가 사용된다. 다

른 구현예에서, 네 개의 재프로그래밍 인자들, OCT4, KLF4, SOX2 및 c-Myc가 사용된다. 다른 구현예에서, SOKMNLT; SOX2, OCT4(POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28, 및 SV40L T 항원에서 선택된 5, 6 또는 7개의 재프로그래밍 인자가 사용될 수 있다. 일반적으로, 이들 재프로그래밍 인자 유전자는 당업계에 알려져 있고, 시판되는 에피솜 벡터상에 제공된다.

[0841] 일부 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자를 형질감염시키기 위해 사용되는 숙주 세포는 비-만능 줄기 세포이다. 일반적으로, 당업계에 공지된 바와 같이, iPSC는 본원에 기재된 바와 같은 재프로그래밍 인자를 일시적으로 발현시킴으로써 비-만능 세포, 예컨대, 혈액 세포, 섬유아세포 등으로부터 제조되지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 비-만능 세포, 예컨대 섬유아세포는 세포를 재프로그래밍하기 전에 하나 이상의 개별 대상 또는 공여자에게서 수득되거나 단리된다. 일부 구현예에서, iPSC는 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 50개 이상, 또는 100개 이상의) 상이한 공여자 대상에서 수득된 단리된 비-만능 줄기 세포, 예를 들어 섬유아세포의 풀로부터 제조된다. 일부 구현예에서, 섬유아세포와 같은 비-만능 세포는 복수(예를 들어, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 50 이상, 또는 100 이상)의 상이한 공여자 대상에서 단리 또는 수득되고, 하나의 배치 내에 함께 풀화되고, iPSCs로서 재프로그래밍되고, 제공된 방법에 따라 조작된다.

[0842] 일부 구현예에서, iPSC는 수용체 대상(예를 들어, 세포를 투여받은 환자)와 상이한 하나 이상의 공여자 대상에서 유래한 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포)의 풀에서 세포 내로 하나 이상의 리프로그래밍 인자를 일시적으로 형질감염시킴으로써 유래된다. iPSC로 유도될 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포)는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100명 이상의 공여자 대상에서 수득할 수 있고, 함께 풀화된다. 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포)는 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 또는 20 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 공여자 대상에서 수득되고, 함께 풀화될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포)는 하나 또는 복수의 개인으로부터 수확되고, 일부 경우에서, 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포) 또는 비-만능 세포의 풀(예를 들어, 섬유아세포)는 시험관 내에서 배양되고, iPSC의 생성을 유도하기 위해 하나 이상의 리프로그래밍 인자로 형질감염된다. 일부 구현예에서, 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포) 또는 비-만능 세포의 풀(예를 들어, 섬유아세포)는 본원에 제공된 방법에 따라 조작되거나 변형된다. 일부 구현예에서, 조작된 iPSC 또는 조작된 iPSC의 풀은 이후 생물 및 조직의 임의의 세포로의 분화를 위해 분화 과정을 거친다.

[0843] 일단 조작된 iPSC가 생성되면, 이들은 제WO2016183041호 및 제WO2018132783호에 기재된 바와 같이 저면역원성 및/또는 만능성 보유에 대해 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성은 제WO2018132783호의 도 13 및 도 15에 예시된 바와 같이 다수의 기술을 이용하여 분석된다. 이러한 기술에는 동종이계 숙주로의 이식 및 숙주 면역계를 벗어나는 저면역원성 만능 세포 성장(예를 들어, 기형종)에 대한 모니터링이 포함된다. 일부 예에서, 저면역원성의 만능 세포 유도체는 발광효소를 발현시키도록 형질도입되고, 생물발광 영상화를 이용하여 추적될 수 있다. 유사하게, 이러한 세포에 대한 숙주 동물의 T 세포 및/또는 B 세포 반응은 세포가 숙주 동물에서 면역 반응을 야기하지 않는다는 것을 확인하기 위해 시험된다. T 세포 반응은 Elispot, ELISA, FACS, PCR 또는 질량 세포 분석(CYTOF)에 의해 평가될 수 있다. B 세포 반응 또는 항체 반응은 FACS 또는 Luminex를 사용하여 평가된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 세포는 이의 선천적 면역 반응, 예를 들어 NK 세포 사멸을 피하는 능력에 대해 분석될 수 있으며, 이는 제WO2018132783호의 도 14 및 도 15에 일반적으로 나타낸 바와 같다.

[0844] 일부 구현예에서, 세포의 면역원성은 당업자에 의해 인식되는 T 세포 증식 분석, T 세포 활성화 분석, 및 T 세포 사멸 분석과 같은 T 세포 면역분석을 사용하여 평가된다. 일부 경우에서, T 세포 증식 분석은 세포를 인터페론-감마로 전처리하고, 세포를 표지된 T 세포와 공동배양하고, 미리 선택된 시간 후에 T 세포 집단(또는 증식하는 T 세포 집단)의 존재를 분석하는 것을 포함한다. 일부 경우에서, T 세포 활성화 분석은 T 세포를 본원에 약술된 세포와 함께 공동배양하고, T 세포에서 T 세포 활성화 마커의 발현 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[0845] 생체내 분석은 본원에 약술된 세포의 면역원성을 평가하기 위해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 또는 변형된 iPSC의 생존 및 면역원성은 동종이계 인간화된 면역결핍 마우스 모델을 이용하여 결정된다. 일부 예에서, 조작된 또는 변형된 iPSC는 동종이계 인간화된 NSG-SGM3 마우스에 이식되고, 세포 거부, 세포 생존 및 기형종 형성에 대해 분석된다. 일부 경우에서, 생착된 조작된 iPSC 또는 그의 분화된 세포는 마우스 모델에서 장기간 생존을 나타낸다.

[0846] 세포의 저면역원성을 포함한 면역원성을 결정하기 위한 추가의 기술은 예를 들어, 문헌[Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 및 Han et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446]에

기재되어 있으며, 도면, 도면 범례, 및 방법의 설명을 포함한 그 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0847] 유사하게, 만능성의 보유는 다양한 방식으로 시험된다. 일부 구현예에서, 만능성은 일반적으로 본원에 기재되고 제WO2018132783호의 도 29에 나타낸 바와 같은 특정 만능성-특이적 인자의 발현에 의해 분석된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 만능 세포는 만능성의 표시로서 하나 이상의 세포 유형으로 분화된다.

[0848] 일단 조작된 만능 줄기 세포(조작된 iPSC)가 생성되면, 이들은 iPSC를 유지하기 위해 알려진 바와 같이 미분화 상태로 유지될 수 있다. 예를 들어, 세포는 분화를 방지하고 만능성을 유지하는 배지를 사용하여 매트리겔(Matrigel)에서 배양될 수 있다. 추가적으로, 이들은 만능성을 유지하기 위한 조건 하에서 배지에 있을 수 있다.

[0849] 본원에 기재된 임의의 만능 줄기 세포는 생물 및 조직의 임의의 세포로 분화될 수 있다. 일 양태에서, 본원은, 수용자 대상으로의 후속 이식을 위해 iPSC에서 상이한 세포 유형으로 분화되는 조작된 세포를 제공한다. 분화는 일반적으로 세포-특이적 마커의 존재를 평가함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 분석될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화된 조작된(예를 들어, 저면역원성) 만능 세포 유도체는 세포 유형 및 이들 세포의 궁극적인 용도 둘 모두에 따라 달라지는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 이식될 수 있다. 예시적인 유형의 분화된 세포 및 이의 제조 방법이 하기에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, iPSC는 섹션 II.C.3에 기재된 임의의 것을 포함하여 본원에 기재된 임의의 유형의 세포와 구별될 수 있다. 일부 구현예에서, iPSC는 T 세포, NK 세포, 베타 섬 세포, 내피 세포, 상피 세포, 예컨대 RPE, 갑상선, 피부 또는 간세포에서 선택된 세포 유형으로 분화된다. 일부 구현예에서, 숙주 세포, 예컨대 비-만능 세포(예를 들어, 섬유아세포)를 개별 공여자 또는 개별 공여자들의 풀에서 단리하거나 수득하고, 이어서 iPSC로 생성하고, 여기서 iPSC는 이어서 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하도록 조작되고, 이어서 목적하는 세포 유형으로 분화된다.

[0850] 3. 세포 유형

[0851] 본 명세서의 개시로부터, 본 개시의 구현예는 다수의 상이한 셀 유형에 적용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 본원에 기재된 임의의 세포 유형에 관한 구현예는 안전 스위치를 설명하는 구현예뿐만 아니라 본원에 기재된 바와 같은 HIP 세포, CAR 세포 및 다른 변형/유전자 편집 세포를 설명하는 구현예와 용이하고 적절하게 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0852] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 제조되는 세포 치료제가 줄기 세포 유래 세포로 구성되는 경우, 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같은, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 또한 (예를 들어 유전체-편집된) 줄기 세포(즉, 분화 전)을 사용 및/또는 줄기 세포 유래 세포(즉, 분화 후)를 사용하여 수행될 수 있다.

[0853] a. 베타-섬 세포

[0854] 췌장은 호르몬을 생산하는, 섬[islet]으로 알려진 세포들의 군집을 함유한다. 섬에는 여러 가지 다른 유형의 세포가 있다. 예를 들어, 알파 세포는 글루카곤을 생산하고, 델타 세포는 소마토스타틴을 생산하고, 베타 세포는 인슐린을 생산한다. 일차 췌장 섬 세포의 샘플은 적어도 알파 세포, 델타 세포 및 베타 세포를 포함할 수 있다.

[0855] 세포 치료제에 사용되는 본원에 기재된 베타-섬 세포는 세포 치료제에서 알파 세포 및 델타 세포와 함께 존재할 수 있다. 세포 치료제에 사용되는 섬 세포는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 치료제는 최대 5, 10, 15, 20, 25, 35, 또는 40%의 알파 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제는 10, 15, 20, 25, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80% 이하의 베타 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 25%의 델타 세포를 포함한다.

[0856] 세포 치료제에 사용되는 베타-섬 세포는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일될 수 있다.

[0857] 세포 치료제에 사용되는 베타-섬 세포는 일차(예를 들어, 유전체-편집) 췌장 섬 세포일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 췌장 섬 세포상에서 수행될 수 있다.

[0858] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 베타-섬 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 베

타-섬 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 또한 베타-섬 세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대한 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 또한 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 베타-섬 세포상에서 수행될 수 있다.

[0859] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 베타-섬 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 베타-섬 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 베타-섬 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 베타-섬 세포는 세포 치료제 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[0860] 본원에 기재된 베타-섬 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0861] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 조작된 또는 변형된 세포는 일차 베타 섬 세포(췌장 섬 세포 또는 췌장 베타 세포로도 지칭됨)이다. 일부 구현예에서, 일차 베타 섬 세포는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개인에서 베타 섬 세포를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 대상(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 베타 섬 세포가 본원에 제공된다.

[0862] 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 취득)된다. 일부 구현예에서, 일차 베타 섬 세포는, 베타 섬 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 포함하는 하나 이상의 인간)에서 유래하도록, 베타 섬 세포의 풀에서부터 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 베타 섬 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여되는 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 베타 세포의 풀이 수득되는 하나 이상의 공여자 대상은 환자와 상이하다.

[0863] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포는, 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, 베타 섬 세포로 분화되는, 조작된 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 일부 구현예에서, 다양한 베타 섬 세포로 분화된 세포는 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 췌장 섬 세포는 본원에 기재된 조작된 만능 세포에서 유래한다. 만능 줄기 세포를 췌장 섬 세포로 분화시키는 유용한 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 제US9,683,215호, 미국 특허 번호 제US9,157,062호, 및 미국 특허 번호 제US8,927,280호, 미국 특허 공개 제2021/0207099호, 문헌[Hogrebe et al., "Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluoripotent stem cells," Nat. Biotechnol., 2020, 38:460-470; 및 Hogrebe et al., "Generation of insulin-producing pancreatic beta cells from multiple human stem cell lines," Nat. Protoc., 2021]에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0864] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 만능 세포는 I형 진성 당뇨병[type I diagetes, melitus, T1DM]을 다루기 위한 이식을 위해 베타-유사 세포 또는 섬 장기유사체[organoid]로 분화된다. 세포계는 T1DM을 다루는데 유망한 방식이며, 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는, 문헌[Ellis 등, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 Oct;14(10):612-628]을 참조한다. 추가적으로, 문헌[Pagliuca et al. (Cell, 2014, 159(2):428-39)]은 hiPSC에서 β-세포의 성공적인 분화에 대해 보고하고 있으며, 이의 내용은 그 전체가, 특히 인간 만능 줄기 세포에서 기능적 인간 β 세포의 대규모 생산에 대해 거기 약술된 방법 및 시약에 대해, 본원에 참조로 포함된다). 또한, 문헌[Vegas et al.]은 인간 만능 줄기 세포에서 인간 β 세포 생산 후, 숙주에 의한 면역 거부를 회피하기 위한 캡슐화를 보여주며, 문헌[Vegas et al., Nat Med, 2016, 22(3):306-11]은 그 전체가, 특히 인간 만능 줄기 세포에서 기능적 인간 β 세포의 대규모 생산에 대해 거기 약술된 방법 및 시약에 대해, 본원에 참조로 포함된다.

[0865] 일부 구현예에서, 시험관내 분화에 의해 조작된 만능 세포 집단에서 조작된 췌장 섬 세포 집단을 생산하는 방법은 다음 단계들: (a) 조작된 iPSC의 집단을, 인슐린-유사 성장 인자, 형질전환 성장 인자, FGF, EGF, HGF, SHH, VEGF, 형질전환 성장 인자-b 초족, BMP2, BMP7, GSK 억제제, ALK 억제제, BMP 1형 수용체 억제제, 레티노산으

로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 인자를 포함하는 제1 배지에서 배양하여, 미성숙 췌장 섬 세포 집단을 생산하는 단계, 및 (b) 제1 배지와 상이한 제2 배지에서 미성숙 췌장 섬 세포 집단을 배양하여, 조작된 췌장 섬 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, GSK 억제제는 CHIR-99021, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, GSK 억제제는 약 2 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, ALK 억제제는 SB-431542, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, ALK 억제제는 약 1 pM 내지 약 10pM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 제1 배지 및/또는 제2 배지에는 동물 혈청이 없다.

[0866] 분화는 인슐린을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 β 세포 연관 또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 일반적으로 당업계에 공지된 바와 같이 분석된다. 분화는 또한 글루코스 대사의 측정과 같이 기능적으로 측정될 수 있으며, 일반적으로 그 전체가 그리고 특히 거기에 약술된 바이오마커에 대해 본원에 참조로 포함되는, 문헌 [Muraro et al., Cell Syst. 2016 Oct 26; 3(4): 385-394.e3]을 참조한다. 일단 베타 세포가 생성되면, 이들은 문맥/간, 대망[omentum], 위장 점막, 골수, 근육 또는 피하 주머니 내로(본원에 논의된 바와 같이, 세포 현탁액으로서 또는 겔 기질내에서) 이식될 수 있다.

[0867] 본 기술에서의 사용을 위한 포함하는 췌장 섬 세포의 추가적인 설명은 그 개시 내용 전체가 본원에 참조로 포함된 제WO2020/018615호에서 찾을 수 있다.

[0868] 일부 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 베타 섬 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포 집단은, 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[0869] 예시적인 췌장 섬 세포 유형은 췌장 섬 전구세포, 미성숙 췌장 섬 세포, 성숙 췌장 섬 세포 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 췌장 세포는 당뇨병을 치료하기 위해 대상에게 투여된다.

[0870] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 조작된 췌장 섬 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 베타 섬 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포는 인슐린을 분비한다. 일부 구현예에서, 췌장 섬 세포는 내인성 췌장 섬 세포의 적어도 두 개의 특징, 예를 들어, 글루코스에 반응한 인슐린의 분비 및 베타 세포 마커의 발현을 나타내지만, 이에 제한되지 않는다.

[0871] 예시적인 베타 세포 마커 또는 베타 세포 전구체 마커는 c-펩티드, Pdx1, 글루코스 수송체 2[glucose transporter 2, Glut2], HNF6, VEGF, 글루코키나제[glucokinas, GCK], 프로호르몬 전환효소(PC 1/3), Cdcp1, NeuroD, Ngn3, Nkx2.2, Nkx6.1, Nkx6.2, Pax4, Pax6, Ptf1a, Isl1, Sox9, Sox17 및 FoxA2를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0872] 일부 구현예에서, 췌장 섬 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 베타 섬 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포는 글루코스의 증가에 반응하여 인슐린을 분비한다. 각종 구현예에서, 췌장 섬 세포는 글루코스의 증가에 반응하여 인슐린을 분비한다. 일부 구현예에서, 세포는 조약돌 세포 형태 및/또는 약 17 pm 내지 약 25 pm의 직경과 같이 구별된 형태를 갖는다.

[0873] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 베타 섬 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 베타 섬 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 하나 이상의 보체 억제제를 추가로 발현한다. 특정 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, B2M 유전자에서 유전자 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 하나 이상의 보체 억제제를 추가로 발현한다. 일부 구현예에서, 조작된 베타 섬 세포는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, CIITA 유전자에서 유전자 변형을 보유한다. 일부 구현예에서, 베타 섬 세포는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 B2M 및 CIITA 및 유전자를 파괴하는 유전자 변형을 보유한다.

[0874] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 베타 섬 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작

된 베타 섬 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 베타 섬 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 베타 섬 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0875] 일부 구현예에서, 투여된 세포의 수는 면역원성 세포에(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 발현의 내인성 수준을 갖는, 예를 들어, 조작된 세포의 변형, 예를 들어 유전자 변형을 함유하지 않는 동일하거나 유사한 세포 유형 또는 표현형의 세포 집단에 요구되는 것보다 더 적은 투약량이다.

[0876] b. 간세포

[0877] 세포 치료제에서 사용되는 간세포는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[0878] 세포 치료제에서 사용되는 간세포는 일차 간세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 간세포를 이용하여 수행될 수 있다.

[0879] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 간세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 간세포이다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 분화하여 간세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 간세포상에서 수행될 수도 있다.

[0880] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 간세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 간세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함하며, 예를 들어 제WO2022081760호, 제WO2022164807A2호, 제WO2016200340A1호에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에 기재된 간세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 간 세포는 세포 치료제 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[0881] 본원에 기재된 간세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0882] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 조작된 또는 변형된 세포는 일차 간세포이다. 일부 구현예에서, 일차 간세포는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개인에서 간세포를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 대상(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 간세포가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 일차 간세포는 간세포 기능의 상실 또는 간경변을 다루기 위해 세포 치료법으로서 투여될 수 있다.

[0883] 일부 구현예에서, 일차 간세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 취득)된다. 일부 구현예에서, 일차 간세포는, 간세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 포함하는 하나 이상의 인간)에서 유래하도록, 간세포의 풀에서부터 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 간세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여되는 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 간세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 베타 세포의 풀이 수득되는 하나 이상의 공여자 대상은 환자와 상이하다.

[0884] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포는, 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, 간세포로 분화되는, 조작된 iPSC에서 분화된 간세포이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 일부 구현예에서, 간세포로 분화된 세포는 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포에서 분화된 조작

된 간 세포는 간세포 기능의 상실 또는 간경변을 다루기 위해 세포 치료법으로서 투여될 수 있다.

[0885] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변형을 함유하는 조작된 만능 세포는 간세포로 분화된다. 조작된 만능 세포를 간세포로 분화시키기 위해 사용될 수 있는 다수의 기술이 있으며, 예를 들어, 그 전체가, 그리고 특히 분화를 위한 방법론 및 시약에 대해 본원에 참조로 포함된, 문헌[Pettinato et al., doi: 10.1038/spre32888, Snykers et al., Methods Mol Biol, 2011 698:305-314, Si-Tayeb et al., Hepatology, 2010, 51:297-305 및 Asgari et al., Stem Cell Rev, 2013, 9(4):493-504]을 참조한다. 분화는 일반적으로 알부민, 알파 태아단백질 및 피브리노겐을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 회합된 간세포 및/또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 분석될 수 있다. 분화는 또한 암모니아의 대사, LDL 저장 및 흡수, ICG 흡수 및 방출, 글리코겐 저장과 같이, 기능적으로 측정될 수도 있다.

[0886] 일부 구현예에서, 조작된 간세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 간세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 간세포는, 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, 간세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[0887] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 간세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 간세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 간세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다.

[0888] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 간세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 간세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 간세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 간세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 간세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0889] 본원에 개시된 구현예에서 사용되는 세포는 간세포, 예를 들어 간세포 집단일 수 있다. '세포', 예를 들어, 아래에서 '간세포'에 대한 임의의 지칭은, 본 출원에 기재된 바와 같은 '세포 집단' 예를 들어, '간세포 집단'에도 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0890] 간세포는 간의 주요 기능 세포이다. 간세포는 중심 정맥 주위에 압축되어 있으며, (담도, 간정맥 및 간동맥으로 이루어지는) 간세동이는 소엽의 가장자리에서 발견된다. 간세포는 소엽에서 세포의 대부분을 형성하는 한편, 몇몇 다른 세포 유형이 도관 및 맥관 망, 및 장기의 면역 감시를 형성하는데 필수적이다. 간에서 기타 주요한 세포 유형은 담도 세포(담관세포), 간 동양혈관 내피 세포, 맥관 내피 세포, PiT 세포를 포함하는 면역 세포, 쿠퍼(Kupffer) 세포 및 간 성상세포를 포함한다. 간 소엽 내에서, 간세포는 중심 정맥 또는 소엽의 말단에 위치된 간세동이에 대한 근접성에 의해 결정되는 세 개의 상이한 영역에 분포된다. 상이한 영역에 있는 간세포는 상이한 틈새[niche] 환경에 노출되고, 간에서의 특이적인 기능적 역할을 수행한다. 이들은 상이한 마커의 발현, 글루코스 및 지질 대사 기능에 의해 구별될 수 있다.

[0891] 간세포는 놀랍게도 많은 대사성, 내분비성 및 분비 기능을 수행한다. 간 질량의 대략 80%는 간세포에 의한 것이다. 간세포 기능은 글루코스 저장, 이온 섭취, 담즙염 분비, 아미노산 대사 기능, 우레아 합성 및 약물 대사 기능 시험에 의해 평가될 수 있다.

[0892] '간세포'라는 용어는 일반적으로 간의 세포질 질량의 70-80%를 구성하는 세포를 지칭한다. 간세포는 단백질 합성, 단백질 저장 및 탄수화물의 변환, 콜레스테롤, 담즙염 및 인지질의 합성, 및 외인성 및 내인성 물질의 독소제거, 변형 및 배출에 관련된다. 간세포는 담즙의 형성 및 분비도 개시한다. 간세포는 혈청 알부민, 피브리노겐 및 혈액 응고 인자 중 프로트롬빈 군을 제조하며, 지질단백질, 세룰로플라스민, 트랜스페린, 보체 및 당단백질의 합성을 위한 주요 부위이다. 추가적으로, 간세포는 약물 및 살충제와 같은 외인성 화합물 및 스테로이드와 같은 내인성 화합물을 대사, 독소제거, 및 불활성화하는 능력을 갖는다.

[0893] 간세포의 약물 대사 기능은 시토크롬 P450(cytochrome P450, CYP)에 의해 매개된다. CYP는 대부분의 약물의 산화적 생체내 변환을 촉매할 수 있는 주요 효소 족을 구성한다. 약물의 90%는 여섯 개의 주요 CYP(CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP2B6 및 CYP2D6)에 의해 대사된다. CYP 기능은 특이적 약물을 이용한 유도에 의해 향상될 수 있다. CYP 기능 및 약물 유도 반응은 실험실에서 제조된 간세포의 기능적 성숙도를 평가하기 위해 사용되는 주요한 중요 기준이다. 간세포는 각종 방법을 이용하여 배아 및 태아 조직에서 유도되는 한편, 여섯 개

의 주요 CYP의 활성 및 이들의 약물 유도에 대한 반응에 의해 결정되는 바와 같은 이러한 간세포의 성숙도 및 기능성은 이들이 기능적으로 미성숙함을 보여주었다. 따라서, 간세포 유도 분야에서 알려진 현재의 방법들은 산업적이나 임상적 적용 모두에 대해 기능적으로 성숙한 간세포를 많은 수로 수득하는 문제를 해결하지 못하고 있다.

[0894] 본원에 개시된 세포 집단은 간세포 및/또는 간세포 전구체를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 세포 집단에는 간세포 및/또는 간세포 전구체가 고도로 농축될 수 있다. '고도로 농축된[highly enriched]'이라 함은, 관심 대상의 세포 유형(들)이 세포 조성물 중 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 예를 들어, 세포 조성물 중 약 95% 이상, 또는 98% 이상이 될 것임을 의미한다. 즉, 집단은 관심 대상의 세포 유형(들)의 실질적으로 순수한 조성물일 수 있다. 일부 경우에서, 관심 대상의 세포 집단은 조생의 제제를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 세포 집단은 여과되거나 여과되지 않은, 해리된 조직에서 제조될 수 있다. 간세포 및/또는 간세포 전구체를 함유하는 세포 집단은, 예를 들어, 단리 및/또는 제조 방법에 따라, 예를 들어 이에 제한되지는 않지만, 간 비-실질 세포[hepatic non-parenchymal cell, NPC], 비-간세포 연관 세포(예를 들어, 성상 세포, 쿠퍼 세포, 내피 세포, 담관 세포, 등), 면역 세포(예를 들어, WBC), RBC, 등을 포함하는 각종 비-간세포인 세포 유형을 포함하거나 배제할 수 있다. 일부 경우에서, 세포 집단은 간세포 및/또는 간세포 전구체의 순수하거나 본질적으로 순수한 제제일 수 있다.

[0895] 본원에 개시된 바와 같은 간세포는 간에 있는 재생성 세포 공급원에서 수득될 수 있다.

[0896] 생체내에서, 간은 인간 신체 중 가장 재생성이 높은 장기 중 하나이다. 인간의 간은 그 질량의 2/3까지 손실될 수 있는데, 이의 중요한 기능은 유지하고, 8-15일 내에 원래의 질량으로 회복할 수 있다. 연구는, 간 부분 절제술에서의 회복 동안, 간의 모든 영역에서, 담도 세포를 비롯하여, 간세포가 증식함을 보여주었다. 최근의 계통추적 실험으로, 정상의 간 항상성 및 간 손상 동안 모두에서, 간의 상이한 영역들, 중심 정맥 또는 간세동이 가까이에서 증식하는 간세포를 확인하였다. 간세포 외에, 손상 동안 상해를 입은 간세포들을 보충할 수 있는, 잠재적인 증식 세포가 담도 영역에서 확인되었다. 따라서, 본원에 개시된 간세포는 성인 인간 간에서의 성인 간 줄기 세포의 단리를 통해 수득될 수 있다.

[0897] 간 줄기 세포의 다세포성 기원은, 간에서 줄기 세포를 단리 및 유도하는데 상이한 방법들이 사용될 수 있음을 제안한다. 임상적 이익을 전달하기 위한, 손상된 간세포에서 의미있는 재증식을 위해 간 줄기 세포를 성공적으로 단리 및 확장하고, 추가로 이들을 기능성 간세포로 분화하는 능력은 간 줄기 세포 생물학자에게는 최우선이 되어 왔다. 오늘날까지, 장기간 동안 시험관내에서 안정하게 확장될 수 있는 성인 간 조직에서 줄기 세포를 단리하는 두 개의 군이 보고되었다. 그러나, 이들 줄기 세포에서 유래한 간세포는 기능적으로 미성숙하고, 임상적 및 산업적 적용에서의 이용에 비적합하다.

[0898] 일부 구현예에서, 분화된 간세포는 건강한 인간 또는 iPSC에서 단리된 간 줄기 세포에서 분화된다.

[0899] 간 줄기 세포 또는 iPSC는 건강한 환자에서 수득될 수 있다.

[0900] 일부 구현예에서, 간세포 또는 간세포 집단은 예를 들어, 인간 간과 같은 하나 이상의 포유동물 간에서 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 세포 집단 또는 다중 세포 집단, 또는 다중 세포 집단의 모든 조작된 세포를 비롯한 조작된 세포는 모두 단일 인간의 간, 예컨대 하나의 시체 공여자의 간에서 유래 또는 제조될 수 있다. 세포 집단의 세포는 모두 하나의 종(예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 돼지, NHP, 등)일 수 있거나, 둘 이상의 종의 혼합물(즉, 이종성 혼합물)일 수 있다. 간의 공급원은 다양할 수 있으며, 예를 들어 절제된 간 조직, 인간 시체의 간, 키메라(예를 들어, 인간화된) 간, 생물반응기 간, 등을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 세포 집단은 예컨대 분해, 관류, 여과, 분급 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 편리한 방법에 따라 및/또는 이를 포함하여, 간 전체 및 간 일부를 비롯한 간에서 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 또는 세포 집단의 인간 간세포 모두 또는 본질적으로 모두는 단일 공여자의 간 또는 단일 공여자의 간의 일부에서 유래할 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 또는 세포 집단의 인간 간세포 모두 또는 본질적으로 모두는 다수의 상이한 공여자의 간 또는 다수의 상이한 공여자의 간의 일부에서 유래할 수 있다. 일부 경우에서, 다중 세포 집단은 단일 공여자의 간에서 유래될 수 있으며, 이는 예를 들어, 단일 인간 간에서 채집된 일차 인간 간세포가, 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 등을 포함하는 수 배로 확장하여, 예를 들어 복수의 대상을 치료하는데 유용한, 복수의 세포 집단을 생성하는 경우를 포함한다.

[0901] 일부 경우에서, 간세포 또는 또는 간세포 집단은 배양된 간세포 및/또는 배양된 간세포 전구체에서 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 세포 집단은, 일차 인간 간세포[primary human hepatocytes, PHH]를 포함하는 인간 간에

서 제조된 세포 집단을 포함하는 일차 간 세포 제제에서 제조될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 집단은 예를 들어 인간 공여자 유래의, 임의의 공급원에 대해 표준 기술을 이용하여 단리된 간세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 간세포는 선별된 시체 공여자에서 단리된 PHH이며, 이는 신선한 PHH 또는 동결보존된 PHH를 포함한다. 일부 경우에서, 세포 집단의 PHH는, 간에서 단리된 이래로 세포 주기/분열이 없거나 최소 횟수로 진행된 것으로, 이는 예를 들어 1 이하, 2 이하, 3 이하, 4 이하, 5 이하, 6 이하, 7 이하, 8 이하, 9 이하, 10 이하의 주기/분열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0902] 일부 경우에서, 간세포 및/또는 간세포 전구체를 함유하는 세포 집단은 불멸화 세포주가 아닌 세포 또는 그렇지 않으면 본질적으로 영구적으로 증식되는 세포주가 아닌 세포에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 세포 집단의 간세포 및/또는 간세포 전구체는, 일차 간세포, 및 예를 들어 일차 간세포의 비-불멸화된 자손을 포함하는 일차 간세포의 자손에서 유래될 수 있다.

[0903] 일부 경우에서, 세포 집단은 간세포 전구체를 포함할 수 있거나, 또는 특이적으로 배제할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '간세포 전구체' 및 '간세포의 전구체', 등은, 간세포가 유래되는 세포 및/또는 간세포로 분화되는 세포를 일반적으로 지칭한다. 일부 경우에서, 간세포 전구체는, 본질적으로 간세포로만 분화되는 전구체를 의미하는 전용[committed] 전구체일 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 전구체는 다양한 능력을 가질 수 있으며, 예를 들어, 만능, 다능 또는 전능성 전구체일 수 있다. 간세포 전구체는 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 배아 줄기[ES] 세포, 간세포-유사 세포[HLC], 등을 포함하거나, 이로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 전구체는, 예를 들어 간세포의 탈분화 및/또는 다른 간 세포 유형 또는 비-간세포 유형의 전환분화[transdifferentiation]를 통해, 성숙한 간세포 및/또는 다른 비-간세포 세포에서부터 유래될 수 있다.

[0904] 본원에 개시된 간세포 또는 간세포 세포 집단, 또는 하위집단은 간세포의 확장된 세포 집단을 포함하며, 이는 예를 들어 단일 공여자에서 수득한 다수의 개별 간세포 또는 다수의 공여자에서 수득한 다수의 개별 간세포를 비롯한, 다수의 개별 세포에서 유래되거나 이의 후손일 수 있다. 일차 세포 집단이 단일 공여자에서 유래된 경우, 그러한 다수의 개별적인 세포는 본질적으로 동일한 공여자 유전체를 공유하지만, 클로닝에 의한 유래가 아니고, 단클론성이 아니며, 일부 경우에서, 예를 들어 상이한 유전자 변이, 상이한 후생적 변이, 공여자 간에서 상이한 대상분포[zonation], 유전자 발현에서의 차이 등을 피롯한 서로 상이한 특정의 차이를 함유할 수 있다. 따라서, 클로닝으로 유래된 세포 집단에 대조적으로, 단일 공여자 또는 다수의 공여자 유래의 일차 간세포를 포함하는, 복수의 개별적인 일차 간세포에서 확장된 세포 집단은, 비-단클론성으로 지칭될 수 있거나, 일부 경우에서, 그러한 확장된 세포는 다중클론성 또는 비-클로닝 확장성인 것으로서 지칭될 수 있다. 일부 경우에서, 본 개시의 유전자 변형은 개별적인 일차 간세포(또는 이의 자손)상에서 수행되어 조작된 간세포의 비-단클론성 집단을 생성할 수 있으며, 그러한 세포는 확장되어 비-단클론성인 조작된 간세포의 확장된 집단을 생성할 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 집단은 이후 유전자 변형되어 비-단클론성으로 조작된 간세포의 확장된 집단을 생성하는, 본질적으로 다중클론성 집단을 생성하도록 확장될 수 있다.

[0905] 세포 치료법에 사용되는 경우 간세포의 원하는 특징 일부가 본원에 기재된다.

[0906] 일부 구현예에서, 간세포 및/또는 간세포 전구체, 및/또는 그러한 간세포 및/또는 간세포 전구체가 유래되어지는 간, 대상, 및/또는 세포 배양물은 건강한 간세포 및/또는 간세포 전구체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, '건강한 간세포 및/또는 간세포 전구체'는 정상의 간세포 표현형을 나타내고/거나 기능적 및/또는 유전적 결핍 또는 결함이 본질적으로 없는 유전형을 나타내는 세포, 또는 제WO22164807A2호(이의 내용은, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다)에 기재된 바와 같이, 정상의 간 및/또는 간세포 연관된 기능에 영향을 미칠 수 있는 세포를 의미한다. 간세포 연관 기능은, 예를 들어, 간 대사(예를 들어, 간세포 대사), 암모니아 대사, 아미노산 대사(생합성 및/또는 이화작용 포함), 독소제거, 간 단백질(예를 들어, 알부민, 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자(예를 들어, 인자 V, VII, IX, X, XI, 및 XII), 단백질 C, 단백질 S, 항트롬빈, 지질단백질, 세룰로플라스민, 트랜스페린, 보체 단백질) 합성과 같이, 간에서 간세포에 의해 우선적으로 또는 독점적으로 실시되는 기능들을 포함한다. 간세포 및/또는 간세포 전구체는 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형(들) 전, 동안, 및/또는 후에 건강할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 간세포 및/또는 간세포 전구체는 예를 들어, 이종성 이식유전자를 기능적으로 통합하고/하거나 하나 이상의 내인성 좌위를 변형하기 위하여, 세포의 유전자 변형 전 및 후에 건강한 세포일 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 및/또는 간세포 전구체는, 결함성 질환 연관된 대립유전자 또는 좌위의 교정 후 건강하다.

[0907] 건강한 간세포 및0/또는 간세포 전구체는, 예를 들어 이에 제한되지 않지만, 유전적 담즙정체 장애, 윌슨병, 유전성 혈색소증, 티로신혈증, 알 항트립신 결핍, 요소 회로 장애, 크리글러-나자르(Crigler-Najjar) 증후군, 가

족성 아밀로이드 다발신경병증[familial amyloid polyneuropathy], 원발성 고수산뇨증[hyperoxaluria] 1형, 비정형 용혈 요독 증후군-1 등을 포함하는 간-연관 단일유전자 질환과 연관된 유전적 이상을 보유하는 세포를 일반적으로 배제할 것이다. 따라서, 건강한 간세포 및/또는 간세포 전구체는 예를 들어, 이에 제한되지 않지만 ABCB11(BSEP), AGXT, ARG, ASL, ASS, ATP7B, ATP8B1(즉, FIC1), CFH, CPS, FAH, HAMP, HFE, JAG1, JH, MDR3(ABCB4), NAGS, OTC, PI, SLC40A1, TFR2, TTR, UGT1A1 등과 같은 간-연관 단일유전자 질환과 상응하는 좌위 및/또는 유전자에서 정상의 유전자/대립유전자를 함유할 수 있다(즉, 비-질환 연관 유전자/대립유전자, 즉 질환-연관 유전자/대립유전자를 함유하지 않음). 간-연관 단일유전자 질환과 상응하는 유전자의 추가의 예 및 설명은 문헌[Fagiuoli et al. J Hepatol (2013) 59(3):595-612]에서 찾을 수 있으며, 이의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 간-연관된 단일유전자 질환과 연관된 하나 이상의 유전자 이상을 보유하는 세포는 본원에서 '질환', '질환을 갖는', '질환-연관', '기능 장애', '결함' 세포 등으로서 지칭될 수 있다.

[0908] 일부 구현예에서, 본원에 사용된 세포는 향상된 요소형성 능력을 갖는 간세포-유사 세포이다. 요소형성은 세포가 요소 회로를 이용하여 암모니아를 전환시켜 요소를 생성하는 과정을 지칭한다. 특정 구현예에서, 간세포-유사 세포는 시험관내에서 향상된 요소형성을 발생시키고 나타낸다. 개선된 요소형성을 갖는 간세포-유사 세포를 발생시키기 위해 가변적인 생체내 과정에 의존하는 이전의 방법과 대조적으로, 본원에 제공된 세포는, 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에서 시험관내 분화 결과로서 시험관 내 향상된 요소형성을 나타낸다. 당업자는 이식 전에 대상의 간세포-유사 세포의 향상된 요소형성을 평가할 수 있으며, 이에 의해 기존의 방법을 이용하여 간세포-유사 세포와 연관된 잠재적인 배치마다 따른 변동성을 유리하게 감소시킨다.

[0909] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 '향상된 요소형성 능력'은, 참조에 비교하여, 요소 회로에 의해 암모니아를 요소로 전환시키는 개선된 능력을 지칭한다. 요소형성은 당업계에서 임의의 적합한 분석, 예를 들어 비색측정 요소 분석(예를 들어, BiosAssay Systems사제의 QuantiChrom 분석 키트)를 이용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 향상된 요소형성 능력은 참조 세포에 비교된다. 특정 구현예에서, 참조 세포는 본원에 제공된 하나 이상의 요소형성 인핸서 부재하에서 분화된 성숙한 간세포-유사 세포이다. 일부 구현예에서, 특정 요소형성 인핸서 존재하에서 분화된 성숙한 간세포-유사 세포의 향상된 요소형성 능력은, 요소형성 인핸서 부재하에서 분화된 참조의 성숙한 간세포-유사 세포에 비교하여, 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 이상인 요소형성이다. 예시적인 구현예에서, 본원에 제공된 대상의 성숙한 간세포-유사 세포는 야생형의 성숙한 간세포에 필적하는 수준으로 요소형성을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 본원에 제공된 대상의 성숙한 간세포-유사 세포는, 참조의 야생형 성숙 간세포에 비교하여 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%의 요소형성을 나타낸다.

[0910] 일부 구현예에서, 간세포-유사 세포는 암모니아로 자극되는 경우 요소형성 활성의 자극을 나타낸다. 예를 들어, 간세포-유사 세포는 5 mM 또는 10 mM 암모니아 자극 후, 적어도 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 또는 25 nmol/분/10^6 세포의 요소형성 비를 나타낸다. 일부 구현예에서, 간세포 유사 세포는 5 mM 또는 10 mM 암모니아 자극 후, 3 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 3 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 3 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 4 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 4 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 4 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 5 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 5 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 5 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 6 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 6 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 6 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 8 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 8 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 8 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 10 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 10 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 10 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 12 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 12 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 12 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 15 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 15 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 15 내지 30 nmol/분/10^6 세포, 20 내지 50 nmol/분/10^6 세포, 20 내지 40 nmol/분/10^6 세포, 또는 20 내지 30 nmol/분/10^6 세포의 요소형성 비를 나타낸다.

[0911] 일부 구현예에서, 향상된 요소형성 능력을 갖는 간세포-유사 세포는 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 증가된 발현을 나타낸다. 예시적인 요소 회로 경로 효소는, 카르바모일인산염 합성효소 I[carbamoylphosphate synthetase I, CPS1], 오르니틴 카르바모일전달효소[ornithine transcarbamylase, OTC], 아르기노숙신산 합성효소[argininosuccinic acid synthetase, ASS1], 아르기노숙신산 분해효소[argininosuccinic acid lyase, ASL], 아르기닌분해효소[ARG1], N-아세틸 글루타메이트 합성효소[N-acetyl glutamate synthetase, NAGS], 오르니틴 자리옮김효소[ornithine translocase, ORNT1], 및 시트린을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 간세포-유사 세포는 다음 요소 회로 효소, CPS1, NAGS, ARG1, ASL, ASS1, 또는 OTC 중 하나의 발현을

나타낸다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 세포는 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 증가된 RNA 전사체 발현을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 간세포-유사 세포는 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 증가된 단백질 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙한 간세포-유사 세포는, 요소형성 인핸서 부재하에서 분화된 참조의 성숙한 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 양으로 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 증가된 단백질 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 대상의 성숙한 간세포-유사 세포는 참조의 야생형 성숙 간세포에 비교하여 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 유사한 발현을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 대상의 성숙한 간세포-유사 세포는 참조의 야생형 성숙 간세포에 비교하여, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%의 하나 이상의 요소 경로 효소의 발현 수준을 나타낸다.

[0912] 본원에서 사용된 바와 같이, '성숙 간세포-유사 세포'는, 이에 제한되지 않지만, 알부민 분비, α-1 항트립신[α-1 antitrypsin, A1AT] 분비, 시토크롬 p450 활성, 글리코겐 합성 능력 및/또는 저장 능력, 지질(예를 들어, 저밀도 지질단백질[low density lipoprotein, LDL]) 흡수 및 저장 능력, 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG) 흡수 및/또는 제거 능력, 및 감마-글루타밀 트랜스펩티드 활성을 포함하는 성숙한 간세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 세포를 지칭한다. 예시적인 구현예에서, 본원에 제공된 성숙 간세포-유사 세포는 본원에 개시된 성숙 간세포의 향상된 요소형성 능력 및 적어도 하나 이상의 다른 특징들을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 대상의 성숙 간세포-유사 세포는 향상된 요소형성 능력을 나타내고, 여기 개시된 성숙 간세포의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 추가의 특징을 나타낸다.

[0913] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 알부민 분비를 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조의 성숙한 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 양으로 알부민을 분비한다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조의 야생형 성숙 간세포의 알부민 분비 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다(예를 들어, 일차 인간 간세포). 알부민 분비는, 예를 들어 효소 결합 면역흡수[enzyme-linked immunosorbent, ELISA] 분석 및 면역조직화학 기술(예를 들어, 문헌[Wu et al., Cell Stem Cell 14: 394-403 (2014)]을 참조하며, 이는 특히 알부민 분비 평가에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다)을 포함하는 임의의 적합한 기술을 이용하여 평가될 수 있다. 특정 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 알부민 유전자[albumin gene, ALB]의 증가된 발현을 나타낸다.

[0914] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 α-1 항트립신[A1AT] 분비를 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조 성숙 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 양으로 A1AT를 분비한다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 A1AT 분비 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다. A1AT 분비는 임의의 적합한 기술을 사용하여 평가될 수 있으며, 이는 예를 들어 효소결합 면역흡수[ELISA] 분석 및 면역조직화학 기술(예를 들어, 문헌[Wu et al., Cell Stem Cell 14: 394-403 (2014)]을 참조하며, 이는 특히 A1AT 분비 평가에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다)을 포함하는 임의의 적합한 기술을 이용하여 평가될 수 있다. 특정 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 α-1 항트립신 유전자(SERPINA1)의 증가된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조 성숙 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 양으로 SERPINA1 유전자를 발현한다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 A1AT 분비 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%로 SERPINA1 유전자를 발현한다.

[0915] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 응고 인자 V 분비를 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조 성숙 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 양으로 인자 V를 분비한다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포) 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다. 인자 V 분비는 임의의 적합한 기술을 사용하여 평가될 수 있으며, 이는 예를 들어, 효소결합 면역흡수[ELISA] 분석 및 면역조직화학 기술을 포함한다. 특정 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 응고 인자 V 유전자(F5)의 증가된 발현을 나타낸다.

[0916] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 글리코겐 합성 능력 및/또는 저장 능력을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조 성숙 간세포-유사 세포보다 적어도 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 글리코겐 합성 능력 및/또는 저장 능력을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 글리코겐 합성 능력 및/또는 저장 능력 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다. 글리코겐 합성 능력 및/또는 저장 능력은 예를 들어, 면역조직화학 기술(예를 들어, 문헌[Du et al., Cell Stem Cell 14: 394-403 (2014)] 참조)을 이용하여 평가될 수 있으며, 이는 특히 글리코겐 합성 능력 및/또는 저장 능력 평가에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다.

[0917] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 지질(예를 들어, VLDL, LDL, 및 HDL) 흡수 및/또는 저장 능력을 나타낸다. 특정 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 저밀도 지질단백질[LDL] 흡수 및/또는 저장 능력을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조 성숙 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 지질 흡수 및/또는 저장을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 지질 흡수 및/또는 저장 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다.

[0918] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 ICG 흡수 및/또는 제거 능력을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 요소형성 인핸서 부재하에 분화된 참조 성숙 간세포-유사 세포보다 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 초과의 ICG 흡수 및/또는 제거. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 지질 흡수 및/또는 저장 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다. 지질 흡수/저장 능력 및 ICG 흡수 및/또는 제거 능력은, 예를 들어 문헌[Huang et al., Cell Stem Cell 14: 370-384 (2014); 및 Wang et al., Cell Stem Cell 19: 449-461 (2016)]에 기재된 바와 같은 면역조직화학 기술을 이용하여 평가될 수 있으며, 이는 특히 ICG 활성 평가에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다.

[0919] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 시토크롬 p450 활성을 나타낸다. 이러한 세포는 CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, 및/또는 CYP3A7을 포함한, 하나 이상의 시토크롬 p450 족 구성원의 활성을 나타낼 수 있다. 특정 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 하나 이상의 시토크롬 p450 족 구성원의 유전자 또는 단백질 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 시토크롬 p450 활성 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다. 시토크롬 p450 활성은 핵산 정량 분석 기술(예를 들어, qPCR), 발광 분석(문헌[Kim et al., Biomol Ther: 23(5): 486-492 (2015)] 참조, 및 P450-Glo 분석 키트, Promega) 또는 액체 크로마토그래피/질량 분광분석법 기술(예를 들어, 문헌[Du et al., Cell Stem Cell 14: 394-403 (2014); 및 Lahoz et al., Methods in Molecular Biology 806:97-97 (2012)]참조)을 이용하여 측정될 수 있으며, 이는 특히 시토크롬 p450 활성 평가에 관한 부분에 있어서, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.

[0920] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 아시알로당단백질[asialoglycoprotein] 수용체 발현(예를 들어, ASGR1 및/또는 ASGR2 발현을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 아시알로당단백질 수용체 발현 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다.

[0921] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 알파-태아단백질[alpha-fetoprotein, AFP] 발현을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 알파-태아단백질 발현 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다.

[0922] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 감마-글루타밀 펩티드전달효소 활성을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 감마-글루타밀 펩티드전달효소 활성 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99%를 나타낸다. 감마-글루타밀 펩티드전달효소 활성은 예를 들어, 면역조직화학 기술(예를 들어, 문헌[Woo et al., Gastroenterology 42:602-611 (2012)])을 이용하여 측정될 수 있으며, 이는 특히 감마-글루타밀 펩티드전달효소 활성 평가에 관한 부분에 있어서, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.

[0923] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 SOX9 발현을 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 SOX9 발현 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%,

70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%를 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포에 비교하여 증가된 SOX9 발현을 나타낸다.

[0924] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 케라틴 I형 세포골격 18(KRT18) 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포 (예를 들어, 일차 인간 간세포)의 KRT18 발현의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 수준을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포에 비교하여 증가된 KRT18 발현을 나타낸다.

[0925] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 HNF4A(예를 들어, HNF4a 및 HNF4α) 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 HNF4A 발현 수준의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%를 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포에 비교하여 증가된 HNF4A 발현을 나타낸다.

[0926] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 G6PC 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포(예를 들어, 일차 인간 간세포)의 G6PC 발현의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 수준을 나타낸다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 참조 야생형 성숙 간세포에 비교하여 증가된 G6PC 발현을 나타낸다.

[0927] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 분화된 간세포는 간세포 마커 HNF4a, ALB, CYP2C9의 발현에 의해 특징되며, 또한 말단 분화 마커 PEPCK1을 발현할 수 있다. 밀착 연접[tight junction] 마커 ZO1은 분화된 세포들 사이에서 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 분화된 간세포는 CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, CYP1A2, CYP1A1, CYP2D6, CYP3A7, 및 CYP2E1을 포함하는 기능성 CYP 효소를 또한 발현할 수 있다. 분화된 간세포는, 기능성 글루코스 대사(글리코겐 합성 및 저장에 대해 PAS 염색에 의해 결정됨), 기능성 지질 대사(저밀도 지질단백질[LDL] 흡수 분석에 의해 결정됨), 인도시아닌 그린[ICG] 흡수, 및 알부민 분비를 포함하는, 성숙 간세포의 기타 특징을 나타낼 수 있다. ICG 흡수는 간기능의 진단에 사용되는 의약 진단 시험이며, 간세포가 간세포 내 및 밖으로 이온을 수송하는 기능성 수송체 기능을 갖는지 입증하는데 사용된다.

[0928] 본원에 개시된 간세포는, 간의 대부분의 화합물 대사 활성을 차지하는 주요 CYP, CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6 및 CYP2C9의 대사 기능을 나타낼 수 있다. 더욱 중요하게는, 간세포는 리팜피신과 같은, 알려진 CYP 유도 약물에 반응할 수 있다.

[0929] 일부 구현예에서, 분화된 간세포는 다음 특징들 중 적어도 하나를 포함한다:

[0930] (i) 마커 HNF4a 및 ALB를 발현함,

[0931] (ii) CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, CYP1A2, CYP1A1, CYP2D6, CYP3A7, 및 CYP2E1에서 선택된 CYP 효소 중 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개를 발현함,

[0932] (iii) 다음 기능들: a) 기능성 글루코스 대사, b) 기능성 지질 대사, c) 기능성 알부민 분비 중 적어도 1, 2 또는 3을 가짐,

[0933] (vi) 인도시아닌 그린(ICG) 흡수, 및

[0934] (vii) 상피를 형성하기에 충분한 조건 하에서 다른 분화된 간세포와 함께 배양된 경우 밀착 연접을 형성.

[0935] 분화된 간세포는 또한 말단 분화 마커 PEPCK1 또는 TAT 중 적어도 하나를 발현할 수 있다. 분화된 간세포는 CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, CYP1A2, CYP1A1, CYP2D6, CYP3A7, 및 CYP2E1에서 선택된 적어도 2, 3, 또는 4의 CYP에 경우 유도성 CYP 기능을 가질 수 있다. 분화된 간세포는 글리코겐을 저장할 수도 있고, 저밀도 지질단백질을 흡수할 수 있다. 이러한 간세포의 특성은 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함된, 제WO2016200340A1호에 기재된다.

[0936] 인간 간 줄기 세포의 단리 및 장기간 배양은, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함된, 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같은 다음 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0937] 제WO2016200340A1호의 "재료 및 방법(Materials & Methods)"에 기재된 바와 같음:

[0938] 콜라겐 분해 용액: 10mM Hepes, 5% FBS(Clonetech), 2 mg/ml 콜라겐분해효소(Sigma, C-5138)가 있는 DEME/F12(Gibco). 콜라겐분해효소 용액을 37℃로 가온하고, 콜라겐분해효소가 용액 내로 들어간 후 0.2 마이크로(micron) 여과기를 통해 멸균처리. 이 배지는 신선하게 제조한다(콜라겐분해효소는 고온에서, 그리고 긴 기간

에 걸쳐 불활성화될 것임).

[0939] 세척 용액: 10mM Hepes, 100U/ml Pen/Strep(Gibco), 100 ㎍/ml 겐타마이신(Gibco)이 있는 DEME/F12 배지(Gibco), 0.2 마이크로 여과기를 통해 멸균 용액을 여과.

[0940] 코팅 배지: 성장 인자 감소된 매트리겔(Corning) 10%, 희석된, 진전된 F12/DMEM 감소된 혈청 배지(Gibco).

[0941] 간 줄기 세포 배지: 진전된 F12/DMEM 감소된 혈청 배지(1:1)(Gibco. 12643), 10mM HEPES(Gibco), 100 U/ml Pen/Strep(Gibco), 2mM L-글루타민(Gibco), 1% N2(Gibco), 2% B27(Gibco), 50 ng/ml EGF(Millipore), 250 ng/ml R-스폰딘1(R&D), 2μM SB431542(Tocris)), IμM 재기드(Jagged)-1(188-204)(Anaspec), 2μM T3(3,3',5-트릴로도-L-티로닌)(Sigma), 0.1μM 콜레라 내독소(Sigma), 10mM 니코틴아미드(Sigma), 1.25μM N-아세틸-시스테인(NAC)(Sigma).

[0942] 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같은 피더(feeder) 세포의 제조: **1.** 플레이트를 10% 매트리겔로 코팅할 수 있다. 매트리겔은 진전된 F12/DMEM 기본 배지로 희석될 수 있다. 플레이트를 코팅한 후, 플레이트를 37℃ 인큐베이터 내에서 30분 동안 보관할 수 있다. **2.** 바이알 당 7×106 세포를 함유하는 바이알을, 세 개의 6웰 플레이트에서 각 웰 당 2 mL 배지를 이용하여 해동시킬 수 있다. 세포는 수조 내에서 빠르게 해동될 수 있고, 이들을 층류 후드로 옮기기 전에 70% 알코올을 이용해 면봉으로 닦았다. 세포를 50 mL 관에 첨가할 수 있고, 가온된 배지를 적가하여 세포를 희석하였다. **3.** 세포의 균일한 분포를 위해 플레이트를 인큐베이터 내에서 진탕시킬 수 있다(좌우×2회 전후×2회). **4.** 피더는 제2일에 사용될 수 있다.

[0943] 간 줄기 세포는 인간 간 조직에서 단리될 수 있다. 과학적 목적을 위한 간세포 제조에서 인간 간 시료의 이용은 생명 윤리위원회[Institutional Review Board, IRB] 및 인체 연구 윤리위원회[Human Research Ethics committee]의 승인을 받은 것이다. 정상의 간 시료는 이식을 위한 공여자 간에서 수득될 수 있다. 간경화증 시료는 이식을 위한 수용자 간에서 수득될 수 있다. 조직을 절단하여 작은 조각으로 갈고, 콜라겐분해효소 용액으로 분해시킬 수 있다. 분해된 세포를 간 줄기 세포 배양 배지에 현탁시킬 수 있다. 세포를 피더 세포와 함께 조직 배양 플레이트상에서 풀화 및 플레이팅하고, 부착되도록 할 수 있다. 7-10 일 후, 세포를 단일 세포로서 수확 및 재현탁할 수 있고, 피더상에 플레이팅할 수 있다. 간 줄기 세포 콜로니는 3일 후 나타나기 시작할 수 있다. 장기간 배양을 위해 세포는 매 7 내지 10일마다 계대배양할 수 있다. 매 2일마다 배양 배지를 교체할 수 있다.

[0944] 지속적 배양을 위해 피더상에서 단일 콜로니를 집어냄으로써 단일 세포 유래 세포주가 생성될 수 있다. 초기 계대배양된 간 줄기 세포는 단일 세포 내로 분해될 수 있고 유세포 분석법으로 회수할 수 있다. 분급된 단일 세포는 96웰 플레이트에서 배양될 수 있고, 확장을 위해 48, 24 및 6웰 플레이트에 추가로 분할시킬 수 있다.

[0945] 특정 구현예에서, 분해된 초기 계대 세포를 40 μπι 거름망을 통해 여과하고, 배양 접시상에 저밀도로 플레이팅할 수 있다. 10 내지 14 일 후, 단일 세포는 성장하여 다른 콜로니와 합쳐지지 않으면서 콜로니를 형성하여야 한다. 단일 세포 유래 콜로니는 24 웰 플레이트상에서 지속 배양을 위해 집어낼 수 있다. 다음 계대를 위해 1%, 10%, 20%, 30%, 40% 및 50%의 세포를 재집단화하였다.

[0946] 단일 세포 유래 간 줄기 세포주는 매 7 내지 14일에 연속적으로 계대배양될 수 있으며, 초기 계대 및 후기 계대를 핵형에 대해 확인할 수 있다. 두 계대 모두에서 세포는 정상의 핵형을 가지는 것으로 보일 수 있다. 이는 줄기 세포 유전체가 장기간 배양 동안 안정하였음을 보여준다.

[0947] 제WO2016200340A1호에 기재된 결과에 따르면, 간 줄기 세포는 성체 줄기 세포 마커 SOX9 및 간세포 마커 HNF4a 및 HNF3P를 발현할 수 있다. 담도 마커 KRT19는 적게 발현될 수 있으며, 담도 마커 KRT7은 세포 내에서 탐지 불가능할 수 있다(단백질 수준). 간세포 줄기 세포는 다른 간 줄기 세포 마커 EPCAM, CD24, PROM1, FOXA3 및 FOXQ 1 또한 발현할 수 있다. 줄기 세포의 유지 동안, 분화된 세포의 콜로니가 관찰될 수 있다(~1-2%의 총 콜로니 수). 분화된 간 세포는 ECAD, KRT19, KRT7의 강한 발현 수준 및 SOX9의 감소된 발현을 보일 수 있으며, 이는 자연 상태에서 관형인 분화된 세포에 일치한다. 형태학적으로, 미분화된 세포는 작고 둥근 형태일 수 있으며, 함께 빽빽하게 군집화될 수 있다. 간 줄기 세포는 극성화될 수 없다. 산발적으로 분화된 세포는 형태가 더 크고 편평할 수 있다. 모든 세포가 세포 핵에서 KI67을 발현할 수 있기 때문에, 배양 중의 거의 모든 세포는 증식 중일 수 있다. 형태학적으로, 이들 모두는 작고 둥근 형태일 수 있다. 미분화된 세포는 KRT19를 낮은 수준으로 발현하지만, KRT7은 검출 가능한 수준으로 발현하지 않을 수 있다.

[0948] 간 줄기 세포의 간세포로의 분화는 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함된, 제WO2016200340A1호에 기재된 바와

같은 다음 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0949] 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 간 줄기 세포는 거의 100% 효율로 간세포 및 담도 세포 모두로 분화될 수 있다. 간세포 분화는 2D, 3D 모두에서 기체 액체 계면[air liquid interface, ALI] 형태로 수행될 수 있다. 담도 분화는 3D 형태일 수 있다.

[0950] 간세포 분화 배지는 0.5 μM A83-01(Tocris), 30 μM 덱사메타손(dexamethasone, Dex)(Sigma), 20 ng/ml 온코스타틴 M(oncostatin M, OSM)(Prospecbio), 화합물 E(Santa cruz)로도 명명되는 0.1 μM γ-분비효소 억제제 XXI, 25ng/ml Bmp7 및 25ng/ml Fgf19로 보충된 Clonetics™ HCM™ 간세포 배양 배지(Lonza)로 이루어질 수 있다.

[0951] 일부 구현예에서, Clonetics™ HCM™ 간세포 배양 배지(Lonza)는 B27, N2를 갖는 진전된 DMEM/F12(1:1) 배지, 또는 10% FBS를 갖는 DMEM/F12(1:1) 배지로 대체될 수 있다.

[0952] 일부 구현예에서, γ-분비효소 억제제 XXI는 노치(Notch) 경로 억제제 DAPT, DBZ로 대체될 수 있다.

[0953] 일부 구현예에서, BMP7, FGF19, 및 온코스타틴 M(OSM)은 임의적이다. 이들 중 하나는 제거될 수 있으며, 세포는 더 적은 효율로 간세포로 분화될 수 있다.

[0954] 2D 간세포 분화

[0955] 간세포 줄기 세포는 7 내지 10 일 동안 피더상에서 배양될 수 있다. 줄기 세포가 50% 내지 70% 컨플루언스(confluence)에 도달하면, 세포 배양 배지에 3-5일 동안 BMP420, 50, 100ng/ml 및 Fgf2 10, 20, 50, 100 ng/ml을 첨가할 수 있으며, 간세포 분화 개시를 위해 간세포 분화 배지로 변경할 수 있다. 배지를 14일 동안 매 2-3일마다 변경할 수 있다. 간세포 분화 배지 중에서의 연장된 배양은 간세포 성숙을 높일 수 있다. 분화된 세포는 Clonetics™ HMM™ 간세포 유지 배지[Hepatocyte Maintenance Medium, HMM] 중에서 30일이 넘는 기간 동안 배양을 지속할 수 있다.

[0956] 일부 구현예에서, 간 줄기 세포는 줄기 세포 배양 배지 중에서 1X10 5 세포/cm2의 밀도로 시딩(seeding)될 수 있다. 간 줄기 세포가 컨플루언시에 도달하면, 배양 배지를 분화 배지로 대체할 수 있다. 성숙 간세포는 14 내지 21일 동안 형성할 수 있다.

[0957] 3D 간세포 분화

[0958] 간 줄기 세포는 6 내지 10일 동안 피더상에서 배양될 수 있다. 이후 세포를 회수하고, 초저 부착 세포 배양 접시에서 인간 간 줄기 세포 배양 배지 중에 1X105 세포/cm의 밀도로 단일 세포로서 시딩될 수 있다.

[0959] 특정 구현예에서, 세포는 저접착 96웰 플레이트상에 2-5X104/웰로 시딩될 수 있다. [0240] 제2일에, 줄기 세포를 구형 구조를 형성하기 위해 또 다른 3-5일 동안 BMP4 20, 50, 100ng/m 및 Fgf2 10,20, 50, 100 ng/ml가 있는 간 줄기 세포 배지 중에서 배양할 수 있다. 간세포 분화 배지는 간세포 분화를 개시하기 위하여 저부착 플레이트 중에서 구형 구조물들을 배양하는 데 사용될 수 있다. 배지는 매 2-3일마다 변경될 수 있다. 성숙 간세포는 분화 8일차 내지 14일차에 유도될 수 있다. 간세포 분화 배지 중에서 연장된 배양은 3D 간세포 성숙을 높일 수 있다. 3D 간세포는 매 2-3일마다 배지를 변경하면서 30일 동안 분화 배지 중에서 배양될 수 있다. 3D 간세포는 Clonetics™ HMM™ 간세포 유지 배지[HMM] 중에서 2-3달 동안 유지될 수 있다. 간세포 기체 액체 계면[ALI] 분화

[0960] 간 줄기 세포는 트랜스웰(Corning, 0.4 μπι 공극 크기, 폴리에스테르 막)에서 3T3J2 피더상에 3x10 4 세포/cm 2의 밀도로 플레이팅될 수 있다. 트랜스웰 중의 세포는 7 내지 10일 동안 간 줄기 세포 배지 내에서 배양될 수 있다. 삽입물 내부 배지는 제거될 수 있고, 삽입물 외부 배지는 간세포 분화로 변경될 수 있다. 기체 액체 계면상의 세포는 배지를 매 2-3일마다 변경하면서 또 다른 14일 동안 배양할 수 있다. 10일 내지 14일 후, 성숙한 간세포가 유도될 수 있다. 간세포 분화 배지 중에서 연장된 배양은 간세포 성숙을 증가시킬 수 있다. 분화된 세포는 30일이 넘는 기간 동안 배양을 지속할 수 있다.

[0961] 모든 기재된 간세포 분화 방법은 AFP와 같은 태아 및 미성숙 간세포 마커 발현 없이 기능성 인간 간세포를 생산해야 한다(AFP를 발현하는, 간암종 환자에서의 LSC에서 유래된 간세포는 제외).

[0962] 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 분화된 간세포는 시토크롬 p450 약물 대사 기능, 글리코겐 저장 및 LDL 흡수 기능을 가져야 한다. 2D 및 3D 분화의 효율은 약 80% 내지 90%일 수 있다. 3D의 최고 분화 효율은 특정한 개별 3D 간세포 구체에서 100%에 도달할 수 있다. 3D 분화된 간세포는 간세포 말단 분화 마커 PEPCK 및

TAT를 발현할 수 있다. 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 여섯 개의 주요 CYP p450 족 구성원은 RNA 발현이 증가될 수 있다.

[0963] CYP1A2, 2C9, 2B6, 및 3A4/5 기능은 대사 분석에 의해 결정될 수 있다. 간세포는 CYP3A4 및 CYP2C9 활성에 대해 약물 유도된 반응을 나타낼 수도 있다.

[0964] 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같은 간 줄기 세포 분화된 간세포는 일차 성체 간세포의 많은 특징들을 나타내었지만, 이들은 몇몇 양태에서 상이할 수 있다. 간 줄기 세포 분화된 간세포[differentiated hepatocyte, dHep]는 성체 일차 간세포[adult primary hepatocyte, aHep]보다 세포 크기 면에서 더 작다. aHep 크기는 dHep보다 2-10배 더 클 수 있다. 대다수의 dHep는 단일 핵을 갖는 이배체일 수 있지만, 유의미한 수의 aHep는 다배수체일 수 있으며, 이핵세포일 수도 있다. aHep CYP 기능은 24-48 시간 동안 세포 배양 중에서만 유지될 수 있지만, dHep CYP 기능은 30일을 초과하여 유지될 수 있다.

[0965] 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 간 줄기 세포의 담관세포로의 분화는 아래 방법에 의해 수행될 수 있다:

[0966] 담도 분화 배지는 진전된 F12/DMEM 감소된 혈청 배지(1:1)(Gibco. 12643), 10mM HEPES(Gibco), 100U/ml Pen/Strep(Gibco), 2mM L-글루타민(Gibco), 1% N2(Gibco), 2% B27(Gibco), 10ng/ml EGF(Millipore), 100ng/ml Fgf10(R&D)로 이루어질 수 있다.

[0967] Tgfp 억제제 및 노치 억제제는 배지 내에 존재하지 않을 수 있다. 담도 분화 배지에는 Tgfp3 억제제 및 노치 억제제가 없을 수 있다.

[0968] 특정 구현예에서, 담도 형성을 돕기 위해 분화 배지 중에 Tgfp3 및 노치 리간드 재기드-1이 첨가되었다. 이들 중 하나는 임의적이다.

[0969] 성장 인자 감소된 매트리겔은 4℃에서 하루 전에 해동될 수 있다. 50 ul의 매트리겔을 8 챔버 슬라이드의 하나의 웰 내에 넣었다. 매트리겔이 있는 챔버 슬라이드를 37℃에서 인큐베이션하였다. 30분 후, 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 매트리겔은 각 웰상에서 고형화되어, 돔(dome) 형태의 젤리 유사 구조를 형성할 수 있다. 간 줄기 세포는 30 내지 60초 동안 0.05% 트립신에 의해 분해될 수 있다. 간 줄기 세포는 3-5 x104의 밀도로 성장 인자 감소된 매트리겔 현탁액 중에 시딩될 수 있다.

[0970] 3 내지 5 일 후, 구형 구조가 형성될 수 있을 때, 간 줄기 세포 배지는 담도 분화 배지로 변경할 수 있다. 분화 배지는 매 2일마다 변경될 수 있다. 담관세포는 14일 후 형성될 수 있다.

[0971] 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 담도 분화 방법은 담도-유사 3D 구조를 유발할 수 있다. 이러한 구조는, 그 사이가 밀착 연접된 담관세포에 의해 둘러싸인 공간 또는 둘러싸인 내강을 갖는 구형 또는 관형 구조로 세포가 배열된 닫힌 도관을 닮았다. 일부 담도-유사 구조물에서 점액이 내강 안으로 분비되는 것이 관찰될 수 있다. 모든 세포는 담즙 마커 KRT19 및 KRT7에 대해 양성으로 염색되었으며, 이는 100% 분화 효율에 가깝다는 것을 암시한다. 세포는 구조의 내강 정단[apical] 부분상에서 미세융모로 완전히 극성화될 수 있다. 세포에서 핵은 기저막 가까이에 위치될 수 있다. 밀착 연접 마커 ZO-1은 세포들 사이에서 발현될 수 있다. 담도 장기유사체는 생체내 담도 구조를 닮은 구조를 나타낸다.

[0972] 담도 3D 분화의 공정은 다음 단계들: 세포외 기질을 적합한 용기에 두는 단계(예컨대, 8 웰 챔버 슬라이드 중 하나 위에 50-60㎕의 매트리겔), 세포외 기질(예컨대, 매트리겔)을 고형화하여 돔 형태의 젤리 유사 구조를 적합한 용기(예컨대 배양 챔버) 내에서 형성하는 단계, 간 줄기 세포를 (임의로 트립신과 같은 적당한 분해 효소와 함께) 세포외 기질상에 두는(예컨대 매트리겔의 상단에 간 줄기 세포를 시딩) 단계, 세포외 기질 및 간 줄기 세포를 인큐베이션하고, 집합된 세포가 세포외 기질(예컨대 매트리겔) 상단에서 구형 구조를 형성하도록 하는 단계를 포함할 수 있다. 이론에 매이고자 하지는 않지만, 세포외 기질(예컨대 매트리겔)은 세포 집합을 지지할 수 있고, 3D 구조를 형성하여 담도 분화를 개시하는 것을 돕는다. 나아가, 세포외 기질(예컨대 매트리겔) 중에서 TGF-베타 및 다른 시토킨은 구형 구조물이 담도 유사 구조로 추가로 분화되는 것을 용이하게 할 수 있다. 세포외 기질(예컨대 매트리겔)은 구형 구조 형성을 지지할 수 있고, 구형 구조물이 담도 유사 구조로 더욱 분화되는 것을 보조할 수 있다. 간 줄기 세포 분화된 담관세포는 일차 성체 담관세포의 많은 특징을 나타낼 수 있지만, 이들은 몇몇 양태에서 상이할 수 있다. LSC-유래 담관세포는 증식 가능성을 갖는 입방 담관세포를 결여할 수 있다. LSC 담관세포의 무증식이 관찰될 수 있다. ECAD 발현은 성체 일차 담관세포에서 다양하지만, 배양내 모든 담관세포는 ECAD를 발현할 수 있다.

[0973] 간, 예컨대 인간의 간, 또는 이의 일부가 수득될 수 있으며, 예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO22164807A2호에 기재된 바와 같이, (예를 들어, 간엽(들) 또는 간의 하나 이상의 부분들을 단리하기 위해) 임의로 외과 수술적으로 처리될 수 있다. 이어서, 예를 들어, 기계적 세포 손상, 동결/해동, 관삽입 및 하나 이상의 세포제거 시약(예를 들어, 하나 이상의 단백질분해효소(예를 들어, 트립신), 하나 이상의 핵산분해효소(예를 들어, DNA 분해효소), 하나 이상의 계면활성제(예를 들어, 도데실황산나트륨, 트리톤(Triton) X-100, 등), 하나 이상의 저장성 시약, 하나 이상의 고장성 시약, 이들의 조합, 또는 등의 역행성 관류를 포함하는 이후 임의의 편리하고 적절한 방식으로 간 또는 이의 일부에서 세포제거[decellularize]를 수행한다. 세포제거된 간 또는 이의 일부는 간세포-상용성 배지 내에 저장 및/또는 예비침지될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 세포외 조작된 간세포 생성 세포를 함유하는 세포 현탁액은, 임의의 편리한 메커니즘, 예컨대 주사, 관류, 국소 적용(예를 들어, 방울방울 적가), 또는 이들의 조합에 의해 이후 세포제거된 간 또는 이의 일부에 적용될 수 있다. 일부 경우에서, 생체외 조작된 간세포 생성 세포는, 예비된 뼈대 내로의 시딩을 위해 임의의 편리하고 적당한 농도로 세포 현탁액 내에 존재할 수 있으며, 이는 예를 들어 50 pL 당 Ix105 이하 내지 Ix107 이상의 세포 농도를 포함하고, 예를 들어 50 pL 당 1-2 x106 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 시딩된, 세포제거된 간, 이의 일부, 및/또는 다른 무세포화된 뼈대는 생착/부착 및/또는 도입된 세포의 확장에 적합한 조건 하에서 유지될 수 있으며, 여기서 이러한 조건은 적합한 습도, 온도, 기체 변화, 영양소, 등을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 시딩된 간 이의 일부, 및/또는 기타 무세포화된 뼈대는 적합한 배양 배지의 습한 환경 중에서 약 37 ℃, 5% CO2에서 유지될 수 있다. 세포제거된 간, 이의 일부, 또는 기타 무세포화된 뼈대에 또는 그 안에 시딩된 및/또는 생성된 간세포의 부착 및/또는 확장 후, 이 재료는 예를 들어 감소된 간 기능 및/또는 간 질환을 갖는 인간 대상과 같이, 이식을 필요로 하는 대상 내로의 이식을 비롯한 각종 용도에 사용될 수 있다. 인간의 간을 비롯한, 간의 세포제거, 및 간-수용 무세포화 뼈대의 생산과 관련된 방법 및 시약은, 예를 들어, 문헌[Mazza et al. Sci Rep 5, 13079 (2015); Mango et al. Adv. Funct. Mater. 2000097 (2020); Shimoda et al. Sci Rep 9, 1543 (2019); Croce et al. Biomolecules. 2019, 9(12):813]뿐만 아니라, 미국 특허 번호 제10,688,221호에 기재되어 있으며, 이의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0974] 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생산된 채집된 세포 집단 및 이의 치료 또는 약학 조성물은 임의의 적합한 용기(예를 들어, 배양 용기, 관, 플라스크, 바이알, 냉동바이알, 냉동백, 등) 내에 있을 수 있으며, 임의의 적합한 전달 방법 및/또는 장치를 이용하여 사용될(예를 들어, 대상에게 투여될) 수 있다. 이러한 간세포 집단 및 약학 조성물은 신선하게 제조 및/또는 사용될 수 있거나 냉동보존될 수 있다. 일부 경우에서, 간세포 집단 및 이의 약학 조성물은 '즉시 사용' 형태로 제조될 수 있으며, 이는 예를 들어 세포가 적합한 희석제 내에 존재 및/또는 원하는 전달 농도(예를 들어, 단위 투약량 형태) 또는 (예를 들어, 적합한 희석제 또는 매질을 이용하여) 원하는 전달 농도로 쉽게 희석될 수 있는 농도로 존재하는 경우를 포함한다. 간세포 집단 및 이의 약학 조성물은, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 주사기, 주입 백 등과 같이, 원하는 전달 장치 또는 원하는 전달 메커니즘이나 원하는 전달 경로와 상용성인 장치 내에서 제조될 수 있다.

[0975] 일부 경우에서, 본 개시는 예를 들어, 각각 적합한 용기에 담긴, 복수의 세포 치료 용량을 포함하며, 여기서 복수의 용량의 유전자 변형 간세포는 모두, 단일 인간 공여자 간에서 제조된, 간세포 집단, 예를 들어 마스터 세포 은행[master cell bank]에서, 확장을 비롯하여, 유도된다. 일부 경우에서, 본 개시는 예를 들어, 각각 적합한 용기에 담긴, 복수의 세포 치료 용량을 포함하며, 여기서 복수의 용량의 유전자 변형 간세포는 모두, 복수의 (예를 들어, 2, 2 이상, 3 이하, 3, 3 이상, 4 이하, 4, 4 이상, 5 이하, 5, 5 이상, 6 이하, 6, 6 이상, 7 이하, 7, 7 이상, 8 이하, 8, 8 이상, 9 이하, 9, 9 이상, 10 이하, 10 이상, 등) 인간 공여자 간에서 제조된, 간세포 집단, 예를 들어 마스터 세포 은행에서, 확장을 비롯하여, 유도된다.

[0976] 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 임의의 간세포-유사 세포는 대상을 치료하는데 사용될 수 있다. 일 양태에서, 본원은 향상된 시험관내 요소형성 능력을 갖는 대상의 성숙 간세포-유사 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포의 요소형성 능력은 약학 조성물에서의 이용 전에 평가된다. 요소형성은 당 분야에 알려진 임의의 적합한 분석, 예를 들어, 비색측정 요소 분석(예를 들어, BiosAssay Systems사의 QuantiChrom 분석 키트)를 이용하여 측정될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 약학 조성물은 참조 야생형 성숙 간세포에 비교하여, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 요소형성을 나타내는 성숙 간세포-유사 세포를 포함한다.

[0977] 세포 분화

[0978] 본원에 기재된 대상 성숙 간세포-유사 세포는 분화 기간 동안 이산된 시점에서 요소형성 인핸서의 존재하에서

공급원 세포를 시험관내 분화함으로써 생산될 수 있다.

[0979] 예시적인 구현예에서, 공급원 세포는 간세포-유사 전구세포 중간체로 분화되고, 간세포-유사 전구세포는 하나 이상의 요소형성 인핸서를 포함하는 배양 배지 내에서 성숙-유사 간세포로 분화된다. 본원에서 사용된 바와 같이, '간세포-유사 전구세포'는 성숙 간세포-유사 세포로 분화할 수 있는 세포를 지칭하고, 간세포 전구세포의 하나 이상의 특징을 갖는 세포를 지칭한다. 간세포 전구세포 특징은, EpCAM 발현, 시토케라틴-19 발현, 아시알로당단백질 수용체 1[ASGPR1] 발현, 및 AFP, ALB, HNF4A, HNF6, SERPINA1, ALB 및/또는 CYP3A7의 증가된 유전자 발현을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, AFP, ALB, HNF4A, HNF6, SERPINA1, ALB 및/또는 CYP3A7의 증가된 유전자 발현은 참조 세포(예를 들어, 줄기 세포, 섬유아세포 또는 본원에 기재된 임의의 공급원 세포)에 비교된다. 특정 구현예에서, 유전자 발현에서의 증가는, 참조 공급원 세포에 비교하여 적어도 10 배, 100 배, 1 x 10^3 배, 1 x 10^4 배, 1 x 10^5 배, 또는 1 x 10^6 배의 유전자 발현에서 증가이다. 예시적인 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는, 1) EpCAM 및/또는 시토케라틴-19의 발현, 및 2) AFP, ALB, HNF4A, HNF6, SERPINA1, ALB 및/또는 CYP3A7의 증가된 유전자 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는, 1) EpCam 및 시토케라틴-19의 발현, 및 2) ALB 및 CYP3A7의 증가된 발현을 나타낸다. 간세포-유사 전구세포는 또한, 간세포 또는 담관세포로 분화할 수 있는 이중능[bipotential] 전구세포인, 간모세포-유사 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 요소형성 인핸서는 성숙 간세포-유사 세포와 접촉한다.

[0980] 일부 구현예에서, 하나 이상의 요소형성 인핸서는 분화의 특정 일에 분화 세포와의 접촉을 시작한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 요소형성 인핸서는, 분화 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40 일에 분화 세포와 접촉을 시작한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 요소형성 인핸서는, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 일에 분화 세포와 접촉한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 요소형성 인핸서는 본원에 기재된 성숙 간세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 성숙 간세포-유사 세포와 접촉한다. 일부 구현예에서, 요소형성 인핸서는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24 또는 36 시간 동안 분화 세포(예를 들어, 간세포-유사 전구세포)와 접촉한다. 일부 구현예에서, 요소형성 인핸서는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14 일 동안 분화 세포와 접촉한다. 일부 구현예에서, 요소형성 인핸서는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 주 동안 분화 세포와 접촉한다.

[0981] 공급원 세포

[0982] 임의의 적합한 공급원 세포는 대상 간세포-유사 세포를 생산하는데 사용될 수 있으며, 이는 줄기 세포(예를 들어, 유도 만능 줄기 세포 및 배아 줄기 세포) 섬유아세포, 위 상피 세포, 간세포, 및 췌관 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0983] 일부 구현예에서, 공급원 세포는 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 인간 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 만능 줄기 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이 '만능 줄기 세포'는 세 개의 배엽, 즉 내배엽(예를 들어, 위 라이닝, 위장관, 폐, 등), 중배엽(예를 들어, 근육, 뼈, 혈액, 비뇨생식기 조직, 등) 또는 외배엽(예를 들어, 표피 조직 및 신경계 조직) 중 임의의 것으로 분화할 가능성을 갖는다. 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 '만능 줄기 세포'는 또한 비만능 세포에서 유래한 만능 줄기 세포의 유형인 '유도 만능 줄기 세포' 또는 'iPSC'를 포괄한다. 부모 세포의 예는 다양한 수단에 의해 만능성, 미분화된 표현형을 유도하도록 재프로그래밍된 체세포를 포함한다. 이러한 'iPS' 또는 'iPSC' 세포는 특정 조절 유전자의 발현을 유도하거나 특정 단백질의 외인성 적용에 의해 생성될 수 있다. iPS 세포의 유도 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 하기에 추가로 설명된다. 예를 들어, 문헌[Zhou et al, Stem Cells 27 (11):2667-74 (2009); Huangfu et al., Nature Biotechnol. 26 (7):795 (2008); Woltjen et al, Nature 458 (7239):766-770 (2009); 및 Zhou et al, Cell Stem Cell 8:381-384 (2009)] 참조. 특정 구현예에서, 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 줄기 세포를 이용한 간 분화 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Blackford et al., Stem Cells Transl Med. 8(2):124-137 (2019); Hannan et al., Nature Prot. 8(2):430-437 (2013); Liu et al., Sci Transl Med. 3(82):82ra39 (2011); Woo et al., Gastroenterology 42:602-611 (2012); 및 Carpentier et al., J Clin Invest. 124(11): 4953-4964 (2014)]를 참조하며, 이는 특히 간세포-유사 세포 분화 방법에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다.

[0984] 공급원 세포가 유도 만능 줄기 세포인 일부 구현예에서, 유도 만능 줄기 세포는 다음 유전자들, 즉 CXCR4, SOX17, CER, 및/또는 FOXA2 중 하나 이상을 발현하는 최종내배엽[definitive endoderm, DE]으로 먼저 분화된다. 그 후, DE는 알파-1-태아단백질[AFP]를 발현하는 간세포-유사 전구세포로 이어서 분화된다. 이어서,

간세포-유사 전구세포는 성숙 간세포-유사 세포로 분화된다. 예를 들어, 문헌[Liu et al., Sci Transl Med. 3(82):82ra39 (2011)]을 참조하며, 이는 특히 간세포-유사 세포 분화 방법에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는 본원에 기재된 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에 분화되어 향상된 요소형성 능력을 갖는 성숙 간세포-유사 세포를 생산한다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는 하나 이상의 요소형성 인핸서 및 온코스타틴-M(OSM)을 포함하는 배양 배지 내에서 성숙 간세포-유사 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 간세포 성장 인자[hepatocyte growth factor, HGF]를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 하나 이상의 요소형성 인핸서에 적용된다.

[0985] 공급원 세포가 인간 배아 줄기 세포 또는 인간 유도 만능 줄기 세포인 일부 구현예에서, 공급원 세포는 SOX17 및/또는 FOXA2를 발현하는 최종 내배엽으로 먼저 분화된다. 최종 내배엽은 AFP 및/또는 HNF4A를 발현하는 간모세포-유사 세포로 분화된다. 그 후, 간모세포-유사 세포는 다음 유전자들, 즉 AFP, AAT, ALB, 및 HNF3B 중 하나 또는 이의 조합을 발현하는 성숙 간세포-유사 세포로 분화된다. 예를 들어, 문헌[Carpentier et al., J Clin Invest. 124(11): 4953-4964 (2014)]을 참조하며, 이는 특히 간세포-유사 세포 분화 방법에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 간모세포-유사 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에 분화되어 향상된 요소형성 능력을 갖는 성숙 간세포-유사 세포를 생산한다. 일부 구현예에서, 간모세포-유사 세포는 하나 이상의 요소형성 인핸서, DMSO 및 HGF를 포함하는 배양 배지 내에서 분화된다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 하나 이상의 요소형성 인핸서에 적용된다.

[0986] 공급원 세포가 인간 만능 줄기 세포인, 일부 구현예에서, 공급원 세포는 SOX17 및/또는 CXCR4를 발현하는 최종 내배엽으로 먼저 분화된다. 최종 내배엽은 EpCAM, 시토케라틴 19 및 다음 유전자들, 즉 AFP, SERPINA2, 및 HNF4A 중 하나 이상의 조합을 발현하는 간 내배엽으로 분화된다. 그 후, 간 내배엽은 다음 유전자들, 즉 AFP, ASGR2, SERPINA2, CYP3A7, 및 ALB 중 하나 또는 이의 조합을 발현하는 성숙 간세포-유사 세포로 분화된다. 예를 들어, 문헌[Blackford et al., Stem Cells Transl Med. 8(2):124-137 (2019)]을 참조하며, 이는 특히 간세포-유사 세포 분화 방법에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 간 내배엽은 본원에 기재된 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에 분화되어 향상된 요소형성 능력을 갖는 성숙 간세포-유사 세포를 생산한다. 일부 구현예에서, 간 내배엽은 하나 이상의 요소형성 인핸서 및 온코스타틴-M(OSM)을 포함하는 세포 배양 배지 내에서 분화된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 간세포 성장 인자[HGF]를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 하나 이상의 요소형성 인핸서에 적용된다.

[0987] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 공급원 세포에서 전환분화된다. 전환분화는 중간의 만능 단계 없이, 분화된 세포 유형의 또 다른 유형으로의 직접 전환을 지칭한다. 성숙 간세포-유사 세포로 전환분화될 수 있는 예시적인 세포는 섬유아세포, 위 상피 세포, 간세포, 및 췌관 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0988] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 섬유아세포에서 전환분화된다. 예를 들어, 문헌[Zhu et al., Nature 508(7494):93-7(2014); Du et al., Cell Stem Cell 14(3):394-403 (2014); 및 Huang et al., Cell Stem Cell 4(3):370-84]을 참조하며, 특히 전환분화 방법에 관한 부분에 있어서, 본원에 참조로 포함된다. 이러한 방법에서, 섬유아세포가 간세포 재프로그래밍되는데 유용한 하나 이상의 유전자는 레트로바이러스 형질도입 전달 기술에 의해 섬유아세포에 전달되고, 형질도입된 섬유아세포는 이어서, 성숙 간세포-유사 세포로 분화하는 간세포-유사 전구세포의 형성을 선호하는 인자를 함유하는 배지 내에서 배양된다. 섬유아세포가 간세포 재프로그래밍되는데 유용한 유전자는 OCT4, SOX2, KLF4, HNF6, HNF1α, FOXA3, HNF1β 및/또는 HNF4α를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는 본원에 기재된 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에 분해되어 향상된 요소형성 능력을 갖는 성숙 간세포-유사 세포를 생산한다.

[0989] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 성숙 간세포에서 전환분화된다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포는 이어서 성숙 간세포-유사 세포로 분화되는 확장가능한 간세포-유사 전구세포로 전환된다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포의 간세포-유사 전구세포로의 전환은, Wnt 신호전달 효능제[agonist](예를 들어, CHIR99021), TGFβ 신호전달 억제제(예를 들어, A82-01 및 A83-01) 및 ROCK 키나제 억제제(예를 들어, Y27632, A82-01) 중 하나 또는 이의 조합을 포함하는 배양 배지에서 수행된다. 예를 들어, 문헌[Kim et al., J. Hepatol. 70(1):97-107 (2019); 및 Fu et al., Cell Res. 29(1):8-22 (2019)]을 참조하며, 이는 특히 전환분화 방법과 관련된 부분에서 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는 본원에 기재된 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에 분화되어 향상된 요소형성 능력을 갖는 성숙 간세포-유사 세포를 생산한다.

[0990] 일부 구현예에서, 대상 성숙 간세포-유사 세포는 위 상피 세포(예를 들어, 문헌[Wang et al., Cell Stem Cell 19(4):449-61 (2016)]) 또는 췌관 세포(예를 들어, 특히 전환분화 방법과 관련된 부분에서 본원에 참조로 포함

된, 본원에 참조로 포함된 문헌[Huch et al., Cell 160(1-2):299-312 (2015)] 참조)에서 전환분화된다. 일부 구현예에서, 공급원 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 요소형성 인핸서 존재하에 전환분화되어 향상된 요소형성 능력을 갖는 성숙 간세포-유사 세포를 생산한다.

[0991] 요소형성 인핸서

[0992] 본원에서 제공되는 본 발명의 성숙 간세포-유사 세포는 향상된 시험관내 요소형성 능력을 촉진하는 하나 이상의 조건 하에 공급원 세포를 시험관내 분화시킴으로써 생산된다.

[0993] 소분자 증진제

[0994] 일부 구현예에서, 분화는 하나 이상의 소분자 요소형성 인핸서를 포함하는 적어도 하나의 배양 배지에서 발생한다. 예시적인 구현예에서, 이러한 분화 단계는 공급원 세포가 중간 간세포-유사 전구세포로 분화된 후에 발생한다. 특정 구현예에서, 소분자 인핸서는 본원에 개시된 성숙 간세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 성숙 간세포-유사 세포에 첨가된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 소분자 요소형성 인핸서의 존재하에서의 분화는 성숙 간세포-유사 세포의 형성 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일에 발생한다. 일부 구현예에서, 소분자 요소형성 인핸서는 분화 세포와 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 동안 접촉한다. 일부 구현예에서, 소분자 요소형성 인핸서는 분화 세포와 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 동안 접촉한다. 일부 구현예에서, 소분자 요소형성 인핸서는 분화 세포와 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 주 동안 접촉한다.

[0995] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 소분자 인핸서는 배양 배지 중에 적어도 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 250, 500 또는 750 ㎛의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 소분자 인핸서는 배양 배지 중에 1 내지 800 μM, 1 내지 750 μM, 1 내지 700 μM, 1 내지 650 μM, 1 내지 600 μM, 1 내지 550 μM, 1 내지 500 μM, 1 내지 500 μM, 1 내지 450 μM, 1 내지 400 μM, 1 내지 350 μM, 1 내지 300 μM, 1 내지 250 μM, 1 내지 200 μM, 1 내지 150 μM, 1 내지 100 μM, 1 내지 50 μM, 50 내지 800 μM, 50 내지 750 μM, 50 내지 700 μM, 50 내지 650 μM, 50 내지 600 μM, 50 내지 550 μM, 50 내지 500 μM, 50 내지 500 μM, 50 내지 450 μM, 50 내지 400 μM, 50 내지 350 μM, 50 내지 300 μM, 50 내지 250 μM, 50 내지 200 μM, 50 내지 150 μM, 50 내지 100 μM, 100 내지 800 μM, 100 내지 750 μM, 100 내지 700 μM, 100 내지 650 ㎛, 100 내지 600 μM, 100 내지 550 μM, 100 내지 500 μM, 100 내지 500 μM, 100 내지 450 μM, 100 내지 400 μM, 100 내지 350 μM, 100 내지 300 μM, 100 내지 250 μM, 100 내지 200 μM, 100 내지 150 μM, 200 내지 800 μM, 200 내지 750 μM, 200 내지 700 μM, 200 내지 650 μM, 200 내지 600 μM, 200 내지 550 μM, 200 내지 500 μM, 200 내지 500 μM, 200 내지 450 μM, 200 내지 400 μM, 200 내지 350 μM, 200 내지 300 μM, 200 내지 250 μM, 300 내지 800 μM, 300 내지 750 μM, 300 내지 700 μM, 300 내지 650 μM, 300 내지 600 μM, 300 내지 550 μM, 300 내지 500 μM, 300 내지 500 μM, 300 내지 450 μM, 300 내지 400 μM, 300 내지 350 μM, 400 내지 800 μM, 400 내지 750 μM, 400 내지 700 μM, 400 내지 650 μM, 400 내지 600 μM, 400 내지 550 μM, 400 내지 500 μM, 400 내지 500 ㎛, 400 내지 450 μM, 500 내지 800 μM, 500 내지 750 μM, 500 내지 700 μM, 500 내지 650 μM, 500 내지 600 μM, 500 내지 550 μM, 600 내지 800 μM, 600 내지 750 μM, 600 내지 700 μM, 600 내지 650 μM, 700 내지 800 μM, 700 내지 750 μM, 또는 750 내지 800 μM의 농도로 포함된다.

[0996] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 소분자 인핸서는 배양 배지 내에 적어도 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 250, 500, 또는 750 mM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 소분자 인핸서는 배양 배지 내에 1 내지 800 mM, 1 내지 750 mM, 1 내지 700 mM, 1 내지 650 mM, 1 내지 600 mM, 1 내지 550 mM, 1 내지 500 mM, 1 내지 500 mM, 1 내지 450 mM, 1 내지 400 mM, 1 내지 350 mM, 1 내지 300 mM, 1 내지 250 mM, 1 내지 200 mM, 1 내지 150 mM, 1 내지 100 mM, 1 내지 50 mM, 50 내지 800 mM, 50 내지 750 mM, 50 내지 700 mM, 50 내지 650 mM, 50 내지 600 mM, 50 내지 550 mM, 50 내지 500 mM, 50 내지 500 mM, 50 내지 450 mM, 50 내지 400 mM, 50 내지 350 mM, 50 내지 300 mM, 50 내지 250 mM, 50 내지 200 mM, 50 내지 150 mM, 50 내지 100 mM, 100 내지 800 mM, 100 내지 750 mM, 100 내지 700 mM, 100 내지 650 mM, 100 내지 600 mM, 100 내지 550 mM, 100 내지 500 mM, 100 내지 500 mM, 100 내지 450 mM, 100 내지 400 mM, 100 내지 350 mM, 100 내지 300 mM, 100 내지 250 mM, 100 내지 200 mM, 100 내지 150 mM, 200 내지 800 mM, 200 내지 750 mM, 200 내지 700 mM, 200 내지 650 mM, 200 내지 600 mM, 200 내지 550 mM, 200 내지 500 mM, 200 내지 500 mM, 200 내지 450 mM, 200 내지 400 mM, 200 내지 350 mM, 200 내지 300 mM, 200 내지 250 mM, 300 내지 800 mM, 300 내지 750 mM, 300 내지 700 mM, 300 내지 650 mM, 300 내지 600 mM, 300 내

지 550 mM, 300 내지 500 mM, 300 내지 500 mM, 300 내지 450 mM, 300 내지 400 mM, 300 내지 350 mM, 400 내지 800 mM, 400 내지 750 mM, 400 내지 700 mM, 400 내지 650 mM, 400 내지 600 mM, 400 내지 550 mM, 400 내지 500 mM, 400 내지 500 mM, 400 내지 450 mM, 500 내지 800 mM, 500 내지 750 mM, 500 내지 700 mM, 500 내지 650 mM, 500 내지 600 mM, 500 내지 550 mM, 600 내지 800 mM, 600 내지 750 mM, 600 내지 700 mM, 600 내지 650 mM, 700 내지 800 mM, 700 내지 750 mM, 또는 750 내지 800 mM의 농도로 포함된다.

[0997] 일부 구현예에서, 소분자 인핸서는 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 발현을 증가시킨다. 예시적인 요소 회로 경로 효소는, 카르바모일인산염 합성효소 I[carbamoylphosphate synthetase I, CPS1], 오르니틴 카르바모일전달효소[ornithine transcarbamylase OTC], 아르기노숙신산 합성효소[argininosuccinic acid synthetase, ASS1], 아르기노숙신산 분해효소[argininosuccinic acid lyase, ASL], 아르기닌분해효소[arginase, ARG1], N-아세틸 글루타메이트 합성효소[N-acetyl glutamate synthetase, NAGS], 오르니틴 자리옮김효소[ornithine translocase, ORNT1], 및 시트린을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 소분자 인핸서는 다음 요소 회로 효소, 즉 CPS1, NAGS, ARG1 ASL, ASS1, 또는 OTC 중 하나의 발현을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 소분자 인핸서는 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 RNA 전사 발현을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 세포는 요소 회로 경로 효소의 증가된 단백질 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 소분자 인핸서는 하나 이상의 요소 회로 경로 효소의 단백질 발현을, 인핸서 부재하에 분화된 참조의 성숙 간세포-유사 세포보다, 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 초과의 양으로 증가시킨다.

[0998] 일부 구현예에서, 소분자 인핸서는 세포내 시클릭 AMP를 증가시키는 작용제이다. 임의의 특정 작동 이론에 매이지 않고, 본원에 제공된 실시예에 개시된 바와 같이, 세포내 환형 AMP를 증가시키는 작용제는 요소 회로의 효소의 전사 및 번역을 증가시킴으로써, 성숙 간세포-유사 세포의 시험관내 요소형성 능력을 증가시킨다. 세포내 환형 AMP를 증가시키는 작용제는 포르스콜린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩티드-1[glucagon-like peptide-1, GLP-1], 글루코스-의존성 인슐린친화도 펩티드[glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP], 포스포디에스테라제 억제제, 및 전술한 것들 중 임의의 것의 유사체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 포스포디에스테라제 억제제는 IBMX(3-이소부틸-1-메틸잔틴), 테오필린, V11294A, 롤리프람, 밀리논, CDP-840, 파파베린, 실데나필, 타달라필, 로플루밀라스트, 암리논, 실로스타졸 및 디피리다몰을 포함한다.

[0999] 예시적인 구현예에서, 인핸서는 포르스콜린이다. 일부 구현예에서, 분화 간세포-유사 전구세포는 포르스콜린을 포함하는 세포 배양 배지에서 분화된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 성숙 간세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 간세포-유사 세포는 포르스콜린을 포함하는 세포 배양 배지에서 분화된다. 일부 구현예에서, 포르스콜린은 배양 배지 내에 적어도 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 또는 100 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 포르스콜린은 배양 배지 내에 적어도 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 또는 100 mM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 포르스콜린은 배양 배지 내에 0.5 내지 800 μM, 0.5 내지 750 μM, 0.5 내지 700 μM, 0.5 내지 650 μM, 0.5 내지 600 μM, 0.5 내지 550 μM, 0.5 내지 500 μM, 0.5 내지 500 μM, 0.5 내지 450 μM, 0.5 내지 400 μM, 0.5 내지 350 μM, 0.5 내지 300 μM, 0.5 내지 250 μM, 0.5 내지 200 μM, 0.5 내지 150 μM, 0.5 내지 100 μM, 0.5 내지 95 μM, 0.5 내지 90 μM, 0.5 내지 85 μM, 0.5 내지 80 μM, 0.5 내지 75 μM, 0.5 내지 70 μM, 0.5 내지 65 μM, 0.5 내지 60 μM, 0.5 내지 55 μM, 0.5 내지 50 μM, 0.5 내지 45 μM, 0.5 내지 40 μM, 0.5 내지 35 μM, 0.5 내지 30 μM, 0.5 내지 25 μM, 0.5 내지 20 μM, 0.5 내지 15 μM, 0.5 내지 10 μM, 0.5 내지 9 μM, 0.5 내지 8 μM, 0.5 내지 7 μM, 0.5 내지 6 μM, 0.5 내지 5 μM, 0.5 내지 2 μM, 0.5 내지 1 μM, 1 내지 30 μM, 5 내지 30 μM, 10 내지 30 μM, 1 내지 20 μM, 5 내지 20 μM, 또는 10 내지 20 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 포르스콜린은 배양 배지 내에 5-20 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 분화 간세포-유사 전구세포)는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간 동안 포르스콜린에 적용된다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 적어도 8시간 동안 포르스콜린에 적용된다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 온코스타틴-M(OSM) 및/또는 간세포 성장 인자[HGF]를 추가로 포함한다.

[1000] 일부 구현예에서, 소분자 인핸서는 비타민 K1이다. 일부 구현예에서, 비타민 K는 비타민 K1이다. 일부 구현예에서, 분화는 비타민 K2 및/또는 비타민 K3이 실질적으로 없는 배양 배지에서 발생한다. 임의의 특정 작동 이론에 매이지 않고, 본원에 제공된 실시예에 개시된 바와 같이, 비타민 K는 성숙 간세포-유사 세포에서 시험관내 요소형성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 분화 간세포-유사 전구세포는 비타민 K1을 포함하는 세포 배양 배지 중에서 분화된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 성숙 간세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 간세포-유사 세포는 비타민 K를 포함하는 세포 배양 배지 중에서 분화된다. 일부 구현예에서, 비타민 K1은 배양 배지 내에

적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40의 농도, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 250, 500, 또는 750 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 비타민 K는 배양 배지 내에 0.05 내지 800 μM, 0.05 내지 750 μM, 0.05 내지 700 μM, 0.05 내지 650 μM, 0.05 내지 600 μM, 0.05 내지 550 μM, 0.05 내지 500 μM, 0.05 내지 500 μM, 0.05 내지 450 μM, 0.05 내지 400 μM, 0.05 내지 350 μM, 0.05 내지 300 μM, 0.05 내지 250 μM, 0.05 내지 200 μM, 0.05 내지 150 μM, 0.05 내지 100 μM, 0.05 내지 95 μM, 0.05 내지 90 μM, 0.05 내지 85 μM, 0.05 내지 80 μM, 0.05 내지 75 μM, 0.05 내지 70 μM, 0.05 내지 65 μM, 0.05 내지 60 μM, 0.05 내지 55 μM, 0.05 내지 50 μM, 0.05 내지 45 μM, 0.05 내지 40 μM, 0.05 내지 35 μM, 0.05 내지 30 μM, 0.05 내지 25 μM, 0.05 내지 20 μM, 0.05 내지 15 μM, 0.05 내지 10 μM, 0.05 내지 9 μM, 0.05 내지 8 μM, 0.05 내지 7 μM, 0.05 내지 6 μM, 0.05 내지 5 μM, 0.05 내지 2 μM, 0.05 내지 1 μM, 0.05 내지 0.5 μM, 0.05 내지 0.1 μM, 0.1 내지 5 μM, 0.5 내지 5 μM, 또는 1 내지 5 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 분화 간세포-유사 전구세포)에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간 동안 비타민 K1을 적용한다. 일부 구현예에서, 분화 세포에 적어도 8시간 동안 비타민을 적용한다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 비타민 K1과 함께 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 750 μM 내지 10 mM의 농도로 첨가된다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 비타민 K1과 유사한 농도로 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 온코스타틴-M(OSM) 및/또는 간세포 성장 인자[HGF]를 더 포함한다.

[1001] 일부 구현예에서, 소세포 인핸서는 비타민 K2이다. 예시적인 구현예에서, 비타민 K는 비타민 K2이다. 일부 구현예에서, 분화는 비타민 K1 및/또는 비타민 K3이 실질적으로 없는 배양 배지에서 발생한다.

[1002] 일부 구현예에서, 분화 간세포-유사 전구세포는 비타민 K2를 포함하는 세포 배양 배지에서 분화된다. 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 성숙 간세포의 하나 이상의 특징을 나타내는 간세포-유사 세포는 비타민 K2를 포함하는 세포 배양 배지에서 분화된다. 일부 구현예에서, 비타민 K2는 배양 배지 내에 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 250, 500 또는 750 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 비타민 K는 배양 배지 내에 0.05 내지 800 μM, 0.05 내지 750 μM, 0.05 내지 700 μM, 0.05 내지 650 μM, 0.05 내지 600 μM, 0.05 내지 550 μM, 0.05 내지 500 μM, 0.05 내지 500 μM, 0.05 내지 450 μM, 0.05 내지 400 μM, 0.05 내지 350 μM, 0.05 내지 300 μM, 0.05 내지 250 μM, 0.05 내지 200 μM, 0.05 내지 150 μM, 0.05 내지 100 μM, 0.05 내지 95 μM, 0.05 내지 90 μM, 0.05 내지 85 μM, 0.05 내지 80 μM, 0.05 내지 75 μM, 0.05 내지 70 μM, 0.05 내지 65 μM, 0.05 내지 60 μM, 0.05 내지 55 μM, 0.05 내지 50 μM, 0.05 내지 45 μM, 0.05 내지 40 μM, 0.05 내지 35 μM, 0.05 내지 30 μM, 0.05 내지 25 μM, 0.05 내지 20 μM, 0.05 내지 15 μM, 0.05 내지 10 μM, 0.05 내지 9 μM, 0.05 내지 8 μM, 0.05 내지 7 μM, 0.05 내지 6 μM, 0.05 내지 5 μM, 0.05 내지 2 μM, 0.05 내지 1 μM, 0.05 내지 0.5 μM, 0.05 내지 0.1 μM, 0.1 내지 5 μM, 0.5 내지 5 μM, 또는 1 내지 5 μM의 농도로 포함된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 분화 간세포-유사 전구세포)에 비타민 K2를 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 시간 동안 적용한다. 일부 구현예에서, 분화 세포에 적어도 8시간 동안 비타민을 적용한다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 비타민 K2와 함께 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 750 μM 내지 10 mM의 농도로 첨가된다. 일부 구현예에서, 아르기닌은 비타민 K2와 유사한 농도로 배양 배지에 첨가된다. 일부 구현예에서, 세포 배양 배지는 온코스타틴-M(OSM) 및/또는 간세포 성장 인자[HGF]를 더 포함한다.

[1003] 배양 배지[culture medium]

[1004] 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 하나 이상의 성장 인자를 포함하는 배양 배지 존재하에 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 분화는 간세포 성장 인자[HGF] 및 온코스타틴-M(OSM)을 포함하는 배양 배지에서 발생한다. 분화가 중간 간세포-유사 전구세포를 통해 발생하는 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 HGF의 부재하에 이루어진다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 OSM을 포함하지만, HGF가 없다. 일부 구현예에서, 분화가 중간 간세포-유사 전구세포를 통해 발생하는 일부 구현예에서, 중간 간세포-유사 전구세포에서 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 초기에는 HGF 존재하에 수행되고, 이 HGF는 분화 시작 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 21, 22, 23 또는 24시간에 배양 배지에서 제거된다. 일부 구현예에서, HGF는 간세포-유사 전구세포의 성숙 간세포-유사 세포로의 분화의 시작에서부터 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일에 배양 배지로부터 제거되었다.

[1005] 증가된 산소 조건

[1006] 임의의 특정 작동 이론에 매이지 않고, 본원에 제공된 실시예에 나타낸 바와 같이, 상승된 산소 조건 하에 배양된 간세포-유사 세포는 증가된 시험관내 요소형성을 나타낸다. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따른 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 향상된 시험관내 요소형성을 촉진하는 상승된 산소 수준에서 발생한다. 일부 구현예에서, 분화는 정상 산소(정상 산소성) 조건(~20% O_2 분압)하에 발생한다. 일부 구현예에서, 분화는 과산소 조건(>20% 분압)하에 발생한다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 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, 30, 35 또는 40% 초과의 O_2 분압에서 수행된다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 5-30%, 6-30%, 7-30%, 8-30%, 9-30%, 10-30%, 11-30%, 12-30%, 13-30%, 14-30%, 15-30%, 16-30%, 17-30%, 18-30%, 19-30%, 20-30%, 21-30%, 22-30%, 23-30%, 24-30%, 25-30%, 26-30%, 27-30%, 28-30%, 29-30%, 15-25%, 15-35%, 15-40% 또는 20-25%의 O_2 분압에서 수행된다.

[1007] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따른 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 적어도 두 개의 산소 조건 하에 발생한다. 일부 경우에서, 산소 조건 중 하나는 저산소 조건이고 다른 산소 상태는 정상산소 조건이다. 일부 구현예에서, 저산소 조건은 약 0% 내지 약 5% 산소, 예를 들어, 약 0%-5%, 약 0%-4%, 약 0%-3%, 약 0%-2%, 약 0%-3%, 약 0%-4%, 약 1%-5%, 약 1%-4%, 약 1%-3%, 약 1%-2%, 약 2%-3%, 약 3%-4%, 약 4%-5%, 약 2%-5%, 및 약 3%-5%의 산소 함량을 포함한다. 일부 구현예에서, 정상 산소 조건은 약 20% 내지 약 22% 산소, 예를 들어, 약 20%-22%, 약 20%-21%, 약 21%-22%, 약 20%, 약 21%, 및 약 22%의 산소 함량을 포함한다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 적어도 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36일 이상 동안 저산소 조건에 노출된다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 적어도 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36일 이상 동안 정상 산소 조건에 노출된다.

[1008] 배양 시스템

[1009] 본원에 기재된 분화 방법은 현탁액 중의 세포 또는 2D 또는 3D 고체 지지체에 부착된 세포를 사용하여 수행할 수 있다. 고체 지지체에는 유리 또는 플라스틱 배양 접시, 다중웰 접시, 플라스크, 플레이트, 미세담체[microcarrier], 폴리비닐리덴 플루오리드, 중합체 필름, 예컨대 금속 필름 및 3D 뼈대가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 분화는 2D 배양 시스템에서 발생한다. 일부 구현예에서, 분화는 합성 또는 천연 히드로겔로 구성된 3D 뼈대에서 발생한다. 예시적인 구현예에서, 3D 뼈대는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 뼈대이다. 특정 구현예에서, 3D 뼈대는 역 콜로이드성 결정 PEG 뼈대이다. 예를 들어, 특히 역 콜로이드성 결정 PEG 뼈대와 관련된 부분에서, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Shirahama et al., J Vis Exp. 114:54331 (2016)]을 참조한다.

[1010] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 하나 이상의 세포외 기질 성분을 포함하는 2D 또는 3D 고체 지지체상에서 수행된다. 세포외 기질 성분은 I형, II형, 및 IV형 콜라겐, 콘카나발린 A, 콘드로이틴 설페이트, 피브로넥틴, '수퍼피브로넥틴(superfibronectin)' 및/또는 피브로넥틴-유사 중합체, 젤라틴, 라미닌, 폴리-D 및 폴리-L-리신, 매트리겔™, 트롬보스폰딘, 및/또는 비트로넥틴을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 구현예에서, 고체 지지체는 재조합 라미닌(예를 들어, 라미닌 521, BioLamina)로 코팅된다. 일부 구현예에서, 고체 지지체는 소 태아 혈청[fetal bovine serum, FBS]가 없다. 분화가 간세포-유사 전구세포 중간체를 통해 발생하는 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포 중간체는 성숙 간세포-유사 세포로의 분화를 촉진하는 ECM 성분으로 코팅된 고체 기질로 전달된다. 일부 구현예에서, 분화는 초기에 소 태아 혈청이 없는 제1 기질에서 발생하고, 그 후, 분화 세포를 라미닌 및/또는 콜라겐을 포함하는 제2 기질로 전달하여 성숙 간세포-유사 세포로의 분화를 촉진한다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 분화 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24일에 제2 기질로 전달된다. 일부 구현예에서, 제1 기질은 젤라틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 기질은 소 태아 혈청을 더 포함한다. 성숙 간세포-유사 세포로의 분화를 촉진하는 예시적인 ECM 성분은 예를 들어 재조합 라미닌 411(BioLamina)를 포함한다.

[1011] 일부 구현예에서, 분화는 히드로겔 기질을 사용하여 수행된다. 히드로겔 기질은 2D 또는 3D 배양 시스템의 일부로서 제공되는 분화 방법과 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 히드로겔 기질은 2, 1, 0.5, 또는 0.1 kPa 미만의 탄성 계수를 갖는다. 일부 구현예에서, 히드로겔 매트릭스는 10 Pa 내지 5 kPa, 10 Pa 내지 1 kPa, 8 Pa 내지 1 kPa, 50 Pa 내지 5 kPa, 100 Pa 내지 5 kPa, 200 Pa 내지 5 kPa, 250 Pa 내지 5 kPa, 500 Pa 및 5 kPa, 750 Pa 내지 5 kPa, 1 kPa 내지 5 kPa, 10 Pa 내지 5 kPa, 10 Pa 내지 1 kPa, 10 Pa 내지 900 Pa, 10 Pa 내지 800 Pa, 10 Pa 내지 700 Pa, 10 Pa 내지 600 Pa, 10 Pa 내지 500 Pa, 10 Pa 내지 400 Pa, 10 Pa 내지 300 Pa,

10 Pa 내지 200 Pa, 10 Pa 내지 100 Pa, 10 Pa 내지 50 Pa, 또는 10 Pa 내지 25 Pa의 탄성 계수를 갖는다. 일부 구현예에서, 히드로겔 기질은 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 kPa 이상의 탄성 계수를 갖는다. 일부 구현예에서, 히드로겔 기질은 1 내지 100 kPa, 5 내지 100 kPa, 10 내지 100 kPa, 25 내지 100 kPa, 50 내지 100 kPa, 1 내지 100 kPa, 1 내지 50 kPa, 1 내지 40 kPa, 1 내지 30 kPa, 1 내지 25 kPa, 1 내지 20 kPa, 1 내지 15 kPa, 1 내지 10 kPa, 10 내지 50 kPa, 10 내지 40 kPa, 10 내지 35 kPa, 10 내지 30 kPa, 10 내지 25 kPa, 10 내지 20 kPa, 10 내지 15 kPa, 1 내지 10 kPa, 20 내지 50 kPa, 20 내지 40 kPa, 20 내지 35 kPa, 20 내지 30 kPa, 20 내지 25 kPa, 30 내지 50 kPa, 30 내지 40 kPa, 30 내지 35 kPa, 또는 40 내지 50 kPa의 탄성 계수를 갖는다. 특정 구현예에서, 히드로겔 기질은 Yes 연관 단백질 1[Yes Associated Protein 1, YAP1]이 성숙 간세포-유사 세포로의 분화를 방해하는 것을 방지하는 탄성 계수를 갖는다. 강직성 기질은 핵 YAP1을 통해 간세포-유사 전구세포에서 세포 확산[skpreading]을 유발하는 것으로 여겨진다. 이러한 세포 확산은 간세포-유사 전구세포가 담관세포로 분화되도록 하여, 간세포 분화를 방해한다. 따라서, 일부 구현예에서, 탄성 히드로겔 기질(2 kPa 미만)은 유리하게는 성숙 간세포-유사 세포로의 분화를 촉진시킨다. 일부 구현예에서, 히드로겔 기질은 하나 이상의 ECM 구성성분에 부착된다. 일부 구현예에서, ECM 구성성분은 적어도 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1,000 μM의 ECM의 밀도로 히드로겔 기질에 부착된다. 일부 구현예에서, ECM 구성성분은 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1,000 μM 미만의 ECM 밀도로 히드로겔 기질에 부착된다. 일부 구현예에서, ECM 성분은 적어도 50 내지 5,000 μM, 50 내지 4,000 μM, 50 내지 3,000 μM, 50 내지 2000 μM, 50 내지 1,000 μM, 50 내지 500 μM, 50 내지 400 μM, 1 내지 300 μM, 50 내지 200 μM, 50 내지 100 μM, 50 내지 75 μM, 50 내지 50 μM, 50 내지 25 μM, 50 내지 10 μM, 100 내지 5,000 μM, 100 내지 4,000 μM, 100 내지 3,000 μM, 100 내지 2,000 μM, 100 내지 1,000 μM, 100 내지 1000 μM, 100 내지 400 μM, 1 내지 300 μM, 100 내지 200 μM, 250 내지 5,000 μM, 500 내지 5,000 μM, 750 내지 5,000 μM, 1,000 내지 5,000 μM, 2,000 내지 5,000 μM, 3,000 내지 5,000 μM, 4,000 내지 5,000 μM, 250 내지 5,000 μM, 500 내지 5,000 μM, 750 내지 5,000 μM, 1,000 내지 5,000 μM, 2,000 내지 5,000 μM, 3,000 내지 5,000 μM, 4,000 내지 5,000 μM, 100 내지 1,000 μM, 200 내지 900 μM, 300 내지 800 μM, 400 내지 700 μM, 또는 500 내지 600 μM의 ECM의 밀도로 히드로겔 기질에 부착된다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 고밀도의 ECM 구성성분을 갖는 탄성 히드로겔의 존재하에 발생한다. 저밀도의 ECM 구성성분을 포함하는 강성 히드로겔 및 저밀도의 ECM 구성성분을 포함하는 탄성 히드로겔은 성숙 간세포-유사 세포로의 성숙을 촉진한다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 고밀도의 ECM 구성성분을 포함하는 탄성 히드로겔의 존재하에 발생한다. 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포로의 분화는 저밀도의 ECM 구성성분을 포함하는 강성 히드로겔의 존재하에 발생한다.

[1012] 일부 구현예에서, 분화 세포는 인간 제대 정맥 내피 세포[Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC]의 존재하에 공동 배양된다. 성숙 간세포 유사 세포로의 분화가 시험관내 요소형성 능력을 향상시키는 것으로 나타났다. 간세포-유사 전구세포 중간체에 의해 분화가 발생하는 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는 HUVEC의 존재하에 배양된다. 일부 구현예에서, 간세포-유사 전구세포는 배양물 중 HUVEC와 직접 접촉한다. 다른 구현예에서, 간세포-유사 전구세포 및 HUVEC는 다공성 막(예를 들어, 트랜스웰 배양 시스템)에 의해 분리된 두 개의 상이한 구획에서 배양된다.

[1013] 2D 부착 배양에서 간세포 분화 프로토콜

[1014] 만능 줄기 세포-유래 간세포-유사 세포는 2D 부착 배양 시스템을 사용하는 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 이 방법은 단일 세포 계대 및 이종이 없는[xeno-free] 구성성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 분화 전에 만능성을 유지하기 위해 표준 세포 배양 배지에서 유지된다.

[1015] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 액티빈 A, bFGF, BMP4, LY294002, CHIR99021을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 0일에 배양된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 액티빈 A, bFGF, BMP4, LY294002, CHIR99021을 포함하는 제1 배지에서 0일에 배양된다. 일부 경우에서, 만능 줄기 세포는 본원에 기재된 것을 비롯한 ECM의 하나 이상의 구성성분상에서 배양된다.

[1016] 일부 구현예에서, 분화 세포는 액티빈 A, bFGF, BMP4, 및 LY294002를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 1일에 배양된다. 일부 구현예에서, 분화 세포를 액티빈 A, bFGF, BMP4, 및 LY294002를 포함하는 제2 배지에서 1일에 배양한다. 일부 구현예에서, 제1일에 배양된 세포는 세포의 네트워크를 형성한다.

[1017] 일부 구현예에서, 분화 세포는 제2일에 액티빈 A 및 bFGF를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 2일에 액티빈 A 및 bFGF를 포함하는 제3 배지에서 배양된다. 일부 경우에서, 배양 배지는 B27 보충제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 2일에 배양된 세포는 최종 내배엽-유사 세포 형태 및/또는 활성을 나타낸다.

[1018] 일부 구현예에서, 분화 세포는 액티빈 A를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 3-7일에 배양된다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 3-7일에 액티빈 A를 포함하는 제4 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 2-4일에 배양된 세포는 중내배엽-유사 세포 형태 및/또는 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 5-7일에 배양된 세포는 최종 내배엽-유사 세포 형태학 및/또는 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 약 6-7일에 배양된 세포는 간모세포-유사 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 6-7일에 배양된 세포는 간모세포-유사 세포 형태 및/또는 활성을 나타낸다.

[1019] 일부 구현예에서, 분화 세포는 이에 제한되지는 않지만 온코스타틴-M 및 HGF을 포함하는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 8-27일에 배양된다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 8-27일에 온코스타틴-M 및 HGF를 포함하는 제5 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 B27 보충제를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 8-10일에 배양된 세포는 한정된 입방체 형태를 나타낸다. 일부 구현예에서, 13-15일에 배양된 세포는 다면체 형태를 나타낸다. 일부 구현예에서, 분화 방법의 13-15일에, 세포는 간 내배엽 세포 형태 및/또는 활성을 나타낸다.

[1020] 일부 구현예에서, 분화 세포는 이에 제한되지는 않지만 온코스타틴-M, HGF, 및 포르스콜린을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 28-35일에 배양된다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 온코스타틴-M, HGF 및 포르스콜린을 포함하는 제6 배지에서 28-35일에 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 화학적으로 규정된 지질, 및 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄의 혼합물을 더 포함한다.

[1021] 일부 구현예에서, 20-28일에 세포는 간세포-유사 세포(미성숙 간세포-유사 세포) 형태 및/또는 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 25-35일에 세포는 간세포-유사 세포(성숙 간세포-유사 세포) 형태 및/또는 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 20-35일에 세포는 미성숙 간세포-유사 세포, 성숙 간세포-유사 세포, 또는 둘 다를 포함하는 간세포-유사 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 분화된 세포는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 미성숙 간세포-유사 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법이 제시하는 기술에 따라 분화된 세포는 적어도 80%, 81, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 성숙 간세포-유사 세포를 포함한다.

[1022] 일부 구현예에서, 성숙 간세포-유사 세포는 간세포, 예컨대 비제한적으로 일차 간세포를 유지 및/또는 증식시키기 위한 표준 배지에서 배양된다. 본원에 기재된 임의의 배지 조성물은 또한 비-필수 아미노산, 글루타민, 및 그의 유사체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 건강한 세포를 유지하는데 필수적인 성분을 함유할 수 있다.

[1023] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포를 0일에 액티빈 A, bFGF, BMP4, LY294002, CHIR99021을 포함하는 제1 배지에서 배양한다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포를 1일에 액티빈 A, bFGF, BMP4, 및 LY294002를 포함하는 제2 배지에서 배양한다. 그 후, 일부 구현예에서, 분화 세포를 3일에 액티빈 A 및 bFGF를 포함하는 제3 배지에서 배양한다. 그 후, 일부 구현예에서, 분화 세포를 3-7일에 액티빈 A를 포함하는 제4 배지에서 배양한다. 그 후 일부 구현예에서, 분화 세포를 8-27일에 온코스타틴-M 및 HGF를 포함하는 제5 배지에서 배양한다. 그 후 일부 구현예에서, 분화 세포를 28-35일에 온코스타틴-M, HGF 및 포르스콜린을 포함하는 제6 배지에서 배양한다.

[1024] 일부 구현예에서, LY294002는 약 1-20 μM, 약 1-15 μM, 약 1-10 μM, 약 1-8 μM, 약 1-5 μM, 약 2-15 μM, 약 2-10 μM, 약 2-8 μM, 약 1-5 μM, 약 1 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 약 10 μM, 약 11 μM, 약 12 μM, 약 13 μM, 약 14 μM, 약 15 μM, 약 16 μM, 약 17 μM, 약 18 μM, 약 19 μM, 또는 약 20 μM이다. 많은 구현예에서, 배지는 10 μM 농도의 LY294002를 포함한다.

[1025] 일부 구현예에서, CHIR-99021은 약 1-15 μM, 약 1-10 μM, 약 1-8 μM, 약 1-5 μM, 약 2-15 μM, 약 2-10 μM, 약 2-8 μM, 약 1-5 μM, 약 1 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 약 10 μM, 약 11 μM, 약 12 μM, 약 13 μM, 약 14 μM, 또는 약 15 μM의 농도로 존재한다. 많은 구현예에서, 배지는 3 μM 농도의 CHIR-99021을 포함한다.

[1026] 일부 구현예에서, 액티빈 A는 20 ng/ml-200 ng/ml, 약 25 ng/ml-200 ng/ml, 약 30 ng/ml-200 ng/ml, 약 40 ng/ml-200 ng/ml, 약 50 ng/ml-200 ng/ml, 약 60 ng/ml-200 ng/ml, 약 70 ng/ml-200 ng/ml, 약 80 ng/ml-200

ng/ml, 약 90 ng/ml-200 ng/ml, 약 100 ng/ml-200 ng/ml, 약 20 ng/ml-100 ng/ml, 약 30 ng/ml-100 ng/ml, 약 40 ng/ml-100 ng/ml, 약 50 ng/ml-100 ng/ml, 약 60 ng/ml-100 ng/ml, 약 70 ng/ml-100 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 60 ng/ml, 약 65 ng/ml, 약 70 ng/ml, 약 75 ng/ml, 약 80 ng/ml, 약 85 ng/ml, 약 90 ng/ml, 약 95 ng/ml, 약 100 ng/ml, 약 105 ng/ml, 약 110 ng/ml, 약 115 ng/ml, 약 120 ng/ml, 약 125 ng/ml, 약 130 ng/ml, 약 135 ng/ml, 약 140 ng/ml, 약 145 ng/ml, 약 150 ng/ml, 약 155 ng/ml, 약 160 ng/ml, 약 165 ng/ml, 약 170 ng/ml, 약 175 ng/ml, 약 180 ng/ml, 약 185 ng/ml, 약 190 ng/ml, 약 195 ng/ml, 또는 약 200 ng/ml의 농도로 존재한다. 많은 구현예에서, 배지는 50 ng/㎖ 또는 100 ng/㎖ 농도의 액티빈 A를 포함한다.

[1027] 일부 구현예에서, bFGF는 약 5 ng/㎖, 약 7 ng/㎖, 약 8 ng/㎖, 약 10 ng/㎖, 약 13 ng/㎖, 약 15 ng/㎖, 약 17 ng/㎖, 약 18 ng/㎖, 약 20 ng/ml, 약 23 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 27 ng/ml, 약 28 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 37 ng/ml, 약 38 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 43 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 47 ng/ml, 약 48 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 51 ng/ml, 약 52 ng/ml, 약 53 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 58 ng/ml, 약 5 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-30 ng/ml, 약 10 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-20 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml-50 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 80 ng/㎖의 농도의 bFGF를 포함한다.

[1028] 일부 구현예에서, BMP4는 약 5 ng/ml, 약 7 ng/ml, 약 8 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 13 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 17 ng/ml, 약 18 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 23 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 27 ng/ml, 약 28 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 37 ng/ml, 약 38 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 43 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 47 ng/ml, 약 48 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 51 ng/ml, 약 52 ng/ml, 약 53 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 58 ng/ml, 약 5 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-30 ng/ml, 약 10 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-20 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml-50 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 BMP4를 10 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1029] 일부 구현예에서, OSM은 약 5 ng/ml, 약 7 ng/ml, 약 8 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 13 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 17 ng/ml, 약 18 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 23 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 27 ng/ml, 약 28 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 37 ng/ml, 약 38 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 43 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 47 ng/ml, 약 48 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 51 ng/ml, 약 52 ng/ml, 약 53 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 58 ng/ml, 약 5 ng/ml-50 ng/ml, 약 5 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-30 ng/ml, 약 30 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-20 ng/ml, 또는 약 30 ng/ml-50 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 OSM을 10 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1030] 일부 구현예에서, HGF는 약 25 ng/ml-200 ng/ml, 약 30 ng/ml-200 ng/ml, 약 40 ng/ml-200 ng/ml, 약 50 ng/ml-200 ng/ml, 약 60 ng/ml-200 ng/ml, 약 70 ng/ml-200 ng/ml, 약 80 ng/ml-200 ng/ml, 약 90 ng/ml-200 ng/ml, 약 100 ng/ml-200 ng/ml, 약 30 ng/ml-100 ng/ml, 약 40 ng/ml-100 ng/ml, 약 50 ng/ml-100 ng/ml, 약 60 ng/ml-100 ng/ml, 약 70 ng/ml-100 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 60 ng/ml, 약 65 ng/ml, 약 70 ng/ml, 약 75 ng/ml, 약 80 ng/ml, 약 85 ng/ml, 약 90 ng/㎖, 약 95 ng/㎖, 약 100 ng/㎖, 약 105 ng/㎖, 약 110 ng/㎖, 약 115 ng/㎖, 약 120 ng/ml, 약 125 ng/ml, 약 130 ng/ml, 약 135 ng/ml, 약 140 ng/ml, 약 145 ng/ml, 약 150 ng/ml, 약 155 ng/ml, 약 160 ng/ml, 약 165 ng/ml, 약 170 ng/ml, 약 175 ng/ml, 약 180 ng/ml, 약 185 ng/ml, 약 190 ng/ml, 약 195 ng/ml, 또는 약 200 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 50 ng/㎖의 농도로 HGF를 포함한다.

[1031] 일부 구현예에서, 포르스콜린은 약 1-20 μM, 약 1-15 μM, 약 1-10 μM, 약 1-8 μM, 약 1-5 μM, 약 2-15 μM, 약 2-10 μM, 약 2-8 μM, 약 1-5 μM, 약 1 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 약 10 μM, 약 11 μM, 약 12 μM, 약 13 μM, 약 14 μM, 약 15 μM, 약 16 μM, 약 17 μM, 약 18 μM, 약 19 μM 또는 약 20 μM의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 10 μM 농도의 포르스콜린을 포함한다.

[1032] 3D 현탁 배양물에서의 간세포 분화 프로토콜

[1033] 만능 줄기 세포-유래 간세포-유사 세포는 3D 현탁 배양 시스템을 사용하는 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 분화 전에 만능성을 유지하기 위하여 표준 세포 배지 중에 유지된다.

[1034] 일부 구현예에서, 세포는 0일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, bFGF, BMP4 및 CHIR99021을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 0일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, bFGF, BMP4 및 CHIR99021을 포함하는 제1 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기

세포는 본원에 기재된 것들을 포함하여 지지체 표면에 대한 적은 부착 또는 비-부착을 용이하게 하는 고체 지지체상에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 다음 성분들, 즉 인간 혈청 알부민, 화학적으로 규정된 지질, 비필수 아미노산, 아스코르브산-2-인산염, 홀로-트랜스페린(holo-transferrin), 아셀렌산나트륨, 및 간세포 분화 및/또는 세포 건강을 용이하게 하기 위한 임의의 추가의 시약 중 하나 이상을 더 포함한다.

[1035] 일부 구현예에서, 세포는 mL당 약 500,000 내지 약 5,000,000 세포, 예를 들어 약 500,000-5,000,000, 약 500,000-4,500,000, 약 500,000-4,000,000, 약 500,000-3,500,000, 약 500,000-3,000,000, 약 500,000-2,500,000, 약 500,000-2,000,000, 약 500,000-2,500,000, 약 500,000-1,500,000, 약 500,000-1,000,000, 약 1,000,000-5,000,000, 약 1,000,000-4,500,000, 약 1,000,000-4,000,000, 약 1,000,000-3,500,000, 약 1,000,000-3,000,000, 약 1,000,000-2,500,000, 약 1,000,000-2,000,000, 약 1,000,000-1,500,000 세포/mL의 세포 농도 (세포 밀도)로 배양된다.

[1036] 일부 구현예에서, 세포는 저산소 조건 하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 저산소 조건은 약 0% 내지 약 5%의 산소, 예를 들어, 약 0%-5%, 약 0%-4%, 약 0%-3%, 약 0%-2%, 약 0%-3%, 약 0%-4%, 약 1%-5%, 약 1%-4%, 약 1%-3%, 약 1%-2%, 약 2%-3%, 약 3%-4%, 약 4%-5%, 약 2%-5%, 및 약 3%-5%의 산소 함량을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 집합체로 존재한다.

[1037] 일부 구현예에서, 세포 집합체는 직경이 약 100-250 ㎛, 예를 들어 약 100-250, 약 100-240, 약 100-230, 약 100-220, 약 100-210, 약 100-200, 약 110-250, 약 120-250, 약 130-250, 약 140-250, 약 150-250, 약 160-250, 약 100-200, 약 100-190, 약 100-180, 약 100-170, 약 140-250, 약 140-250, 약 140-240, 약 140-230, 약 140-220, 약 140-210, 약 140-200, 약 140-190 ㎛이다.

[1038] 일부 구현예에서, 분화 세포 집합체는 1일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, bFGF 및 BMP4를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 1일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, bFGF 및 BMP4를 포함하는 제2 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 다음 구성성분들, 즉 인간 혈청 알부민, 화학적으로 규정된 지질, 비필수 아미노산, 아스코르브산-2-인산염, 홀로-트랜스페린, 아셀렌산나트륨, 및 간세포 분화 및/또는 세포 건강을 용이하게 하기 위한 임의의 추가의 시약 중 하나 이상을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 약술된 세포는 0-21일부터 저산소 조건 하에 배양된다.

[1039] 일부 구현예에서, 분화 세포 집합체는 2일에 이에 제한되지는 않지만 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, 및 bFGF를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 2일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A 및 bFGF를 포함하는 제3 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 다음 구성성분, 즉 인간 혈청 알부민, 화학적으로 규정된 지질, 비필수 아미노산, 아스코르브산-2-인산염, 홀로-트랜스페린, 아셀렌산나트륨, 및 간세포 분화 및/또는 세포 건강을 용이하게 하기 위한 임의의 추가의 시약 중 하나 이상을 더 포함한다.

[1040] 일부 구현예에서, 분화 세포 집합체는 3-5일에 B27 보충제 및 액티빈 A를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 3-5일에 B27 보충제 및 액티빈 A를 포함하는 제4 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 일부 구현예를 더 포함하고, 배지는 또한 다음의 구성성분, 즉 인간 혈청 알부민, 화학적으로 규정된 지질, 비필수 아미노산, 아스코르브산-2-인산염, 홀로-트랜스페린, 아셀렌산 나트륨 및 간세포 분화 및/또는 세포 건강을 촉진하기 위한 임의의 추가 시약 중 하나 이상을 더 포함한다. 매일, 격일로 또는 필요에 따라 배지를 새로 고치거나, 변경하거나 교체할 수 있다.

[1041] 일부 구현예에서, 분화 세포 집합체는 6-9일에, 이에 제한되지는 않지만 B27 보충제, BMP4 및 FGF10을 포함하는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 6-9일에 B27 보충제, BMP4, 및 FGF10을 포함하는 제5 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 하나 이상의 다음 구성성분, 즉 인간 혈청 알부민, 화학적으로 규정된 지질, 비필수 아미노산, 아스코르브산-2-인산염, 홀로-트랜스페린, 아셀렌산 나트륨 및 간세포 분화 및/또는 세포 건강을 촉진하기 위한 임의의 추가 시약 중 하나 이상을 더 포함한다. 매일, 격일로 또는 필요에 따라 배지를 새로 고치거나, 변경하거나 교체할 수 있다.

[1042] 일부 구현예에서, 분화 세포 집합체는 10-14일에, 이에 제한되지는 않지만 HGF를 포함하는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 10-14일에 HGF를 포함하는 제5 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배지는 화학적으로 규정된 지질, 및 인슐린, 트렌스페린, 및 셀레늄의 혼합물을 더 포함한다. 매일, 격일로 또는 필요에 따라 배지를 새로 고치거나, 변경하거나 교체할 수 있다.

[1043] 일부 구현예에서, 분화 세포는 15-27일에, 이에 제한되지는 않지만 온코스타틴-M을 포함하는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 15-27일에 온코스타틴-M을 포함하는 제7 배지

에서 배양된다. 일부 구현예에서, 이 분화 단계에서의 배지에는 HGF가 없다. 일부 구현예에서, 배지는 화학적으로 규정된 지질, 및 인슐린, 트렌스페린, 및 셀레늄의 혼합물을 더 포함한다. 매일, 격일로 또는 필요에 따라 배지를 새로 고치거나, 변경하거나 교체할 수 있다.

[1044] 일부 구현예에서, 분화 세포는 28-35일에, 이에 제한되지는 않지만 온코스타틴-M을 포함하는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 배양된다. 많은 구현예에서, 세포 집합체는 28-35일에 온코스타틴-M 및 포르스콜린을 포함하는 제8 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 이 분화 단계에서의 배지에는 HGF가 없다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 화학적으로 규정된 지질, 및 인슐린, 트랜스페린 및 셀레늄의 혼합물을 더 포함한다. 매일, 격일로 또는 필요에 따라 배지를 새로 고치거나, 변경하거나 교체할 수 있다.

[1045] 일부 구현예에서, 15-35일에, 세포는 미성숙 간세포-유사 세포, 성숙 간세포-유사 세포, 또는 이들 둘 모두를 포함하는 간세포-유사 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 기술의 방법에 제시된 기술에 따라 분화된 세포는 적어도 80%, 81, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 미성숙 간세포-유사 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법에 제시된 기술에 따라 분화된 세포는 적어도 80%, 81, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 성숙 간세포-유사 세포를 포함한다.

[1046] 일부 구현예에서, 세포 집합체는 정상산소 조건(정상산소)하에 배양된다. 일부 구현예에서, 정산산소 조건은 약 20% 내지 약 22% 산소, 예를 들어, 약 20%-22%, 약 20%-21%, 약 21%-22%, 약 20%, 약 21%, 및 약 22%의 산소 함량을 포함한다. 즉, 정상 산소 조건은 O_2의 주위 농도 수준을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집합체는 적어도 15-27, 21-27, 20-28, 20-35, 27-35, 28-35, 29-35, 또는 30-35일에 정상산소 조건 하에서 배양된다.

[1047] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 0일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, bFGF, BMP4 및 CHIR99021을 포함하는 제1 배지에서 배양된다. 0일에 세포는 집합체(스페로이드(spheroid)로도 지칭됨) 유래이다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 1일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A, bFGF 및 BMP4를 포함하는 제2 배지에서 배양된다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 2일에 인슐린, PIK-90, 액티빈 A 및 bFGF를 포함하는 제3 배지에서 배양된다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 3-5일에 B27 보충제 및 액티빈 A를 포함하는 제4 배지에서 배양된다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 6-9일에 B27 보충제, BMP4, 및 FGF10을 포함하는 제5 배지에서 배양된다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 10-14일에 HGF를 포함하는 제6 배지에서 배양된다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 15-27일에 온코스타틴-M을 포함하는 제7 배지에서 배양된다. 그 후, 일부 구현예에서, 세포 집합체는 28-35일에 온코스타틴-M 및 포르스콜린을 포함하는 제8 배지에서 배양된다.

[1048] 일부 구현예에서, 분화 세포는 0-2일에 최종 내배엽 세포 특징을 나타낸다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 3-5일에 전방 최종 내배엽 세포 특징을 나타낸다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 6-9일에 전장[foregut] 내배엽 세포 특징을 나타낸다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 10-14일에 간 내배엽 세포 특징을 나타낸다. 일부 구현예에서, 분화 세포는 15-35일에 미성숙 간세포-유사 세포 특징을 나타낸다.

[1049] 일부 구현예에서, 인슐린은 약 0.1 ㎍/㎖, 약 0.2 ㎍/㎖, 약 0.3 ㎍/㎖, 약 0.4 ㎍/㎖, 약 0.5 ㎍/㎖, 약 0.6 ㎍/㎖, 약 0.1 ㎍/㎖-약 0.6 ㎍/㎖, 약 0.1 ㎍/㎖-약 0.5 ㎍/㎖, 약 0.1 ㎍/㎖-약 0.4 ㎍/㎖, 약 0.2 ㎍/㎖-약 0.6 ㎍/㎖, 약 0.2 ㎍/㎖-약 0.5 ㎍/㎖, 또는 약 0.2 ㎍/㎖-약 0.4 ㎍/㎖의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 인슐린을 0.2 ㎍/㎖의 농도로 포함한다.

[1050] 일부 구현예에서, PIK-90은 약 0.1 μM, 약 0.2 μM, 약 0.3 μM, 약 0.4 μM, 약 0.5 μM, 약 0.6 μM, 약 0.1 μM-약 0.6 μM, 약 0.1 μM-약 0.5 μM, 약 0.1 μM-약 0.4 μM, 약 0.2μM-약 0.6μM, 약 0.2 μM-약 0.5 μM 또는 약 0.2 μM-약 0.4 μM의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 0.1 μM 농도의 PIK-90을 포함한다.

[1051] 일부 구현예에서, CHIR-99021은 약 1-15 μM, 약 1-10 μM, 약 1-8 μM, 약 1-5 μM, 약 2-15 μM, 약 2-10 μM, 약 2-8 μM, 약 1-5 μM, 약 1 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 약 10 μM, 약 11 μM, 약 12 μM, 약 13 μM, 약 14 μM 또는 약 15 μM의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 CHIR-99021을 3 μM의 농도로 포함한다.

[1052] 일부 구현예에서, 액티빈 A는 약 20 ng/ml- 200 ng/ml, 약 25 ng/ml-200 ng/ml, 약 30 ng/ml-200 ng/ml, 약 40 ng/ml-200 ng/ml, 약 50 ng/ml-200 ng/ml, 약 60 ng/ml-200 ng/ml, 약 70 ng/ml-200 ng/ml, 약 80 ng/ml-200 ng/ml, 약 90 ng/ml-200 ng/ml, 약 100 ng/ml-200 ng/ml, 약 20 ng/ml-100 ng/ml, 약 30 ng/ml-100 ng/ml, 약 40 ng/ml-100 ng/ml, 약 50 ng/ml-100 ng/ml, 약 60 ng/ml-100 ng/ml, 약 70 ng/ml-100 ng/ml, 약 20 ng/ml,

약 25 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 60 ng/ml, 약 65 ng/ml, 약 70 ng/ml, 약 75 ng/ml, 약 80 ng/ml, 약 85 ng/ml, 약 90 ng/ml, 약 95 ng/ml, 약 100 ng/ml, 약 105 ng/ml, 약 110 ng/ml, 약 115 ng/ml, 약 120 ng/ml, 약 125 ng/ml, 약 130 ng/ml, 약 135 ng/ml, 약 140 ng/ml, 약 145 ng/ml, 약 150 ng/ml, 약 155 ng/ml, 약 160 ng/ml, 약 165 ng/ml, 약 170 ng/ml, 약 175 ng/ml, 약 180ng/ml, 약 185 ng/ml, 약 190 ng/ml, 약 195 ng/ml, 또는 약 200 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 액티빈 A를 50 ng/ml 또는 100 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1053] 일부 구현예에서, bFGF는 약 5 ng/ml, 약 7 ng/ml, 약 8 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 13 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 17 ng/ml, 약 18 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 23 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 27 ng/ml, 약 28 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 37 ng/ml, 약 38 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 43 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 47 ng/ml, 약 48 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 51 ng/ml, 약 52 ng/ml, 약 53 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 58 ng/ml, 약 5 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-30 ng/ml, 약 10 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-20 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml-50 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 bFGF를 10 ng/ml 또는 40 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1054] 일부 구현예에서, BMP4는 약 5 ng/ml, 약 7 ng/ml, 약 8 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 13 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 17 ng/ml, 약 18 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 23 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 27 ng/ml, 약 28 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 37 ng/ml, 약 38 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 43 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 47 ng/ml, 약 48 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 51 ng/ml, 약 52 ng/ml, 약 53 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 58 ng/ml, 약 5 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-30 ng/ml, 약 10 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-20 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml-50 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 BMP4를 10 ng/ml 또는 20 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1055] 일부 구현예에서, OSM은 약 5 ng/ml, 약 7 ng/ml, 약 8 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 13 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 17 ng/ml, 약 18 ng/ml, 약 20 ng/ml, 약 23 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 27 ng/ml, 약 28 ng/ml, 약 30 ng/ml, 약 35 ng/ml, 약 37 ng/ml, 약 38 ng/ml, 약 40 ng/ml, 약 43 ng/ml, 약 45 ng/ml, 약 47 ng/ml, 약 48 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 51 ng/ml, 약 52 ng/ml, 약 53 ng/ml, 약 55 ng/ml, 약 58 ng/ml, 약 5 ng/ml-50 ng/ml, 약 5 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-30 ng/ml, 약 30 ng/ml-40 ng/ml, 약 5 ng/ml-20 ng/ml, 또는 약 30 ng/ml-50 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 OSM을 30 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1056] 일부 구현예에서, HGF는 약 25 ng/ml-200 ng/ml, 약 30 ng/ml-200 ng/ml, 약 40 ng/ml-200 ng/ml, 약 50 ng/ml-200 ng/ml, 약 60 ng/ml-200 ng/ml, 약 70 ng/ml-200 ng/ml, 약 80 ng/ml-200 ng/ml, 약 90 ng/ml-200 ng/ml, 약 100 ng/ml-200 ng/ml, 약 30 ng/ml-100 ng/ml, 약 40 ng/ml-100 ng/ml, 약 50 ng/ml-100 ng/ml, 약 60 ng/ml-100 ng/ml, 약 70 ng/ml-100 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 30 ng/㎖, 약 35 ng/㎖, 약 40 ng/㎖, 약 45 ng/㎖, 약 50 ng/㎖, 약 55 ng/㎖, 약 60 ng/ml, 약 65 ng/ml, 약 70 ng/ml, 약 75 ng/ml, 약 80 ng/ml, 약 85 ng/ml, 약 90 ng/ml, 약 95 ng/ml, 약 100 ng/ml, 약 105 ng/ml, 약 110 ng/ml, 약 115 ng/ml, 약 120 ng/ml, 약 125 ng/ml, 약 130 ng/ml, 약 135 ng/ml, 약 140 ng/ml, 약 145 ng/ml, 약 150 ng/ml, 약 155 ng/ml, 약 160 ng/ml, 약 165 ng/ml, 약 170 ng/ml, 약 175 ng/ml, 약 180 ng/ml, 약 185 ng/ml, 약 190 ng/ml, 약 195 ng/ml, 또는 약 200 ng/ml의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 HGF를 50 ng/ml의 농도로 포함한다.

[1057] 일부 구현예에서, 포르스콜린은 약 1-20 μM, 약 1-15 μM, 약 1-10 μM, 약 1-8 μM, 약 1-5 μM, 약 2-15 μM, 약 2-10 μM, 약 2-8 μM, 약 1-5 μM, 약 1 μM, 약 2 μM, 약 3 μM, 약 4 μM, 약 5 μM, 약 6 μM, 약 7 μM, 약 8 μM, 약 9 μM, 약 10 μM, 약 11 μM, 약 12 μM, 약 13 μM, 약 14 μM, 약 15 μM, 약 16 μM, 약 17 μM, 약 18 μM, 약 19 μM, 또는 약 20 μM의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 배지는 포르스콜린을 10 μM의 농도로 포함한다.

[1058] 본원에 기재된 간세포는 간 기능 장애와 연관된 질환 또는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[1059] 간 질환을 갖는 대상을 치료하는 방법이 기재된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 예컨대 간 줄기 세포를 대상의 간과 생체내에서 접촉시킴으로써, 또는 간 줄기 세포를 대상의 간 내로 이식함으로써, 본원에 기재된 간 줄기 세포를 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여되거나 이식된 세포는 대상의 간 내로 통합되고 이를 재집단화하여, 이로써 간 질환을 치료한다. 일부 구현예에서, 방법은 예컨대 분화된 간 줄기 세포 또는 줄기 세포 유래 세포를 대상의 간과 생체내에서 접촉시킴으로써, 또는 간 줄기 세포 또는 줄기 세포 유래 세포를 대상의 간 내로 이식함으로써, 본원에 기재된 분화된 간 줄기 세포 또는 줄기 세포 유래 세포를 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 투여되거나 이식된 세포는 대상의 간 내로 통합되고 이를 재집단화하여, 이로써 간 질환을 치료한다. 일부 구현예에서, 간 질환은 대사 질환, 자가면역 질환, 감염성 질환, 약물 유도 급성 및 만성 간부전, 간경변증, 및 간암의 군에서 선택된다.

[1060] 예를 들어, 본원에 기재된 간세포는 간경변증 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 이러한 간세포는 간경변증 환자에서 간 재생을 위해 사용될 수 있다.

[1061] 간줄기 세포[liver stem cell, LSC]와 이들의 분화된 간세포[dHep] 및 담관세포는 서로 다른 간질환에 의해 야기된 간경변증을 치료할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 시험관내 유래된 자가[autologous] LSC, dHep 및 담관세포는 동일한 환자에게 전달되어 간부전을 구제하고, 간경변증을 감소시킬 수 있다. LSC는 동일한 환자에서 유래할 수 있고 확장을 위해 시험관내에서 배양될 수 있다. dHep 및 담관 세포는 LSC에서 시험관내 분화될 수 있다. 이들 줄기 세포 및 분화된 세포는 자가이며, 환자에서 이식 거부를 유도하지 않을 것이다.

[1062] 간줄기 세포[LSC]와 이들의 분화된 간세포[dHep] 및 담관세포는 서로 다른 간질환에 의해 야기된 간경변증을 치료할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 시험관내 유래된 동종이계 LSC, dHep 및 담관 세포는 환자에게 전달되어 간부전을 구제하고, 간경변증을 감소시킬 수 있다. LSC는 공여자에서 유래할 수 있고 확장을 위해 시험관내에서 배양될 수 있다. dHep 및 담관세포는 LSC에서 시험관내 분화될 수 있다. 이들 줄기 세포 및 분화된 세포는 동종이계이며, 본원에 기재된 저면역 변형의 일부 또는 전부가 적용되는 경우, 환자에서 이식 거부를 유도하지 않을 것이다.

[1063] 제WO2016200340A1호는 간 줄기 세포와 분화된 간 줄기 세포[dHep] 모두가, 간경변증 마우스를 유도하기 위해 티오아세트아미드로 처리된 마우스에 이식된 경우, 간경변증 표현형을 구제했다는 것을 입증한다. 마우스는 2-3개월 동안 티오아세트아미드 처리를 지속함으로써 간경변증이 발생했다. 제WO2016200340A1호에 기재된 바와 같이, 간 줄기 세포 및 간 줄기 세포 분화된 dHep 세포는 비장내 주사에 의해 마우스에 이식될 수 있다. 이식 후, 생쥐는 추가의 3개월 동안 약물 치료를 계속 받을 수 있다. 생쥐의 간 기능은 세번째 달에 검사할 수 있다. 이식된 마우스 군은 이식되지 않은 대조군에 비해 혈청 알부민이 높을 수 있다. 따라서 간 기능은 부분적으로 구제될 수 있다. dHEP 세포를 이식받은 마우스의 간은 대조군보다 섬유증 및 염증이 적을 수 있다. dHEP는 이식된 마우스 간에서 재집단화될 수 있다. 간 줄기 세포 및 dHEP 세포 둘 모두는 마우스 간 조직에 통합되고 인간 특이적 알부민을 발현할 수 있다.

[1064] 본원에 기재된 간세포를 사용하여 치료될 수 있는 질환 및 장애는 크리글러-나자르 증후군 1형, 가족성 고콜레스테롤혈증, VII 인자 결핍, 글리코겐 저장 질환 I형, 영아 레프섬(Refsum)병, 진행성 가족성 간내 담즙 정체 2형, 유전성 티로신혈증 1형, 및 다양한 요소 회로 결함, 급성 약물-유도된 간부전이 있는 소아 및 성인 환자를 비롯한 급성 간부전, 바이러스-유도된 급성 간부전, 특발성 급성 간부전, 버섯중독-유도된 급성 간부전, 수술후 급성 간부전, 임신 중 급성 지방간에 의해 유도된 급성 간부전, 간경변증 및/또는 섬유증을 비롯한 만성 간질환, 만성 간질환 환자에서 다음의 급성 사례, 즉 알코올 섭취, 약물 섭취, 및/또는 B형 간염 발작 중 하나로 인해 발생된 급성 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 환자는 이들 또는 다른 간 병태 중 하나 이상을 가질 수 있다.

[1065] 본원에 기재된 간세포를 사용하여 치료할 수 있는 질환 및 장애는 간세포-특이적(간세포-내인성) 기능 장애를 포함한다. 예를 들어, 상기 질환 및/또는 장애의 기능 장애 및 병인[etiology]은 대상 내에 존재하는 내인성 간세포의 기능 장애로 인한 것이거나, 또는 주로 기능 장애에 기인한 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 간세포-특이적 기능 장애는 유전성이거나 대상에 의해 유전될 수 있다. 일부 구현예에서, 질환 또는 장애의 병인은 간세포 이외의 세포 유형을 실질적으로 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 질환 또는 장애는 감소된 간 기능, 간질환(급성 또는 만성), 또는 내인성 간세포에서 유래한 다른 불리한 상태를 초래한다. 따라서, 일부 구현예에서, 예를 들어, 질환이 내인성 간세포 집단에 고유한 경우, 효과적인 치료는 본원에 기재된 바와 같은 간세포를 이용한 대체, 보충, 이식, 또는 재집단화를 포함할 수 있다. 이론에 매이지 않고, 내인성 간세포의 간세포-내인성 질환/장애 대체 및/또는 보충은 이식된 간세포에 부정적인 영향을 미치는 질환/장애 없이 상당한 임상적 개선을 초래할 수 있다. 예를 들어, 대상이 간세포 기능에 영향을 미치는 유전적 장애(예를 들어, 고티로신혈증과 같은, 간세포 내의 아미노산 대사)를 갖는 경우, 동종이계 이식된 간세포는 대상 내의 질환/장애의 존재에 의해 본질적으로 영향을 받지 않을 수 있다. 따라서, 이식된 간세포는 대상 내에서 실질적으로 생착, 생존, 확장 및/또는 재집단화되어, 상당한 긍정적인 임상 결과를 초래할 수 있다.

[1066] 간세포-특이적(간세포-고유) 기능 장애를 특징으로 하는 질환 및 장애는 간세포 특이적이지 않고 간세포 외인성 인자를 포함하는 병인을 갖는 질환 및 장애와 대조될 수 있다. 간세포 외인성 인자 및/또는 병인을 갖는 질환의 예는, 예를 들어, 알코올성 지방간염, 알코올성 간 질환[alcoholic liver diseas, ALD], 간 지방증/비알코올성 지방간 질환[nonalcoholic fattey liver disease, NAFLD] 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 간세포 외인성 질환은 알코올, 식이, 감염 등과 같이 외인이거나 내인성 간세포 외부에서 유래하는 간 손상을 포함한다. 일

부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 치료되는 질환 및 장애는 간세포-특이적(간세포-고유) 기능 장애가 아닌 질환 및 장애를 포함할 수 있다.

[1067] 간세포-고유 및 간세포-관련 질환의 예는 간-관련 효소 결핍, 간세포-관련 수송 질환 등을 포함한다. 이러한 간 관련 결핍은 후천성 또는 유전성 질환일 수 있으며 대사 질환(예를 들어, 간-기반 대사 장애)을 포함할 수 있다. 유전성 간-기반 대사 장애는 예를 들어, 이에 제한되지는 않지만, 문헌[Ishak, Clin Liver Dis (2002) 6:455-479]에 기재된 질환과 같은, '간의 유전성 대사 질환'으로 지칭될 수 있다. 간-관련 결핍은, 일부 경우에서, 예를 들어, 급성 및/또는 만성 간 질환이 치료되지 않은 채로 두거나 불충분하게 치료되었을 때의 결과인 결핍의 경우를 포함하여, 급성 및/또는 만성 간 질환을 초래할 수 있다. 유전성 간-관련 효소 결핍, 간세포-관련 수송 질환 등의 비제한적 예는 크리글러-나자르 증후군 1형, 가족성 고콜레스테롤혈증, VII 인자 결핍, 글리코겐 저장 질환 I형, 영아 레프섬병, 진행성 가족성 간내 담즙 정체 2형, 유전성 티로신혈증(예를 들어, 유전성 티로신혈증 1형), 유전성 요소 회로 결함, 페닐케톤뇨증[phenylketonuria, PKU], 유전성 혈색소증, 알파-I 항트립신 결핍[Alpha-I antitrypsin deficiency, AATD], 윌슨병 등을 포함한다. 적어도 일부 간 표현형, 병리학, 및/또는 간-관련 증상(들)을 갖는 대사 질환을 비롯한 간의 유전성 대사 질환의 비제한적 예는, 5-베타-환원효소 결핍, AACT 결핍, 아르스코그(Aarskog) 증후군, 무베타지질단백혈증, 부신 백질이영양증, 알퍼스(Alpers) 질환, 알퍼스 증후군, 알파-1-항트립신 결핍, 항트롬빈 III 결핍, 아르기닌분해효소 결핍, 아르기닌숙신산뇨, 동맥간 이형성, 자가면역 림프증식성 증후군, 양성 재발성 담즙 정체, 베타-지중해 빈혈, 블룸 증후군, 버드-키아리(Budd-Chiari) 증후군, 탄수화물-결핍 당단백질 증후군, 세라미다제 결핍, 지방갈색소증[ceroid lipofuscinosis], 콜레스테롤 에스테르 저장 질환, 콜레스테롤 에스테르 저장 질환, 만성 육아종증, 만성 C형 간염, 크리글러-나자르 증후군, 낭성 섬유증, 시스틴축적증, 당뇨병, 두빈-존슨(Dubin-Johnson) 증후군, 풍토성 티로린(Tyrolean) 간경변증, 적혈구형성 프로토포르피린증, 파브리(Fabry) 질환, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 지방간염, 피브리노겐 저장 질환, 갈락토스혈증, 강글리오시드축적증, 고쉐(Gaucher)병, 유전성 혈색소증, 글리코겐증 Ia형, 글리코겐증 2형, 글리코겐증 3형, 글리코겐증 4형, 육아종성 질환, 간 가족성 아밀로이드증, 유전성 과당 불내성, 유전성 구상적혈구증, 헤르만스키-푸들락(Hermansky-Pudlak) 증후군, 호모시스틴뇨증, 고수산뇨증, 저베타지질단백혈증, 저섬유소원혈증, 임신 중 간 내 담즙 정체, 라포라(Lafora)병, 리포아미드 탈수소효소 결핍, 지질단백질 장애, 모리악(Mauriac) 증후군, 이염색성 백색질이영양증, 미토콘드리아 세포병증, 나바호(Navajo) 신경간병증, 니만-픽(Niemann-Pick)병, 담관의 비증후군성 결핍, 북미 인디언 소아기 간경변증, 오르니틴 카르바모일전달효소 결핍, 부분 지방이영양증, 피어슨(Pearson) 증후군, 만발성 피부 포르피린증, 진행성 가족성 간내 담즙 정체, 진행성 가족성 간내 담즙 정체 1형, 진행성 가족성 간내 담즙 정체 2형, 단백질 C 결핍, 슈바크만(Shwachman) 증후군, 탕헤르(Tangier)병, 혈소판감소성 자반증, 총 지방이영양증, 1형 글리코겐증, 티로린 간경변증, 티로신혈증, 요소 회로 장애, 정맥 폐색 질환, 윌슨병, 월만(Wolman)병, X-연관 하이퍼-IgM 증후군, 및 젤베거(Zellweger) 증후군을 포함한다.

[1068] 본원에 기재된 방법에 따른 대상의 치료는, 예를 들어, 연장된 생존, 지연된 질환 진행(예를 들어, 지연된 간부전), 간 부전의 예방, 개선된 및/또는 정규화된 간 기능, 개선된 및/또는 정규화된 아미노산 수준, 개선된 및/또는 정규화된 암모니아 수준, 개선된 및/또는 정규화된 알부민 수준, 개선된 및/또는 정규화된 빌리루빈, 표현형으로의 성장 실패로부터의 회복, 무기력의 감소, 둔화의 감소, 발작의 감소, 황달의 감소, 개선된 및/또는 정규화된 혈청 글루코스, 개선된 및/또는 정규화된 INR, 개선된 및/또는 정규화된 소변 시험 결과 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다양한 임상적 이점 및/또는 측정가능한 결과를 초래할 수 있다.

[1069] 예를 들어, 일부 경우에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 간세포 및/또는 간세포 전구세포의 투여는, 예를 들어, 치료 표준에 따라 치료된 대상 및/또는 본원에 기재된 바와 같이 유전적으로 변형되지 않은 간세포 및/또는 간세포 전구세포를 투여받은 대상과 비교하여, 간 질환 및/또는 간부전을 초래하는 병태가 있는 대상의 생존을 적어도 5% 증가시킨다. 이러한 대상에서 관찰된 생존율 향상 수준은 달라질 수 있으며, 적어도 5% 내지 60% 이상 범위의 증가일 수 있으며, 예를 들어, 생존율에서 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60% 이상의 증가를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 간세포 및/또는 그의 전구세포가 투여된 대상은 질환 진행의 지연 및/또는 하나 이상의 질환 증상, 예컨대 비제한적으로 예를 들어 간부전 및/또는 그에 기인하는 임의의 증상(들)의 발병에서의 지연을 경험할 수 있다. 질환 진행 및/또는 증상 발병에서의 이러한 지연은, 예를 들어, 적어도 1주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 1년 이상을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 일, 주, 개월 또는 년 동안 지속될 수 있다. 환자에게 투여되는 본원에 기술된 바와 같은 간세포는 시간 경과에 따라 환자에

서 유익한 치료 반응을 달성한다.

[1070] 치료될 수 있는 간 상태의 비제한적인 예는 급성 간헐성 포르피린증, 급성 간부전, 알라질(alagille) 증후군, 알코올성 지방간 질환, 알코올성 간염, 알코올성 간경변증, 알코올성 간 질환, 알파 1-항트립신 결핍, 아메바성 간 농양, 자가면역 간염, 담도 간경변증, 버드-키아리(budd-chiari) 증후군, 화학적 및 약물 유발 간 손상, 담즙 정체, 만성 간염, 만성 B형 간염, 만성 C형 간염, 만성 D형 간염, 말기 간 질환, 적혈구형성 프로토포르피린증, 간질증, 지방간 질환, 국소 결절성 과증식, 간 포충증, 간 뇌병증, 간 경색, 간 부전, 간 포르피린증, 간 결핵, 간 정맥-폐색성 질환, 간염, 간세포암종, 간 적혈구형성 포르피린증, 간렌즈핵변성증, 간비대, 간폐 증후군, 간신증후군, 유전성 코포르피린증, 간농양, 간 선종, 간 경변증, 간 부전, 간 신생물, 거대 간괴사, 비알코올성 지방간 질환, 기생충성 간 질환, 간 자색반병, 만발성 피부 포르피린증, 문맥성 고혈압, 화농성 간 농양, 라이(reye) 증후군, 반문상[variegate] 포르피린, 바이러스 간염, 바이러스 A형 간염, 바이러스 B형 간염, 바이러스 C형 간염, 바이러스 D형 간염, 바이러스 E형 간염 및 젤웨거 증후군 등을 포함한다. 일부 경우에서, 대상은 섬유증 또는 섬유증 상태에 대해 치료될 수 있다. 일부 경우에서, 대상은 간경변증 또는 간경변 병태에 대해 치료될 수 있다.

[1071] 본원에 기재된 치료는 만성적으로(즉, 연속적으로) 또는 비만성적으로(즉, 비연속적으로) 수행될 수 있고, 하나 이상의 작용제의 투여를 만성적으로(즉, 연속적으로) 또는 비만성적으로(즉, 비연속적으로) 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법에 따른 하나 이상의 작용제의 만성 투여는, 예를 들어, 만성 간 병태(예를 들어, 만성 간 질환, 간경변증, 알코올성 간 질환, 비알코올성 지방간 질환[NAFLD/NASH], 만성 바이러스 간염 등), 만성 유전성 간 병태(알파-1 항트립신 결핍, 유전성 혈색소증, 윌슨병, 등), 만성 간-관련 자가면역 병태(예를 들어, 일차 담즙성 간경변증[PBC], 일차 경화성 담관염[PSC], 자가면역 간염[AIH], 등) 등을 포함하는 만성 병태가 대상에게 있는 경우를 포함하는 다양한 경우에 사용될 수 있다. 만성 병태에 대한 하나 이상의 작용제의 투여는 다수의 달, 1년 이상, 다년, 등 동안의 약제의 투여를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 만성 투여는 임의의 편리한 방법으로 수행될 수 있고, 적절한 투약 일정은 예를 들어, 매일, 매일 2회, 매주, 매주 2회, 매월, 매월 2회 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에서, 예를 들어, 유전자 병태 또는 다른 지속성 유전자 치료법의 교정의 경우에, 만성 병태는 단일 또는 몇 개(예를 들어, 2, 3, 4 또는 5개)의 치료에 의해 치료될 수 있다. 하나 이상의 작용제의 비-만성 투여는 예를 들어, 한 달 또는 그 미만, 예를 들어, 몇 주의 기간, 한 주, 몇 일의 기간 동안, 제한된 수의 용량(예를 들어, 단일 용량을 포함하여, 10회 미만의 용량, 예를 들어, 9회 이하 용량, 8회 이하 용량, 7회 용량, 등)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[1072] 일부 구현예에서, 대상에게 투여되는 유전자 변형된 간세포의 양은 예를 들어, 적어도 1000만, 적어도 2500만, 적어도 5000만, 적어도 7500만, 적어도 1억, 적어도 2억5천만, 적어도 5억, 적어도 7억5천만, 적어도 10억, 적어도 20억, 적어도 30억, 적어도 40억, 적어도 50억, 적어도 60억, 적어도 70억, 적어도 80억, 적어도 90억, 적어도 100억, 적어도 150억, 적어도 200억, 적어도 300억, 적어도 400억, 적어도 500억, 적어도 600억, 적어도 700억, 적어도 800억, 적어도 900억, 또는 적어도 1000억 개의 간세포를 포함할 수 있다. 유전자 변형된 간세포는 단일 용량 또는 다중 용량으로 이를 필요로 하는 대상에게 전달될 수 있다.

[1073] 임의의 특정 대상에 대한 특정 용량 수준 및 투약량의 빈도는 다양할 수 있고, 조성물(들)의 세포의 활성, 조성물의 세포의 안정성 및 작용 기간, 대상의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이, 투여 방식 및 시간, 공동-투여된 약물 조합(들), 및 치료법을 받고 있는 숙주의 상태의 중증도를 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. [0190] 치료법의 상기 열거된 예는 제한적으로 해석되어서는 안되며, 기재된 바와 같이 확인된 대상에서 원하는 치료 결과를 초래하는 본질적으로 임의의 적절한 치료법이 사용될 수 있다.

[1074] 본원에 제공된 간세포-유사 세포는 간 기능이 회복되거나 보충될 필요가 있는 임의의 대상의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 치료법에 적절할 수 있는 인간의 병태로는, 임의의 원인으로 인한 전격성 간부전, 바이러스성 간염, 약물-유도된 간 손상, 간경변증, 유전성 간 부전(예컨대 윌슨병, 길버트 증후군, 또는 α1-항트립신 결핍), 간담도 암종, 자가면역 간 질환(예컨대 자가면역 만성 간염 또는 일차성 담즙성 간경변증), 및 간 기능 손상을 초래하는 임의의 다른 병태를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[1075] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 간세포-유사 세포는 캡슐화되거나 생체인공 간 장치의 일부이다. 임상용 생체인공 장기는 장기간 치료법의 일부로 간 기능이 손상된 개인을 지원하거나, 전격성 간 부전과 간 재구성 또는 간 이식 사이의 시간을 연결하도록 설계된다. 생체인공 간 장치는 예를 들어 미국 특허 제5,290,684호, 제5,624,840호, 제5,837,234호, 제5,853,717호 및 제5,935,849호에 개시되어 있다. 현탁형 생체인공 간은 플레이트 투석기에 현탁되거나, 적합한 기질에 미세캡슐화되거나, 세포외 기질로 코팅된 미세담체 비드(bead)에 부착

된 세포를 포함한다. 대안적으로, 간세포는 충전 층[packed bed] 내 고체 지지체상에, 다중플레이트의 편평 층 내에, 미세채널 스크린상에, 또는 주위를 둘러싼 중공 섬유 모세혈관상에 배치될 수 있다. 이 장치는 대상의 혈액이 통과하는 입구와 출구, 그리고 때때로 세포에 영양소를 공급하기 위한 별도의 포트(port) 세트를 갖는다.

[1076] 간세포를 본원에 기재된 방법에 따라 제조한 다음, 적합한 기질, 예컨대 매트리겔® 또는 콜라겐의 매트릭스상에서 장치에 플레이팅하였다. 장치의 효능은 수입성[afferent] 흐름에서 제거된 대사산물 및 수출성 흐름에서 새로 합성된 단백질과 관련하여, 수입성 채널의 혈액 조성을 수출성 채널의 혈액 조성과 비교함으로써 평가될 수 있다.

[1077] 이러한 종류의 장치는 혈액과 같은 유체를 해독하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 유체는 세포가 유체 내의 독소를 제거하거나 변형할 수 있게 하는 조건 하에서 본 기술의 특정 측면에서 제공되는 간세포와 접촉한다. 해독은 일반적으로 간에 의해 처리되는 적어도 하나의 리간드, 대사물, 또는 다른 화합물(천연 및 합성)을 제거하거나 변경하는 것을 수반할 것이다. 이러한 화합물에는 빌리루빈, 담즙산, 요소, 헴, 지질단백질, 탄수화물, 트랜스페린, 혜모펙신, 아시알로당단백질, 인슐린 및 글루카곤과 같은 호르몬, 및 다양한 소분자 약물이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 장치는 또한 수출성 유체에서 알부민, 급성기 반응물 및 미부하[unloaded] 담체 단백질과 같은 합성된 단백질의 농축에 사용될 수 있다. 이러한 다양한 기능이 수행되도록 장치를 최적화할 수 있어 필요한 만큼 많은 간 기능을 복원할 수 있다. 치료 관리의 맥락에서, 장치는 간세포 부전 환자의 흘러나오는 혈액을 처리하고, 그 후 그 혈액을 환자에게 돌려준다.

[1078] c. T 세포

[1079] 세포 치료제에 사용되는 T 세포는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1080] 세포 치료제에 사용되는 T 세포는 일차 T 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) T 세포 상에서 수행될 수 있다.

[1081] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 T 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래된 T 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 T 세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포 상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래된(예를 들어, 유전체-편집된) T 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1082] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 T 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 T 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 T 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자(예를 들어, CAR 이식유전자) 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 T 세포는 세포 치료제 제조 동안의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다. 세포 치료제에 사용되는 T 세포는 세포 치료제 제조 동안의 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1083] 본원에 기재된 T 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1084] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 조작된 또는 변형된 세포는 일차 T 림프구(T 세포로도 지칭됨)이다. 일부 구현예에서, 일차 T 림프구는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 일부 경우에서, T 세포는 한 명 이상의 개인에서 유래한 일차 T 세포 집단이다. 일부 경우에서, T 세포는 한 명 이상의 개인에서 유래한 일차 T 세포의 하위집단 또는 하위유형 또는 하위세트이다. 일차 T 세포의 하위집단 및 하위유형 및 하위세트는 아래에서 더욱 상세하게 본원에 기재된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개인에서 T 림프구를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 대상(예를 들어, 수용자)에게 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 T 림프구가 본원에 제공된다.

[1085] 일부 경우에서, 일차 T 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예컨대, 수확, 추출, 제거 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포는 T 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 비롯한, 하나 이상의 인간)에서 유래되도록 T 세포의 풀에서부터 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-

20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 명 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여되는 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, T 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, T 세포의 풀이 수득되는 하나 이상의 공여자 대상은 환자와 상이하다.

[1086] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포는, 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, T 림프구로 분화되는, 조작된 만능 세포에서 분화된 T 림프구이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 일부 구현예에서, T 림프구로 분화된 세포는 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착에 사용될 수 있다.

[1087] 만능 줄기 세포(예컨대, iPSC)에서 T 세포를 생성하는 방법은 예를 들어, 문헌[Iriguchi et al., Nature Communications 12, 430 (2021); Themeli et al., 16(4):357-366 (2015); Themeli et al., Nature Biotechnology 31:928-933 (2013)]에 기재되어 있다.

[1088] 일차 T 세포의 비제한적인 예는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 미감작[naive] T 세포, 조절 T[regulatory T, Treg] 세포, 비조절 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, T-여포 헬퍼[T-follicular helper, Tfh] 세포, 세포독성 T 림프구[cytotoxic T lymphocyte, CTL], 효과기 T[effecor T, Teff] 세포, 중심 기억 T[central memory T, Tcm] 세포, 효과기 기억 T[effector memory T, Tem] 세포, CD45RA를 발현하는 효과기 기억 T 세포(TEMRA 세포), 조직-상주 기억[tissue-resident memory, Trm] 세포, 가상 기억 T 세포, 선천적 기억 T 세포, 기억 줄기 세포[memory stem cell, Tsc], γδ T 세포, 및 T 세포의 임의의 기타 하위유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포는 세포독성 T-세포, 헬퍼 T-세포, 기억 T-세포, 조절 T-세포, 종양 침윤 림프구 및 이들의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[1089] 일부 구현예에서, 일차 T 세포는 T 세포 하위세트 또는 하위유형 또는 하위집단의 일차 T 세포이다. 이러한 T 세포 하위세트는 제US2018/0319862A1호 및/또는 제WO2016/090190A1호에서 찾을 수 있으며, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다. 따라서, 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 투여 시 대상에서 증가되는 T 세포 하위세트, 예컨대 CD62L+ T 세포 하위세트는 기억 T 세포 또는 이의 특정 하위세트, 예컨대 장수[long-lived] 기억 T 세포이거나, 또는 이를 포함하거나, 또는 이와 표현형 특징을 공유한다. 일부 구현예에서, 이러한 기억 T 세포는 중심 기억 T 세포[Tcm] 또는 T 기억 줄기 세포[Tsc] 세포이다. 일부 구현예에서, 기억 T 세포는 Tsc 세포이다. Tsc 세포는, 덜 분화되거나 더욱 미감작된 것과 같이, 다른 기억 T 세포 하위세트와 비교되거나 미감작 T 세포와 비교하여, 하나 이상의 표현형 차이 또는 기능적 특징을 갖는 것으로 설명될 수 있다(예를 들어, 문헌[Ahlers and Belyakov (2010) Blood, 115:1678); Cieri et al (2015) Blood, 125:2865; Flynn et al. (2014) Clinical & Translational Immunology, 3, e20; Gattinoni et al. (2012) Nat. Med., 17:1290-1297; Gattinoni et al. (2012) Nat .Reviews, 12:671; Li et al. (2013) PLOS ONE, 8:e67401]; 및 공개된 PCT 출원 번호 제WO2014/039044호 참조). 일부 경우에서, Tsc 세포는 효과기 T 세포 및 기억 T 세포의 세 개의 하위세트(Tsc, Tcm 및 Tem) 모두를 생성할 수 있는 유일한 기억 T 세포인 것으로 여겨진다. 일부 양태에서, Tsc 세포는 모든 기억 T 세포 하위세트의 항원성 또는 항상성 자극에 대해 가장 높은 생존 및 증식 반응, 및 최소의 소모 부재 동족 항원을 갖는다. 일부 구현예에서, 덜 분화된 Tsc 세포는 다른 기억 T 세포보다 입양 전달 후 더 큰 확장, 장기간 생존력 및 표적 세포 파괴를 나타낼 수 있고, 따라서 Tcm 또는 Tem 세포에 대해 가능한 것보다 더 적은 전달된 세포로 더 효과적인 치료를 매개할 수 있다.

[1090] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8 +T 세포의 하위 유형 및 하위 집단 중에는, 미감작 T[naive T, Tn] 세포, 효과기 T 세포[Teff], 기억 T 세포 및 이의 하위유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T[Tsc], 중추 기억 T[Tcm], 효과기 기억 T[Tem], 또는 말단 분화된 효과기 기억 T 세포, 종양 침윤 림프구[tumor-infiltrating lymphocyte, Til], 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-연관 불변 T[mucosa-associated invariant T, MAIT] 세포, 자연 발생 및 적응 조절 T[Treg] 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포이다.

[1091] 일부 구현예에서, CD8+ 세포는, 예컨대 개별적인 하위집단과 연관된 표면 항원에 기반한 양성 또는 음성 선발에 의해, 미감작, 중심 기억, 효과기 기억, 및/또는 중심 기억 줄기 세포가 더 농축되거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 중심 기억 T[Tcm] 세포에 대한 농축은 효능을 증가시키기 위해, 예컨대 투여 후 장기간 생존, 확장 및/또는 생착을 개선하기 위해 수행되며, 이는 일부 양태에서 이러한 하위 집단에서 확고하다. 문헌[Terakuraet al. (2012) Blood. 1: 72- 82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 689-701]참조. 일부 구현예에서, Tcm-농축된 CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포를 조합하는 것은 효능을 더욱 향상시킨다.

[1092] 본 개시는 예를 들어, 다중 투여 단계를 통해 및/또는 사전 투여를 받은 대상에의 투여에 의해, 유전자 조작된 (재조합) 수용체를 발현하는 세포의 다중 용량의 투여를 포함하는 입양 세포 치료법에 관한 것이다. 치료 및 세포 치료 방법이 본원에서 하기에 더욱 상세히 설명된다. 일부 구현예에서, 나타낸 차이는 제2 용량 또는 투여와 비교하여, 제1 용량 또는 투여의 세포 내에서 재조합 분자, 예를 들어 수용체 사이의 유일한 차이 또는 실질적으로 또는 본질적으로 유일한 차이이다. 일부 구현예에서, 수용체에서의 차이 및/또는 다른 언급된 차이를 제외하고, 이전 및 후속 투여에서 투여된 세포 및/또는 세포 집단은 동일하거나, 본질적으로 또는 실질적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커의 검출 가능한 표면 수준을 발현하는 세포의 비율은 후속 투여와 비교하여 하나의 투여에서 동일하거나 유사하다. 일부 구현예에서, 상이한 용량 또는 투여에서 세포 집단 및/또는 하위 집단의 백분율은 동일하거나, 실질적으로 또는 본질적으로 동일하다. 상이한 용량은 동일한 백분율의 T 세포, CD8+ 및/또는 CD4+ T 세포, 특정 계통 또는 활성화 상태 또는 경험의 T 세포, 예컨대 효과기, 미감작 및/또는 기억 T 세포, 및/또는 이의 하위집단, 예컨대 Tcm, Tem, Tsc 세포 및/또는 동일한 대상, 시료, 조직 및/또는 유체 또는 구획으로부터 유래될 수 있는 세포의 상대 백분율을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 벡터를 이용한 형질도입에 의해, 제1 용량의 세포를 조작하기 위해 사용된 세포의 동일한 조성물의 다른 부분을, 제2 투여의 세포를 조작하기 위해 사용한다. 일부 구현예에서, 조성물은 제2 투여 전에, 예를 들어 동결보존에 의해 보존된다.

[1093] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위 유형 및 하위 집단 중에는 미감작 T[Tn] 세포, 효과기 T 세포[Teff], 기억 T 세포 및 이의 하위 유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T[Tsc], 중심 기억 T[Tcm], 효과기 기억 T[Tem], 또는 최종 분화된 효과기 기억 T 세포, 종양 침윤 림프구[Til], 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-연관 불변 T[MAIT] 세포, 자연 발생 및 적응 조절 T[Treg] 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[1094] 본 개시의 예시적인 T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 기억 T 세포, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, 효과기 기억 RA T 세포, 조절 T 세포, 조직 침윤 림프구, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 많은 구현예에서, T 세포는 CCR7, CD27, CD28 및 CD45RA를 발현한다. 일부 구현예에서, 중심 T 세포는 CCR7, CD27, CD28 및 CD45RO를 발현한다. 다른 구현예에서, 효과기 기억 T 세포는 PD-1, CD27, CD28 및 CD45RO를 발현한다. 다른 구현예에서, 효과기 기억 RA T 세포는 PD-1, CD57, 및 CD45RA를 발현한다.

[1095] 일부 구현예에서, 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 T 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 T 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 T 세포는, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된(예를 들어, 변형된) T 세포를 포함한다. 본원에 기재된 CAR을 비롯하여, 임의의 적합한 CAR이 T 세포에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 손상된 세포, 이형성 세포, 감염된 세포, 면역원성 세포, 염증성 세포, 악성 세포, 화생성[metaplastic] 세포, 돌연변이체 세포, 및 이들의 조합 중 적어도 하나의 표면상에 발현된 관심 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 키메라 항원 수용체를 발현한다. 다른 경우에, 조작된 T 세포는, 세포가 인접 세포, 조직, 또는 장기에 세포가 근접한 경우, 그 인접 세포, 조직, 또는 장기에서 관심되는 생물학적 효과를 조절하는 적어도 하나의 단백질을 세포가 발현하도록 하는 변형을 포함한다. 일차 T 세포를 비롯한, T 세포에 대한 유용한 변형은 제US2016/0348073호 및 제WO2020/018620호에 상세히 기재되어 있으며, 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 포함된다.

[1096] 일부 구현예에서, T 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 유전체 좌위에 삽입된다. 본원에 기재된 렌티바이러스 기반 형질도입 방법 또는 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는, T 세포의 유전체 좌위에 CAR을 삽입하기 위한 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 예컨대, 비제한적으로 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3(CD142로도 알려짐), MICA, MICB, LRP1(CD91로도 알려짐), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 또는 KDM5D 유전자좌 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRBC, PD1 또는 CTLA4 유전자에 삽입된다.

[1097] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 T 세포, 예컨대, 조작된 또는 변형된 T 세포는 내인성 T 세포 수용체의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, TRAC 또는 TRBC 좌위는 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴되거나 제거된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자, 예컨대 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 폴리뉴클레오티드가

파괴된 TRAC 또는 TRBC 좌위 내로 삽입된다.

[1098] 일부 구현예에서, 조작된 또는 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 세포독성 T-림프구-연관 단백질 4[cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA4]의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, CTLA-4 좌위는, 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴 또는 제거된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자, 예컨대 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 외인성 폴리뉴클레오티드가 파괴된 CTLA-4 좌위 내로 삽입된다.

[1099] 다른 구현예에서, 조작된 또는 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 프로그래밍된 세포 사멸[PD-1]의 감소된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, PD1 좌위는 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴 또는 제거된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자, 예컨대 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 외인성 폴리뉴클레오티드가 파괴된 PD1 좌위 내로 삽입된다. 특정 구현예에서, 조작된 또는 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 CTLA4 및 PD1의 감소된 발현을 포함한다.

[1100] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 T 세포, 예컨대, 조작된 또는 변형된 T 세포는 PD-L1의 향상된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, PD-L1 유전자좌는 예컨대 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)에 의해 세포에서 파괴 또는 제거된다. 일부 구현예에서, 외인성 폴리뉴클레오티드 또는 이식유전자, 예컨대 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 기재된 바와 같은 다른 외인성 폴리뉴클레오티드가 파괴된 PD-L1 좌위 내로 삽입된다.

[1101] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 T 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 T 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 T 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 하나 이상의 보체 억제제를 추가로 발현한다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 또한 CAR을 발현하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는, 예컨대 TRAC 유전자 또는 TRBC 유전자에서의 유전체 변형(예를 들어, 유전자 파괴)에 의해, TCR 복합체 분자의 발현이 감소되거나 결여된다. 일부 구현예에서, T 세포는 관용원성 인자(예를 들어, CD47) 및 CAR을 과발현하고, 다음 유전자들, 즉 B2M, CIITA, TRAC 및 TRBC 유전자 중 하나 이상을 파괴하는 유전체 변형을 보유한다.

[1102] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 T 세포는 면역 인식을 피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 T 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 T 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 T 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 T 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[1103] 본원에 제공된 T 세포는 B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B cell lymphoblastic leukemia, B-ALL], 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 급성 골수성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위 선암종, 췌장 선암종, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평 세포 암종, 간세포 암종, 방광암을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 적합한 암의 치료에 유용하다.

[1104] d. 자연 살해 세포

[1105] 세포 치료제에 사용되는 NK 세포는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1106] 세포 치료제에서 사용되는 NK 세포는 일차 NK 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) NK 세포상에서 수행될 수 있다.

[1107] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에서 사용되는 NK 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 NK 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 NK 세포를 형성하도록 분화될 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) NK 세

포상에서 수행될 수도 있다.

[1108] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 NK 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 NK 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함하며, 예를 들어 제WO2017214569A1호, 제WO2011/068896A1호에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에 기재된 NK 세포에 관한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자(예를 들어, CAR 이식유전자) 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 본원에 기재된 NK 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다. 세포 치료제에 사용되는 NK 세포는 세포 치료제의 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1109] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 자연 살해[NK] 세포이다. 일부 구현예에서, NK 세포는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 일부 경우에서, NK 세포는 하나 이상의 개인 유래의 NK 세포 집단 또는 하위집단이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개인에서 NK 세포를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 NK 세포가 본원에 제공된다. 예를 들어, 조작된 T 세포는 조작된 NK 세포를 대상 내로 주입함으로써 대상(예를 들어, 수용체, 예컨대 환자)에게 투여된다.

[1110] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 NK 세포는, 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, NK 세포로 분화되는, 조작된 만능 세포에서 분화된 NK 세포이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 일부 구현예에서, NK 세포로 분화된 세포는 예를 들어 분화된 NK 세포를 대상에게 주입함으로써 이후 대상(예를 들어, 환자와 같은, 수용자)로의 투여에 사용될 수 있다.

[1111] 만능 줄기 세포(예를 들어, iPSC)에서 NK 세포를 생성하는 방법은, 예를 들어 미국 특허 제10626373호; 문헌[Shankar et al. Stem Cell Res Ther. 2020; 11:234; Euchner et al. Frontiers in Immunology, 2021; 12, Article 640672. doi = 10.3389/fimmu.2021.640672]에 기재되어 있다.

[1112] 일부 경우에서, NK 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, NK 세포는, NK 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 비롯한, 하나 이상의 인간)에서 유래되도록 NK 세포의 풀에서 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 NK 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 조작된 NK 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, NK 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, NK 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상 중 하나 이상은 환자와 상이하다.

[1113] 일부 구현예에서, 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 NK 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 NK 세포를 비롯한 NK 세포는 CD56을 발현하고(예를 들어, $CD56^{dim}$ 또는 $CD56^{bright}$), CD3을 결여한다(예를 들어, $CD3^{neg}$). 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 NK 세포는, ADCC를 매개하는 저친화도 Fcɣ 수용체 CD16 또한 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 또한 하나 이상의 자연 살해 세포 수용체 NKG2A 및 NKG2D 또는 하나 이상의 천연 세포독성 수용체 NKp46, NKp44, NKp30을 발현한다. 예를 들어, 일차 NK 세포의 경우, 특정 경우에서, CD3, CD14 및/또는 CD19에 대해 양성인 세포를 고갈시킴으로써, 일차 세포를 NK 세포의 출발 공급원, 예컨대 말초 혈액 단핵 세포[PBMC]를 포함하는 시료에서 단리할 수 있다. 예를 들어, 세포는 각각) CD3, CD14 및/또는 CD19에 대한 항체가 부착된 면역자기 비드를 사용하여 고갈될 수 있고, 이에 의해 NK 세포의 농축 집단을 생산할 수 있다. 다른 경우에, NK 세포 상의 하나 이상의 마커, 예컨대 CD56, CD16, NKp46, 및/또는 NKG2D의 존재에 대해 세포를 선발함으로써, 일차 NK 세포를 혼합된 집단(예를 들어, PBMC)인 출발 공급원에서 단리할 수 있다.

[1114] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작 전에, NK 세포, 예컨대 단리된 일차 NK 세포는 하나 이상의 확장 또는 활성화 단계를 거칠 수 있다. 일부 구현예에서, 확장은 NK 세포를 방사선 조사될 수 있거나 또는 방사선 조사되지 않을 수 있는 항원 제시 세포와 같은 피더 세포와 함께 배양하여 달성될 수 있다. 확장 단계에서 NK 세포 대 항원 제시 세포[antigen presenting cell, APC]의 비율은 예를 들어 1:1, 1:1.5, 1:2 또는 1:3과

같은 특정 수일 수 있다. 특정 양태에서, APC는 막-결합된 IL-21[membrane-bound IL- 21, mbIL-21]을 발현하도록 조작된다. 양태에서, APC는 IL-21, IL-15, 및/또는 IL-2를 발현하도록 대안적으로 또는 추가적으로 조작된다. 구현예에서, 확장 단계(들)이 발생하는 배지는 확장을 용이하게 하는 하나 이상의 작용제, 예컨대 하나 이상의 재조합 시토킨을 포함한다. 특정 구현예에서, 배지는 IL-2, IL-15, IL-18, 및/또는 IL-21 유래의 하나 이상의 재조합 시토킨을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형을 도입함으로써 NK 세포를 조작하는 단계는 확장 개시 후 2-12일, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일에 또는 약 이 시점에서 수행된다.

[1115] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 NK 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 NK 세포는, 비제한적으로 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된(예를 들어, 변형된) NK 세포를 포함한다. 본원에 기재된 CAR을 비롯한 임의의 적합한 CAR이 NK 세포에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 NK 세포는 손상된 세포, 이형성 세포, 감염된 세포, 면역원성 세포, 염증성 세포, 악성 세포, 화생성 세포, 돌연변이체 세포, 및 이들의 조합 중 적어도 하나의 표면 상에 발현된 관심 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 키메라 항원 수용체를 발현한다. 다른 경우에, 조작된 NK 세포는, 세포가 인접 세포, 조직, 또는 장기에 세포가 근접한 경우, 그 인접 세포, 조직, 또는 장기에서 관심되는 생물학적 효과를 조절하는 적어도 하나의 단백질을 세포가 발현하도록 하는 변형을 포함한다.

[1116] 일부 구현예에서, NK 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 유전체 좌위에 삽입된다. 본원에 기재된 렌티바이러스 기반 형질도입 방법 또는 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는, NK 세포의 유전체 좌위에 CAR을 삽입하기 위한 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위, 예컨대, 비제한적으로 AAVS1, CCR5, CLYBL, ROSA26, SHS231, F3(CD142로도 알려짐), MICA, MICB, LRP1(CD91로도 알려짐), HMGB1, ABO, RHD, FUT1 또는 KDM5D 유전자좌 내로 삽입된다.

[1117] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 NK 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 NK 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 NK 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다.

[1118] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 NK 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 NK 세포와 같은 본원에 기재된 조작된 NK 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예컨대, 수용자) 또는 환자에 조작된 NK 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1119] 본원에 제공된 NK 세포는 B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B-ALL], 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 급성 골수성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위선암종, 췌장 선암종, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 적합한 암의 치료에 유용하다.

[1120] 본원에 개시된 세포는 자연 살해[NK] 세포, 예를 들어 NK 세포 집단일 수 있다. '세포', 예를 들어 'NK 세포'라는 임의의 지칭은 아래에서, 본 출원에 기재된 바와 같은 '세포 집단', 예를 들어, 'NK 세포 집단'에도 적용된다.

[1121] 림프구 계통을 통해 발생하며 선천성 면역계의 일부인 NK 세포는 특정 유형의 종양세포를 탐지하고 죽이는 것으로 밝혀져 항암 치료에 사용될 수 있다.

[1122] 자연 살해[NK] 세포는 인간 면역 감시가 가능한 세포독성 림프구이다. 제WO2017214569A1호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)은 유전체 편집된 일차 NK 세포, 이들 세포의 제조 방법, 및 이들 세포의 투여 방법을 기재한다.

[1123] 일부 구현예에서, NK 세포는 미성숙 NK 세포일 수 있고, CD56+ 및 CD16-일 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 성숙 NK 세포일 수 있고, CD56- 및 CD16+, 또는 CD561o 및 CD16+(제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같음(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨))일 수 있다.

[1124] 일차 NK 세포는 CD16 및/또는 CD56을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 CD3을 발현하지 않는다. 일

부 구현예에서, 'NK 세포'는 바람직하게는 CD56+ 및 CD3-인 세포로서 정의된다. 일부 구현예에서, 'NK 세포'는 CD16+ 및 CD3-인 세포로서 정의된다. NK 세포는 바이러스에 감염되거나 형질전환된 세포를 죽이는 선천성 면역계의 림프구이다. T 세포와 마찬가지로, NK 세포는 세포독성 림프구이다. T 세포와 달리, NK 세포는 항원 인식을 필요로 하지 않으며, 기능을 수행하기 위해 많은 활성화 및 억제 수용체의 신호를 통합해야 한다. T 세포와의 유사성에도 불구하고, NK 세포는 자극 조건 하에서 상이하게 거동하고, T 세포와 동일한 방식으로 전기천공을 용인하지 않는다(제WO2017214569A1호에 기재된 바와 같음(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)).

[1125] 자연 살해[NK] 세포를 생성하는 방법, 예를 들어 제WO 2011/068896A1호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 방법이 당업계에 알려져 있으며, 상기 방법은 혈관모세포를 제공하는 단계, 혈관모세포를 메틸셀룰로스 및 IL2, IL3, IL6, IL7, IL15, SCF 및 FL을 포함하는 제1 시토킨 혼합물상에서 배양하는 단계, 배양된 세포를 수확하는 단계, 및 수확된 세포를 인간 혈청, 및 IL7, IL15, SCF 및 FL을 포함하는 제2 시토킨 혼합물을 포함하는 액체 배지에서 배양하여 NK 세포를 생성하는 단계를 포함한다.

[1126] 일차 NK 세포는 예를 들어 말초 혈액, 제대 세포, 복수, 및/또는 고형 종양에서 단리될 수 있다(내용 전체가 본원에 참조로 포함된 제WO2017214569A1호에 기재된 바와 같음). 일부 구현예에서, '일차 NK 세포'는 새로 단리된 NK 세포이다. 일부 구현예에서, '일차 NK 세포'는 단리된 후 5 회 이하의 복제 또는 분열, 단리된 후 10 회 이하의 복제 또는 분열, 단리된 후 15 회 이하의 복제 또는 분열, 단리된 후 20 회 이하의 복제 또는 분열, 단리된 후 25 회 이하의 복제 또는 분열, 단리된 후 30 회 이하의 복제 또는 분열, 단리된 후 35 회 이하의 복제 또는 분열, 또는 단리된 후 40 회 이하의 복제 또는 분열을 거친 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 NK 세포는 비-클론 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 NK 세포는 증식 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 NK 세포는 확장된 세포이다.

[1127] 일부 구현예에서, NK 세포는 포유동물 세포이다. 일부 구현예에서, NK 세포는 인간 세포이다. 일부 구현예에서, NK 세포는 마우스 세포이다.

[1128] 세포 치료법에 사용될 때 NK 세포의 원하는 특징 일부가 본원에 기재된다.

[1129] NK 세포는 예를 들어 제WO 2011/068896A1호(이 내용은 본원에 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 제시된 바와 같은 다수의 분석을 사용하여 구별될 수 있다.

[1130] 예를 들어, IL12-p70 분비를 측정할 수 있다: IL12p70은 CD4+ T 세포에서 Th1-지시된 반응을 유도하기 위해 성숙 DC에 의해 분비된다. 인간 BM 유래 DC는 >500pg/ml의 IL12p70을 생산할 수 있지만 모세포[blast] 유래 DC는 성숙 시 검출 가능한 IL12p70을 생성하지 않았다. 혼합 림프구 반응[mixed lymphocyte reaction, MLR] 분석: MLR 분석은 동종이계 T 세포의 증식을 자극하는 DC의 능력을 결정한다. 제대혈 단핵 세포([cord blood mononuclear cell, CBMC], T 세포를 포함)을 반응자로 사용하고 형광 표지했으며, 미성숙 또는 성숙 모세포 유래 DC와 함께 4-5일 공동 배양한 후 증식을 측정했다. 예비 결과는 반응자 세포가 성숙한 (m)DC에 반응하여 증식한다는 것을 보여준다. 혈관모세포 유래 자연 살해 세포: 세포 표면 마커 CD45, CD7, CD94, CD56, CD16 및 NKG2D를 모세포 유래 및 인간 골수 유래 NK 세포에서 평가하였다.

[1131] NK 세포를 분화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 제WO 2011/068896A1호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같다. 제WO 2011/068896A1호에 설명된 바와 같은 예시적인 방법이 아래에 제시된다:

[1132] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 초기 분화: 세포 유형 둘 모두에 대한 초기 분화 절차는 동일할 수 있고, 배아체[embryoid body, EB]를 생성하기 위해 스템라인(Stemline) II(Sigma)+시토킨에서 hESC의 4일 배양을 수반할 수 있다. 시토킨, VEGF 및 BMP4는 EB 배양 전반에 걸쳐 사용될 수 있는 반면, bFGF는 처음 2일 후에 첨가될 수 있다. 총 4일 후, 생성된 EB는 0.05% 트립신으로 분해될 수 있고, 그 후 트립신은 혈청 함유 배양 배지로 불활성화될 수 있다. 개별 세포는 그 후 40 μM 세포 거름망을 통해 여과하고, 계수하고, 추가의 시토킨, 예컨대 TPO(50 ㎍/ml), VEGF(50 ㎍/ml), FL(50 ㎍/ml) 및 bFGF(20-50 ㎍/ml)를 함유하는 H4436 또는 H4536 메틸셀룰로스(Stem Cell Technologies)에 시딩되었다. NK 분화를 위해, 시토킨 IL2(1-10 ㎍/ml), IL7(1-20 ㎍/ml), 및/또는 IL15(1-10 ㎍/ml)가 또한 이 단계에서 첨가될 수 있다. 메틸셀룰로스 배양물은 혈관모세포성 집단의 생산 및 확장을 위해 ml당 50,000 내지 150,000개의 세포의 농도로 플레이팅될 수 있다. 모세포-유사 세포는 6일과 10일 사이에 메틸셀룰로스로부터 수확되고, 하기 절차 중 하나에 의해 추가로 분화될 수 있다.

[1133] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 NK 분화: 모세포는 H4236 메틸셀룰로스+IL2(5-10ng/ml), IL3(1-10ng/ml), IL6(1-10ng/ml), IL7(5-20ng/ml), IL15(5-10ng/ml), SCF(10-50ng/ml), 및 FL(10-50ng/ml) 또는 동

일한 시토킨 및 10-20% 인간 혈청을 함유하는 액체 배양액에 리플레이팅될 수 있다. 6-8일 배양 후, 세포를 수확하고 액체 배양 배지(aMEM 또는 DMEM:F12)+10-20% 인간 혈청 및 시토킨 IL7(5-20ng/ml), IL15(5-10ng/ml), SCF(10-50ng/ml) 및 FL(10-50ng/ml)에서 추가 14-21일 동안 리플레이팅될 수 있다. 매주 배지 변경하여 시토킨 혼합물을 새롭게 할 수 있다.

[1134] 유세포 분석법은 세포의 면역표현법 및 NK 세포 표면 마커의 획득을 평가하기 위해 분화 과정 전반에 걸쳐 간헐적으로 사용될 수 있다. 세포 표면 마커는 CD34, CD45, CD56, CD16, CD94, NKG2D, CD3, CD7, CD4, CD8a 및 CD45RA를 포함한다. 혈관모세포-유래 NK 세포의 기능을 시험하기 위한 시험은, (1) K562 적백혈병 표적 세포를 이용한 자연 세포독성 분석, (2) IL12/IL18 또는 포르볼 미리스테이트 아세테이트 처리에 반응하는 IFNγ 생산, (3) 퍼포린 및 그랜자임 B 효소의 존재에 대한 세포내 유세포 분석, 및 (4) 라지(Raji) 세포 및 항-CD20 항체를 이용한 항체-의존성 세포성 세포독성 분석을 포함할 수 있다. NK 세포는 H7 및 HuES3 hESC 둘 모두로부터 생성될 수 있다. 51Cr 방출 분석과 유사한 비-방사성 세포독성 분석은, 혈관모세포-유래 NK 세포가 표준 4 시간 공동 배양 후 표적 K562 적혈모세포성 백혈병 세포에서 세포자멸사를 효과적으로 유도할 수 있음에 따라, 천연 세포독성 기능을 보유한다는 것을 나타낼 수 있다.

[1135] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 혈관모세포 성장 조건의 변경: 상기 NK 및 DC 분화 절차는 H4436 메틸셀룰로오스에서 성장된 혈관모세포를 사용하여 수행될 수 있다. 그러나, Stem Cell Technologies의 에리트로포이에틴이 없는 메틸셀룰로스인 H4536도 혈관모세포를 효율적으로 생성하는데 사용될 수 있다. 이러한 'epo 마이너스' 혈관모세포는 원래의 'epo 플러스' 모세포와 매우 유사하여, 이는 다양한 조혈 및 혈관 세포 유형으로 분화할 수 있다. 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 예비 결과는 H4536의 사용이, NK 세포 및 DC를 포함하는 다양한 조혈 계통으로의 혈관모세포의 분화에 대해, H4436 메틸셀룰로스보다 상당한 이점을 제공할 수 있음을 시사한다. 모세포 성장 배지에서 epo의 부재는 적혈구 마커 CD235a를 발현하는 세포의 백분율을 감소시키고, CD34, CD45, 및 CD41a를 발현하는 세포의 백분율을 증가시키는 것으로 발견될 수 있다. 세포 표면 마커 발현에서의 이러한 차이로 인해, 'epo-마이너스' 성장 조건은 골수성 및/또는 림프성 계통의 분화를 향상시킬 수 있다.

[1136] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 인간 ESC에서부터의 NK 세포 분화:

[1137] 분화 절차는 다음과 같이 수행될 수 있다: H7 ESC를 4일 동안 배아체[EB]로 분화시켰다. EB를 수확하고 혈관모세포 생산 및 확장을 위해 10-15일 동안 시토킨이 풍부한 메틸셀룰로스로 전달할 수 있다. 혈관모세포를 수확하고, 10-20% 인간 AB 혈청을 더한 피더가 없는 액체 배지에 놓을 수 있으며, 시토킨 패널은 매 3-4일마다 배지 절반을 변경하며, 추가 14-17일 동안 배치된다.

[1138] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 면역표현법(유세포 분석법 사용): 미성숙 NK 세포는 CD56bright, CD161o, KIRlo, CD117+, CD94-, NKG2D+일 수 있다. 상기 절차의 변형을 사용함으로써, 분화 32일 후 생존 세포의 20-30%는 CD56+ CD16-일 수 있다. 성숙 NK 세포는 CD56dim, CD16hi, KIRhi, CD1171o/-, CD94+, NKG2D+일 수 있다. 상기 절차를 사용함으로써, 분화 31일 후 생존 세포의 20%는 CD56-CD16+일 수 있고, 이들 중 5%는 CD561oCD16+이었다.

[1139] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 기능적 분석: 자연 세포독성: 성숙 NK 세포는 표적 세포, 예컨대 인간 K562 적백혈병, MCF7, U87, PC3, NTERA2 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있다. '3FC' 분석을 사용하여 세포독성의 효율성을 평가할 수 있다. 이는 51Cr 방출 분석과 유사하지만 방사능을 필요로 하지 않는다. 문헌[Derby et al., Immunol. Letters 78: 35-39 (2001)] 참조. 상기 기재된 성숙한 NK 세포의 불균질 집단(항목 B2-a)는 표준 4시간 실험에서 K562 세포의 65-70%에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 발견될 수 있다.

[1140] 제WO 2011/068896A0호1에 기재된 바와 같은 항체-의존성 세포-매개 세포독성[antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC]: NK 세포 표면상의 FcγRIII(CD16)은 표적 세포에 부착된 항-CD20 항체의 fc 영역에 결합하여 ADCC를 유도할 수 있다. 라지 세포(버킷(Burkett) 림프종 유래)는 항-CD20 항체와 함께 예비인큐베이션될 수 있고, ADCC 분석에서 표적으로서 사용될 수 있다. 문헌[Tsirigotis et al., J of Steroid Biochem and Mol Bio 108: 267-271 (2008)] 참조.

[1141] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 IFNγ 시토킨 생성: 미성숙 NK 세포는 포르볼 미리스테이트 아세테이트(phobol myristate acetate, PMA)+이오노마이신 또는 IL12+IL18을 이용하여 밤새 처리에 반응하여 다량의 IFNγ를 생성할 수 있다. IFNγ 분비는 브레펠딘 a로 차단될 수 있고, 세포는 세포내 유세포 분석법을 사용하여 세포 표면 마커 및 IFNγ에 대해 염색된다. 문헌[WoU et al. J. of Immunol. 175: 5095-5103 (2005)] 참조.

[1142] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 이종이식 마우스 모델을 사용한 NK 세포의 생체내 면역요법 가능성: 생체 발광성(발광효소-함유) K562 세포를 종양의 생착을 위해 NOD/SCID 마우스에 주사한 후, NK 세포의 볼루스(bolus) 및 IL2 및 IL15의 일일 IP 주사할 수 있다. 생체 발광 영상화는 시간 경과에 따른 생체 내 NK 면역치료 가능성을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 참조[WoU et al. Blood 113 (24): 6094-6101 (2009)] 참조.

[1143] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같이, 제대혈 및 말초 혈액 단핵 세포 둘 모두는 반응자로서 사용될 수 있고, 본 발명자들은 인간 골수-유래 DC를 양성 대조군 효과기로서 사용한다.

[1144] E4BP4는 NK 계통 발달에 중요할 수 있고(문헌[Gascoyne et al. Nature Immunology 10(10): 1118-1125, 2009] 참조), 시험관내에서 보다 효율적인 것에 필요한 전사 프로그램을 제공할 수 있다.

[1145] 제WO 2011/068896A1호에 기재된 바와 같은 NK 세포 분화: E4BP4 cDNA는 혈관모세포에서의 그의 과발현을 위해 레트로바이러스 벡터로 클로닝될 수 있고, NK 분화를 증가시키는 그의 능력을 평가할 수 있다. RT-PCR은 다양한 KIR 수용체 동형체, 및 NK 세포 기능성에 중요한 효소인 퍼포린 및 그랜자임 B의 발현을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 기능적 분석을 위해, 모세포 유래 NK 세포는 자연적인 세포독성을 나타낼 수 있으므로, 항체 의존적 세포독성[ADCC] 능력을 평가할 수 있다. ADCC 분석에 필요한 시약은 버킷 림프종 유래 라지 세포 및 항-CD20 항체를 포함할 수 있다. CD20-표지된 라지 세포와 NK 세포의 공동 배양은 특정 ADCC 반응을 유도해야 하며, 이는 유세포 분석 수단을 통해 모니터링될 수 있다.

[1146] NK 세포는 임의의 적합한 방법을 사용하여 임의의 적합한 시간 동안 자극될 수 있다(예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2017214569A1호에 기재된 바와 같음). 일부 구현예에서, 자극된 NK 세포는 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트[PMA]에 노출된 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자극된 NK 세포는 예를 들어, IL-21, IL-2, IL-12, IL-15, I형 인터페론 등을 포함하는 시토킨에 노출된 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시토킨은 가용성 시토킨을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 시토킨은 결합된 시토킨이다. 일부 구현예에서, 시토킨은 표면(예를 들어, 조직 배양 플라스크의 표면을 포함함)에 결합될 수 있다.

[1147] 일부 구현예에서, 결합된 시토킨은 인공 항원 제시 세포[aAPC]에 결합될 수 있다. aAPC는, 예를 들어, 문헌[Denman et al., PLoS One, 2012, 7(1): e30264 doi: 10.1371/journal.pone.0030264]에 기재된 클론 9를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, aAPC는 비드일 수 있다. 구형의 폴리스티렌 비드는 NK 세포 표면 단백질에 대한 항체가 코팅되어 NK 세포 활성화에 이용될 수 있다. 비드는 임의의 크기일 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 3 내지 6 마이크로미터일 수 있거나, 또는 일 수 있다. 비드의 크기는 4.5 마이크로미터일 수 있다. 비드는 임의의 세포 대 비드의 비로 이용될 수 있다. 예를 들어, 밀리리터 당 1 백만 개의 세포에서 3 대 1의 비드 대 세포 비가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, aAPC는 강성 구형 입자, 폴리스티렌 라텍스 마이크로비드, 자성 나노입자 또는 마이크로입자, 나노크기의 양자점, 폴리(락트-코-글리콜산)(poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA) 미소구체, 비구형 입자, 탄소 나노튜브 묶음, 타원체 PLGA 마이크로입자, 나노웜(nanoworm), 유체 지질 이중층-함유 시스템, 2D-지지된 지질 이중층[2D-SLB5], 리포솜, RAFTsomes/마이크로도메인 리포솜, 지지된 지질 이중층 입자, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[1148] 일부 구현예에서, 자극된 NK 세포는, 예를 들어 CellXVivo 인간 NK 세포 확장 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN), 인간 NK 세포 확장 활성화제 키트(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 등을 포함하는 시판 키트로 처리된 NK 세포를 포함한다.

[1149] 일부 구현예에서, 자극된 NK 세포는 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배 또는 적어도 8배 확장된 집단 내의 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자극된 NK 세포는 5배 이하, 6배 이하, 7배 이하, 8배 이하, 10배 이하, 20배 이하, 또는 30배 이하까지 확장된 집단 내의 NK 세포를 포함한다.

[1150] 일부 구현예에서, NK 세포는 수 시간 자극될 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 수일 동안 자극될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, NK 세포는 1일 이하, 2일 이하, 3일 이하, 4일 이하, 5일 이하, 6일 이하, 7일 이하, 8일 이하 또는 9일 이하, 2주 이하, 3주 이하, 등의 기간 동안 aAPC와 공동 배양될 수 있다.

[1151] 일부 구현예에서, 방법은 편집된 NK 세포를 확장하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 확장은 NK 세포를 선발한 후에 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 인공 항원 제시 세포[aAPC]와의 공동 인큐베이션에 의해 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 시토킨에 결합된 aAPC와의 공동-인큐베이션에 의해 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 수용성 시토킨과 공동-인큐베이션에 의해 확장될 수 있다. 시토킨은 예를 들어, IL-21, IL-2, IL-12, IL-15, I형 인터페론, 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 바람직하게는 IL-21에 결합되거나, 또는 막-결합된 IL-21을 발현하는 aAPC와 함께 공동-인큐베이션함으로써 확장될 수 있

다.

[1152] 혈관모세포를 골수 재집단화 세포로 사용하거나, 수지상, 자연살해, T 세포 및/또는 중간엽 줄기 세포[MSC]로 분화시킴으로써, 암, HIV 및/또는 자가면역 질환을 퇴치하기 위한 대규모 효과적인 세포 기반 치료법을 생산할 수 있다.

[1153] 유전체-편집된 일차 NK 세포 또는 줄기 세포 유래된 NK 세포는 (예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2017214569A1호에 기재된 바와 같이) 대상에서 질환을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다. 방법은 본원에 기재되거나 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 유전체-편집된 일차 NK 세포 또는 줄기 세포 유래 NK 세포를 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 질병은 예를 들어, 암, 전암성 상태, 병원체(예를 들어, 말라리아 포함)에 의한 감염, 또는 바이러스 감염을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 암 면역요법에 사용되는 것이 바람직하다.

[1154] 유전체-편집된 일차 NK 세포 또는 줄기 세포 유래된 NK 세포는 단독으로 또는 하나 이상의 다른 요법과 조합하여 대상에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 유전체-편집된 일차 NK 세포 또는 줄기 세포 유래된 NK 세포는 활성제 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물과 함께 및/또는 예를 들어 키메라 항원 수용체 T 세포[CAR-T]를 포함하는 세포 치료법과 함께 대상에게 투여될 수 있다. NK 세포는 환자, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간에게 목적하는 효과를 나타내는데 유효한 양으로 투여될 수 있다. NK 세포는 예를 들어 정맥내, 종양내, 동맥내, 경피적으로, 카테터 또는 스텐트에 의한 국소 전달을 통해, 종양내 주사를 위한 바늘 또는 다른 장치를 통해, 피하 등을 포함하는 다양한 경로로 투여될 수 있다. 상기 NK 세포는 일 회 또는 다수 횟수로 투여될 수 있다. 당업계의 일반 기술을 갖는 의사는 적응성 NK 세포 및 임의로 필요한 약학 조성물의 유효량 및 투약량을 결정하고 처방할 수 있다.

[1155] 상기 암은 예를 들어 골암, 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 후두암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 척추암, 위암, 자궁암, 조혈암 및/또는 림프구암 등을 포함할 수 있다. 조혈암 및/또는 림프구성 암은 예를 들어, 급성 골수성 백혈병[AML], 급성 림프모구성 백혈병[ALL], 골수이형성 증후군(MDS), 비-호지킨 림프종[NHL], 만성 골수성 백혈병[CML], 호지킨병, 및/또는 다발성 골수종을 포함할 수 있다. 암은 전이성 암일 수 있다.

[1156] 상기 바이러스는 예를 들어, CMV, 수두 대상 포진 바이러스[Varicella zoster virus, VZV], 엡스타인-바 바이러스[EBV], 단순 헤르페스 바이러스[Herpes simplex virus, HSV] 또는 카포시 육종 연관 헤르페스 바이러스[KSHV]를 포함하는 헤르페스 바이러스, 또는 인간 면역 결핍 바이러스[HIV]를 포함하는 렌티바이러스를 포함할 수 있다. 추가의 양태에서, 유전체-편집된 일차 NK 세포는 대상에서 종양의 성장을 억제하기 위해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 종양은 고형 종양을 포함할 수 있다.

[1157] 유전체-편집된 일차 NK 세포 또는 줄기 세포 유래된 NK 세포는 다른 치료 전, 동안 및/또는 후에 대상에서 투여되거나 제조될 수 있다. 이러한 병용 요법은 예를 들어 시토킨; 케모카인; 예를 들어 고친화도 항-CMV IgG 항체를 포함하는 치료 항체; 예를 들어 BiKE 또는 TRiKE를 포함하는 NK 세포 수용체 리간드; 보조제; 항산화제; 화학요법제; 및/또는 방사선을 포함하는, 다른 항암 및/또는 항바이러스제의 사용 전, 사용 중 및/또는 사용 후에 유전체-편집된 일차 NK 세포 또는 줄기 세포 유래 NK 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 투여 또는 제제는 다른 항암제 및/또는 항바이러스제의 투여까지 시간, 일 또는 심지어 주 단위로 시간상 분리될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 투여 또는 제제는 항종양제와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 다른 생물학적 활성제 또는 양식, 및 수술과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 비-약물 요법과 조합될 수 있다.

[1158] e. 내피 세포

[1159] 세포 치료제에 사용되는 내피 세포는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1160] 세포치료제에 사용되는 내피세포는 일차 내피세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 내피 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1161] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 내피 세포 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 베타-섬 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 내피 세포를 형성하도록 분화될 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된)

내피 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1162] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 내피 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 내피 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 내피 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 내피 세포는 세포 치료제 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1163] 본원에 기재된 내피 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1164] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 일차 내피 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 내피 세포는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개인에서 내피 세포를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 내피 세포가 본원에 제공된다.

[1165] 일부 구현예에서, 일차 내피 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 일차 내피 세포는 내피 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 비롯한, 하나 이상의 인간)에서 유래되도록 내피세포 세포의 풀에서 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 내피 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여되는 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 내피 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 내피 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상 중 하나 이상은 환자와 상이하다.

[1166] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포는 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, 내피 세포 유형으로 분화되는, 조작된 iPSC에서 분화된 내피 세포이다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 일부 구현예에서, 다양한 내피 세포 유형으로 분화된 세포는 대상(예컨대, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착에 사용될 수 있다.

[1167] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 다능성 세포는 내피 콜로니 형성 세포[endothelial colony forming cell, ECFC]로 분화되어 말초 동맥 질환을 다루기 위해 새로운 혈관을 형성한다. 내피세포를 분화시키기 위한 기술은 알려져 있다. 예를 들어, 인간 만능 줄기 세포로부터 내피 세포를 생성하기 위한 방법 및 시약, 및 이식 기술에 대해 그 전체가 본원에 참조로 포함된, 문헌[Prasain et al., doi: 10.1038/nbt.3048]을 참조한다. 분화는 일반적으로 내피세포 연관 또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 또는 기능적으로 측정함으로써 당업계에 공지된 바와 같이 분석될 수 있다.

[1168] 일부 구현예에서, 시험관내 분화에 의해 조작된 만능 세포 집단에서 조작된 내피 세포 집단을 생산하는 방법은, (a) GSK 억제제를 포함하는 제1 배지에서 조작된 iPSC 세포 집단을 배양하는 단계, (b) VEGF 및 bFGF를 포함하는 제2 배지에서 조작된 iPSC 세포 집단을 배양하여 예비-내피 세포 집단을 생성하는 단계, 및 (c) ROCK 억제제 및 ALK 억제제를 포함하는 제3 배지에서 예비-내피 세포 집단을 배양하여, 본원에 기재된 변형을 함유하도록 조작된 분화된 내피 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다.

[1169] 일부 구현예에서, GSK 억제제는 CHIR-99021, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, GSK 억제제는 약 1 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, ROCK 억제제는 Y-27632, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, ROCK 억제제는 약 1pM 내지 약 20 pM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, ALK 억제제는 SB-431542, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, ALK 억제제는 약 0.5 pM 내지 약 10 pM 범위의 농도로 존재한다.

[1170] 일부 구현예에서, 제1 배지는 2 pM 내지 약 10 pM의 CHIR-99021을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 배지는 50 ng/ml VEGF 및 10 ng/ml bFGF를 포함한다. 다른 구현예에서, 제2 배지는 Y-27632 및 SB-431542를 더 포함한다. 다양한 구현예에서, 제3 배지는 10 pM Y-27632 및 1 pM SB-431542를 포함한다. 특정 구현예에서, 제3 배지는 VEGF 및 bFGF를 더 포함한다. 경우들에서, 제1 배지 및/또는 제2 배지에는 인슐린이 없다.

[1171] 본원에 제공된 세포는 만능 세포의 내피 세포로의 분화를 지지 및/또는 촉진시키기 위해 합성 표면과 같은 표면

상에서 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 표면은 선택된 하나 이상의 아크릴레이트 단량체의 단독중합체 또는 공중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 중합체 재료를 포함한다. 아크릴레이트 단량체 및 메타크릴레이트 단량체의 비제한적인 예는 테트라(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트, 글리세롤 디메타크릴레이트, 1,4-부탄디올 디메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트, 디(에틸렌 글리콜) 디메타크릴레이트, 테트라(에틸렌 글리콜) 디메타크릴레이트, 1,6-헥산디올 프로폭실레이트 디아크릴레이트, 네오펜틸 글리콜 디아크릴레이트, 트리메틸올프로판 벤조에이트 디아크릴레이트, 트리메틸올프로판 에이옥실레이트(1 EO/OH) 메틸, 트리시클로[5.2.1.0^{2,6}] 데칸 디메탄올 디아크릴레이트, 네오펜틸 글리콜 에톡실레이트 디아크릴레이트, 및 트리메틸올프로판 트리아크릴레이트를 포함한다. Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. 및 Sartomer, Inc와 같은 상업적 공급자로부터 입수하거나 당업계에 알려진 바와 같이 합성된 아크릴레이트.

[1172] 일부 구현예에서, 내피 세포는 중합체 기질상에 시딩될 수 있다. 일부 경우에서, 중합체 기질은 생분해성이다. 적합한 생분해성 매트릭스는 당업계에 잘 알려져 있으며, 콜라겐-GAG, 콜라겐, 피브린, PLA, PGA 및 PLA/PGA 공중합체를 포함한다. 추가의 생분해성 물질은 폴리(무수물), 폴리(히드록시산), 폴리(오르토 에스테르), 폴리(프로필푸머레이트), 폴리(카프로락톤), 폴리아미드, 폴리아미노산, 폴리아세탈, 생분해성 폴리시아노아크릴레이트, 생분해성 폴리우레탄 및 다당류를 포함한다.

[1173] 비-생분해성 중합체가 또한 사용될 수 있다. 기타 비-생분해성이지만 생체적합성인 중합체는 폴리피롤, 폴리아니브네스(polyanibnes), 폴리티오펜, 폴리스티렌, 폴리에스테르, 비-생분해성 폴리우레탄, 폴리요소, 폴리(에틸렌 비닐 아세테이트), 폴리프로필렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리에틸렌, 폴리카르보네이트 및 폴리(산화에틸렌)을 포함한다. 중합체 기질은 예를 들어, 입자, 스폰지, 튜브, 구, 가닥, 나선형 가닥, 모세관 망, 필름, 섬유, 메쉬, 시트와 같은 임의의 형태로 형성될 수 있다. 중합체 기질은 천연 또는 합성 세포외 기질 재료 및 인자를 포함하도록 변형될 수 있다.

[1174] 중합체 재료는 지지체 재료의 표면상에 분산될 수 있다. 세포 배양에 적합한 유용한 지지체 재료는 세라믹 성분, 유리, 플라스틱, 중합체 또는 공중합체, 이들의 임의의 조합, 또는 하나의 재료의 또 다른 재료 상의 코팅물을 포함한다. 일부 경우에 있어서, 유리는 소다석회 유리, 파이렉스 유리, 바이코르(vycor) 유리, 석영 유리, 규소, 또는 이들의 유도체 등을 포함한다.

[1175] 일부 경우에서, 플라스틱 또는 수지상 중합체를 포함하는 중합체는 폴리(염화비닐), 폴리(비닐 알코올), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(비닐 아세테이트-말레산 무수물), 폴리(디메틸실록산) 모노메타크릴레이트, 환형 올레핀 중합체, 플루오로카본 중합체, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌이민 또는 이들의 유도체 등을 포함한다. 일부 경우에서, 공중합체는 폴리(비닐 아세테이트-코-말레산 무수물), 폴리(스티렌-코-말레산 무수물), 폴리(에틸렌-코-아크릴산) 또는 이들의 유도체 등을 포함한다.

[1176] 본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 내피 세포 및 이들의 분화의 추가적인 설명은, 제WO2020/018615호에서 발견되며, 이의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1177] 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 내피 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 내피 세포 집단은, 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, 내피 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[1178] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 내피 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 내피 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 내피 세포로, 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 발현이 결여된 조작된 내피세포에 관한 것이다.

[1179] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 내피 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 내피 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 내피 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 내피 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 내피 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1180] 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 내피 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 내피 세

포를 이를 필요로 하는 환자, 예를 들어 인간 환자에게 투여한다. 조작된 내피 세포는 질환 또는 병태, 예컨대, 비제한적으로 심혈관 질환, 혈관 질환, 말초 혈관 질환, 허혈성 질환, 심근 경색, 울혈성 심부전, 말초 혈관 폐쇄 질환, 뇌졸중, 재관류 손상, 사지 허혈, 신경병증(예컨대, 말초 신경병증 또는 당뇨병성 신경병증), 장기 부전(예컨대, 간부전 및 신부전, 등), 당뇨병, 류마티스성 관절염, 골다공증, 혈관 손상, 조직 손상, 고혈압, 관상 동맥 질환으로 인한 협심증 및 심근 경색, 신장 혈관 고혈압, 신장 동맥 협착증으로 인한 신부전, 및 하지 파행증 등을 앓고 있는 환자에 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 환자는 일부 경우에 뇌혈관 질환으로 인한 것일 수 있는 일시적 허혈 발작 또는 뇌졸중을 앓았거나 앓고 있다. 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포는 예를 들어, 죽상동맥경화증, 심근 경색 및 사지 허혈에서 발생하는 바와 같은 조직 허혈을 치료하고, 손상된 혈관을 복구하기 위해 투여된다. 일부 경우에서, 세포는 이식편의 생체공학에 사용된다.

[1181] 예를 들어, 조작된 내피 세포는 허혈성 조직의 복구, 혈관 및 심장 판막의 형성, 인공 혈관의 조작, 손상된 혈관의 복구, 및 조작된 조직에서 혈관의 형성을 유도하기 위한 세포 치료법에 사용될 수 있다(예를 들어, 이식 전에). 추가적으로, 내피 세포는 종양을 표적화하고 치료하기 위한 작용제를 전달하도록 추가로 변형될 수 있다.

[1182] 많은 구현예에서, 본원은 혈관 세포 또는 혈관신생을 필요로 하는 조직의 복구 또는 대체의 방법을 제공한다. 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 인간 환자에, 이러한 조직에서 혈관신생을 촉진하기 위해 단리된 일차 내피 세포 또는 분화된 내피 세포와 같은, 조작된 내피 세포를 함유하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 혈관 세포 또는 혈관신생을 필요로 하는 조직은 특히 심장 조직, 간 조직, 췌장 조직, 신장 조직, 근육 조직, 신경 조직, 뼈 조직일 수 있으며, 이는 손상된 조직일 수 있고, 과도한 세포 사멸, 손상 위험이 있는 조직, 또는 인공적으로 조작된 조직으로 특징될 수 있다.

[1183] 일부 구현예에서, 심장 질환 또는 장애와 연관될 수 있는 혈관 질환은 내피 세포, 예컨대 비제한적으로, 본원에서 기재된 바와 같이 유래된 최종 혈관 내피 세포 및 심내막 내피 세포를 투여함으로써 치료될 수 있다. 이러한 혈관 질환은 관상 동맥 질환, 뇌혈관 질환, 대동맥 협착, 대동맥류, 말초 동맥 질환, 죽상동맥경화증, 정맥류 정맥, 혈관병증, 관상 관류가 결핍된 심장의 경색 영역, 비-치유 상처, 당뇨병성 또는 비-당뇨병성 궤양, 또는 혈관의 형성을 유도하는 것이 바람직한 임의의 다른 질환 또는 장애를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1184] 특정 구현예에서, 내피 세포는 혈관 재건 수술에 사용되는 인공 이식물(예를 들어, Dacron 및 Gortex와 같은 합성 물질로 만들어진 혈관)을 개선하기 위해 사용된다. 예를 들어, 인공 동맥 이식편은 종종 필수 장기 또는 사지를 관류하는 병든 동맥을 대체하는 데 사용된다. 기타 구현예에서, 조작된 내피 세포는 판막 표면을 덜 혈전성으로 만듦으로써 색전의 형성 위험을 감소시키기 위해 인공 심장 판막의 표면을 덮는 데 사용된다.

[1185] 약술된 내피 세포는 조직 및/또는 단리된 세포를 혈관 내로 이식하기 위해 공지된 수술 기술을 사용하여 환자 내로 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 주사(예를 들어, 심근내 주사, 관동맥내 주사, 심내막-경유 주사, 심외막-경유 주사, 경피 주사), 주입, 그래프팅(grafting), 및 삽입이식[implantation]에 의해 환자의 심장 조직 내로 도입된다.

[1186] 내피 세포의 투여(전달)은 피하, 또는 정맥내, 동맥내(예를 들어, 관상동맥내), 근육내, 복강내, 심근내, 심내막-경유, 심외막-경유, 비강내 투여뿐만 아니라 척수강내를 포함하는 비경구 투여, 및 주입 기술을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1187] 당업자에게 이해되는 바와 같이, 세포는 세포 유형 및 이들 세포의 궁극적인 용도 둘 모두에 따라 좌우되는 당업계에 알려진 기술을 사용하여 이식된다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 환자의 특정 위치에서, 정맥내로 또는 주사에 의해 이식된다. 특정 위치에 이식된 경우, 세포는 고정되는 동안 분산을 방지하기 위해 겔 매트릭스에 현탁될 수 있다.

[1188] 예시적인 내피 세포 유형은 모세관 내피 세포, 혈관 내피 세포, 대동맥 내피 세포, 동맥 내피 세포, 정맥 내피 세포, 신장 내피 세포, 뇌 내피 세포, 간 내피 세포, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1189] 본원에 약술된 내피 세포, 예컨대 단리된 일차 내피 세포 또는 분화된 내피 세포는 하나 이상의 내피 세포 마커를 발현할 수 있다. 이러한 마커의 비제한적인 예는, VE-카드헤린(CD144), ACE(angiotensin-converting enzyme)[안지오텐신-전환효소](CD143), BNH9/BNF13, CD31, CD34, CD54(ICAM-1), CD62E(E-셀렉틴), CD105(엔도글린), CD146, 엔도칸(ESM-1), 엔도글릭스-1, 엔도뮤신, 에오탁신-3, EPAS1(내피 PAS 도메인 단백질 1), 인자 VIII 관련 항원, FLI-1, Flk-1(KDR, VEGFR-2), FLT-1(VEGFR-1), GATA2, GBP-1(구아닐레이트-결합 단백질-1), GRO-알파, HEX, ICAM-2(세포간 접착 분자 2), LMO2, LYVE-1, MRB(magic roundabout)(매직 라운드어바웃), 뉴클

레올린, PAL-E(pathologische anatomie Leiden-endothelium)[병리학 해부학적 라이덴-내피], RTK, sVCAM-1, TALI, TEM1(Tumor endothelial marker 1)[종양 내피 마커 1], TEM5[종양 내피 마커 5], TEM7[종양 내피 마커 7], 트롬보모듈린(TM, CD141), VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)[혈관 세포 접착 분자-1](CD106), VEGF, vWF[폰 빌레브란트 인자[von Willebrand factor]], ZO-1, 내피 세포-선택적 접착 분자[endothelial cell-selective adhesion molecule[ESAM]], CD102, CD93, CD184, CD304 및 DLL4를 포함한다.

[1190] 일부 구현예에서, 내피 세포는 장애/병태를 치료하거나 장애/병태의 증상을 개선하는 데 유용한 효소, 호르몬, 수용체, 리간드, 또는 약물과 같지만 이에 제한되지 않는 관심 단백질을 암호화하는 외인성 유전자를 발현하도록 추가로 유전자 변형된다. 내피 세포를 유전적으로 변형하는 표준 방법은 예컨대, 제US5,674,722호에 기재되어 있다.

[1191] 이러한 내피세포는 질병의 예방 또는 치료에 유용한 폴리펩티드 또는 단백질의 구성적 합성 및 전달을 제공하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 폴리펩티드는 개인의 혈류 또는 신체의 다른 영역(예를 들어, 중추 신경계)으로 직접 분비된다. 일부 구현예에서, 내피 세포는 인슐린, 혈액 응고 인자(예를 들어, 인자 VIII 또는 폰 빌레브란트 인자), 알파-1 항트립신, 아데노신 탈아미노효소, 조직 플라스미노겐 활성자, 인터루킨(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-3), 등을 분비하도록 변형될 수 있다.

[1192] 특정 구현예에서, 내피 세포는 삽입이식된 이식편과 관련하여 이들의 성능을 개선시키는 방식으로 변형될 수 있다. 비제한적인 예시적인 예는 관강내 혈전 형성을 방지하기 위한 혈전용해제의 분비 또는 발현, 평활근 비대로 인한 관강 협착을 방지하기 위한 평활근 증식 억제제의 분비, 및 내피 세포 증식을 자극하고, 이식편 내강의 내피 세포 라이닝의 범위 또는 기간을 개선하기 위한 내피 세포 미토겐(mitogen) 또는 자가 분비 인자의 발현 및/또는 분비를 포함한다.

[1193] 일부 구현예에서, 조작된 내피 세포는 분비된 생성물의 치료 수준을 특정 장기 또는 사지로 전달하기 위해 이용된다. 예를 들어, 시험관 내에서 조작된(형질도입된) 내피 세포로 라이닝된 혈관 이식물이 특정 장기 또는 사지 내로 이식될 수 있다. 형질도입된 내피 세포의 분비물은 관류된 조직에 고농도로 전달되어, 표적화된 해부학적 위치에 대해 원하는 효과를 달성할 것이다.

[1194] 다른 구현예에서, 내피 세포는 혈관신생 종양에서 내피 세포에 의해 발현될 때 혈관형성을 파괴하거나 억제하는 유전자를 함유하도록 추가로 유전자 변형된다. 일부 경우에서, 내피 세포는 또한 종양 치료 완료 시 이식된 내피 세포의 음성 선발을 허용하는 본원에 기재된 선발가능한 자살 유전자 중 임의의 하나를 발현하도록 유전자 변형될 수 있다.

[1195] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 내피 세포는 혈관 손상, 심혈관 질환, 혈관 질환, 말초 혈관 질환, 허혈성 질환, 심근경색증, 울혈성 심부전, 말초 혈관 폐쇄 질환, 고혈압, 허혈성 조직 손상, 재관류 손상, 사지 허혈, 뇌졸중, 신경병증(예를 들어, 말초 신경병증 또는 당뇨병성 신경병증), 장기 부전(예를 들어, 간부전, 신부전 등), 당뇨병, 류마티스성 관절염, 골다공증, 뇌혈관질환, 고혈압, 협심증 및 관상동맥질환으로 인한 심근경색증, 신혈관고혈압, 신동맥협착으로 인한 신부전, 하지 파행증, 기타 혈관 병태 또는 질환으로 이루어진 군에서 선택된 혈관 장애를 치료하기 위해 수용자 대상에게 투여된다.

[1196] f. 상피 세포

[1197] 세포 치료제에 사용되는 상피 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1198] 세포 치료제에 사용되는 상피 세포는 일차 상피 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 상피 세포상에서 수행될 수 있다.

[1199] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 상피 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 상피 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 상피 세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포 상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 상피 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1200] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 상피 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 상피 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 상피 세포에 대한

구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 상피 세포는 세포 치료제 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1201] 본원에 기재된 상피 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1202] 망막 색소 상피[RPE] 세포

[1203] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 RPE 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 RPE 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같이 조작되거나 변형된 세포는 일차 망막 색소 상피[retinal pigmented epithelium, RPE] 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 RPE 세포는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 개인에서 RPE 세포를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 이용하여 달성될 수 있다. 대상(예컨대, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착을 위해 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 RPE 세포가 본원에 제공된다.

[1204] 일부 구현예에서, 일차 RPE 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 일차 RPE 세포는, RPE 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 비롯한, 하나 이상의 인간)에서 유래되도록 RPE 세포의 풀에서 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 RPE 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, RPE 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, RPE 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상 중 하나 이상은 환자와 상이하다.

[1205] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포는, 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, RPE 세포로 분화되는, 조작된 iPSC에서 분화된 RPE 세포이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 사용한다. 일부 구현예에서, RPE 세포로 분화된 세포는 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착에 사용될 수 있다.

[1206] 만능 줄기 세포를 RPE 세포로 분화시키는 데 유용한 방법은 예를 들어, 명세서를 포함하여 그 개시내용 전체가 본원에 참조로 포함된, 제US9,458,428호 및 제US9,850,463호에 기재되어 있다. 인간 유도 만능 줄기 세포로부터 RPE 세포를 생산하는 추가의 방법은 예를 들어 문헌[Lamba et al., PNAS, 2006, 103(34): 12769-12774; Mellough et al, Stem Cells, 2012, 30(4):673-686; Idelson et al, Cell Stem Cell, 2009, 5(4): 396-408; Rowland et al, Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(2):457- 466, Buchholz et al, Stem Cells Trans Med, 2013, 2(5): 384-393, and da Cruz et al, Nat Biotech, 2018, 36:328-337]에서 찾을 수 있다.

[1207] 인간 만능 줄기 세포는, 그 전체가 그리고 특히 분화 기술 및 시약에 대해 여기에 약술된 방법 및 시약에 대해 본원에 참조로 포함된 문헌[Kamao et al , Stem Cell Reports 2014:2:205-18]에 약술된 기술을 사용하여 RPE 세포로 분화되었으며, 또한 RPE 세포의 시트 생성 및 환자로의 이식을 위한 기술에 대해 그 전체가 본원에 포함된 문헌[Mandai et al., N Engl J Med, 2017, 376:1038-1046]을 참조한다. 분화는 일반적으로 RPE 연관 및/또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 또는 기능적으로 측정함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 분석될 수 있다. 예를 들어, [Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18]을 참조하며, 그 내용 전체, 및 특히 결과 섹션의 첫번째 문단에서 약술된 마커에 대해 본원에 참조로 포함된다.

[1208] 일부 구현예에서, 시험관내 분화에 의해 조작된 만능 세포 집단에서부터 조작된 망막 색소 상피[RPE] 세포 집단을 생산하는 방법은: (a) 조작된 만능 세포 집단을 액티빈 A, bFGF, BMP4/7, DKK1, IGF1, 노긴, BMP 억제제, ALK 억제제, ROCK 억제제, 및 VEGFR 억제제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 인자를 포함하는 제1 배양 배지에서 배양하여 예비-RPE 세포 집단을 생산하는 단계, 및 (b) 예비-RPE 세포 집단을 제1 배양 배지와는 상이한 제2 배양 배지에서 배양하여 조작된 RPE 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, ALK 억제제는 SB-431542, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, ALK 억제제는 약 2 mM 내지 약 10 pM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, ROCK 억제제는 Y-27632, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, ROCK 억제제는 약 1 pM 내지 약 10 pM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, 제1 배양 배지 및/또

는 제2 배양 배지에는 동물 혈청이 없다.

[1209] 분화는 일반적으로 RPE 연관 및/또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 또는 기능적으로 측정함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 분석될 수 있다. 예를 들어 문헌[Kamao et al., Stem Cell Reports, 2014, 2(2):205-18]을 참조하며, 그 내용 전체 및 특히 결과 섹션에 대해 본원에 참조로 포함된다.

[1210] 분화 방법을 포함하여, 본 기술에 사용하기 위한 RPE 세포의 추가적인 설명은, 그 개시 내용 전체가 본원에 참조로 포함된 제WO2020/018615호에서 찾을 수 있다.

[1211] 일부 구현예에서, 조작된 RPE 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 RPE 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 RPE 세포 집단은, 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, RPE 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[1212] 예시적인 RPE 세포 유형은 망막 색소 상피[RPE] 세포, RPE 전구 세포, 미성숙 RPE 세포, 성숙 RPE 세포, 기능성 RPE 세포, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1213] 일부 구현예에서, RPE 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 RPE 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 RPE 세포는 천연 RPE 세포의 것과 유사하거나 실질적으로 유사한 유전자 발현 프로파일을 갖는다. 이러한 RPE 세포는 평면 기재 상에서 컨플루언스까지 배양된 경우, 천연 RPE 세포의 다각형, 평면 시트 형태를 가질 수 있다.

[1214] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 RPE 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 RPE 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 RPE 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다.

[1215] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 RPE 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 RPE 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 RPE 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 RPE 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 RPE 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1216] RPE 세포는 황반 변성을 앓고 있는 환자 또는 손상된 RPE 세포를 갖는 환자에 삽입이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 연령-관련 황반 변성[age-relatd macular degeneration, AMD], 초기 AMD, 중기 AMD, 후기 AMD, 비-신생혈관 연령-관련 황반 변성, 건성 황반 변성[건성 연령-관련 황반 변성], 습성 황반 변성[습성 연령-관련 황반 변성], 소아 황반 변성[JMD](예컨대, 스타르가르트(Stargardt)병, 베스트(Best)병, 및 소아 망막분리증), 레베르(Leber) 선천성 흑암시 또는 색소성 망막염을 갖는다. 다른 구현예에서, 환자는 망막 박리를 앓고 있다.

[1217] 치료적 적용을 위해, 개시된 방법에 따라 제조된 세포는 전형적으로 등장성 부형제를 포함하는 약학 조성물의 형태로 공급될 수 있고, 인간 투여를 위해 충분히 멸균된 조건 하에서 제조된다. 세포 조성물의 의약 제형의 일반 원리에 대해서는, 문헌["Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy," by Morstyn & Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and "Hematopoietic Stem Cell Therapy," E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000]을 참조. 세포는 분배 또는 임상 사용에 적합한 장치 또는 용기에 패키징될 수 있다.

[1218] 갑상선 세포

[1219] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 갑상선 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 갑상선 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 조작된 또는 변형된 세포는 일차 갑상선 세포이다. 일부 구현예에서, 일차 갑상선 세포는 하나 이상의 개별 공여자 대상, 예컨대 하나 이상의 건강한 개별 공여자 대상(예를 들어, 질환 또는 감염을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되지 않는, 예를 들어 이러한 임상 징후를 나타내지 않는 대상)에서 단리되거나 수득된다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 개인에서 갑상선 세포를 단리 또는 수득하는 방법은 알려진 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착을 위해 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하는 조작된 일차 갑상선 세포가 본원에 제공된다.

[1220] 일부 구현예에서, 일차 갑상선 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 일차 갑상선 세포는, 갑상선 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 비롯한, 하나 이상의 인간)에서 유래되도록 갑상선 세포의 풀에서 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 갑상선 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, 갑상선 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 갑상선 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상 중 하나 이상은 환자와 상이하다.

[1221] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 세포는, 본원에 기재된 변형(예를 들어, 유전자 변형)을 함유하고, 갑상선 세포로 분화되는, 조작된 iPSC에서 분화된 갑상선 세포이다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포에 따라 달라지며, 알려진 기술을 사용한다. 일부 구현예에서, 갑상선 세포로 분화된 세포는 대상자(예를 들어, 수용자)로 후속 이식 또는 생착을 위해 사용될 수 있다.

[1222] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변형을 함유하는 조작된 만능 세포는 자가면역 갑상선염을 다루기 위해 갑상선 호르몬을 분비할 수 있는 갑상선 전구 세포 및 갑상선 여포 장기유사체로 분화된다. 갑상선 세포를 분화시키는 기술은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 그 전체가 그리고 특히 인간 만능 줄기 세포에서 갑상선 세포의 생성을 위한 방법 및 시약, 및 또한 이식 기술에 대해 본원에 참조로 포함된 문헌[Kurmann et al., Cell Stem Cell, 2015 Nov 5;17(5):527- 42]를 참조. 분화는 일반적으로 갑상선 세포 연관 또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 또는 기능적으로 측정함으로써 당업계에 공지된 바와 같이 분석될 수 있다.

[1223] 일부 구현예에서, 조작된 갑상선 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 갑상선 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 갑상선 세포 집단은, 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, 저면역원성 내피 세포의 단리된 집단은 투여 전에 확장되고 동결보존된다.

[1224] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 갑상선 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 갑상선 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 갑상선 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다.

[1225] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 갑상선 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 갑상선 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 단리된 일차 갑상선 세포 또는 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 베타 섬 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 내피 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1226] g. 심장 세포

[1227] 세포 치료제에 사용되는 심장 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1228] 세포 치료제에 사용되는 심장세포는 일차성 심장세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 심장 세포상에서 수행될 수 있다.

[1229] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 심장 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 심장 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 심장 세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 심장 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1230] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 심장 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 심장 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 심장 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은

안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 심장 세포는 세포 치료제의 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1231] 본원에 기재된 심장 세포는 대상에서 질환을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[1232] 본원은 대상(예를 들어, 수용자)로의 후속 이식 또는 생착을 위해 HIP 세포에서 분화된 심장 세포 유형을 제공한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 사용한다. 예시적인 심장 세포 유형은 심근 세포, 결절성 심근 세포, 전도성 심근 세포, 작동 심근 세포, 심근 세포 전구 세포, 심근 세포 전구 세포, 심장 줄기 세포, 심근[cardiac muscle] 세포, 심방 심장 줄기 세포, 심실 심장 줄기 세포, 심외막 세포, 조혈 세포, 혈관 내피 세포, 심내막 내피 세포, 심장 판막 간질 세포 및 심장 박동기 세포 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1233] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 심장 세포는 소아 심근병증, 연령-관련 심근병증, 확장성 심근병증, 비대성 심근병증, 제한성 심근병증, 만성 허혈성 심근병증, 주산기 심근병증, 염증성 심근병증, 특발성 심근병증, 기타 심근병증, 심근 허혈성 재관류 손상, 심실 기능 장애, 심부전, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 말기-단계 심장 질환, 죽상동맥경화증, 허혈, 고혈압, 재협착증, 협심증, 류마티스성 심장, 동맥 염증, 심혈관 질환, 심근 경색, 심근 허혈, 울혈성 심부전, 심근 경색, 심장 허혈, 심장 손상, 심근 허혈, 혈관 질환, 후천성 심장 질환, 선천성 심장 질환, 죽상동맥경화증, 관상 동맥 질환, 기능 장애 전도 시스템, 기능 장애 관상 동맥, 폐 고혈압, 심장 부정맥, 근이영양증, 근육량 이상, 근육 퇴행, 심근염, 감염성 심근염, 약물- 또는 독소-유도된 근육 이상, 과민성 심근염 및 자가면역 심내막염으로 이루어진 군에서 선택된 심장 장애를 치료하기 위해 수용자 대상에 투여된다.

[1234] 따라서, 본원에서는 치료를 필요로 하는 대상에서 심장 손상 또는 심장 질환 또는 장애의 치료 및 예방 방법을 제공한다. 본원에 기술된 방법은 심장의 구조 및/또는 기능에 병리학적 손상을 초래하는 것과 같은 다수의 심장 질환 또는 이들의 증상의 진행을 치료, 개선, 예방 또는 늦추는데 사용될 수 있다. 용어 '심장 질환', '심장 장애', 및 '심장 손상'은 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용되며, 판막, 내피, 경색 구역, 또는 심장의 다른 구성요소 또는 구조를 비롯한, 심장과 관련된 상태 및/또는 장애를 지칭한다. 이러한 심장 질환 또는 심장-관련 질환은 심근 경색, 심부전, 심근병증, 선천성 심장 결함, 심장 판막 질환 또는 기능 장애, 심내막염, 류마티스열, 승모판 탈출증, 감염성 심내막염, 비후성 심근병증, 확장성 심근병증, 심근염, 심근비대 및/또는 승모판 기능 장애 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1235] 일부 구현예에서, 심근 세포 전구체는 성숙한(말기) 심근 세포를 포함하는 자손을 생성할 수 있는 세포를 포함한다. 심근 세포 전구세포는 종종 GATA-4, Nkx2.5, 및 MEF-2 족의 전사 인자에서 선택된 하나 이상의 마커를 사용하여 확인될 수 있다. 일부 경우에서, 심근 세포는 다음 목록, 즉 심장 트로포닌 I(cTnI), 심장 트로포닌 T(cTnT), 근체성 미오신 중쇄[myosin heavy chain, MHC], GATA-4, Nkx2.5, N-카드헤린, β2-아드레날린 수용체, ANF, 전사 인자의 MEF-2 족, 크레아틴 키나제 MB(CK-MB), 미오글로빈 또는 심방 나트륨이뇨제 인자[atrial naturiuretic factor, ANF] 중 하나 이상의 마커(때로는 적어도 3개 또는 5개의 마커)를 발현하는 미성숙 심근 세포 또는 성숙 심근 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, 심장 세포는 자발적 주기적 수축 활성을 나타낸다. 일부 경우에서, 심장 세포가 적절한 Ca^{2+} 농도 및 전해질 균형을 갖는 적합한 조직 배양 환경에서 배양될 때, 세포는 배양 배지에 임의의 추가 성분을 첨가할 필요 없이 세포의 한 축에 걸쳐 주기적인 방식으로 수축한 다음, 수축으로부터 방출되는 것으로 관찰될 수 있다. 일부 구현예에서, 심장 세포는 저면역원성 심장 세포이다.

[1236] 일부 구현예에서, 시험관내 분화에 의해 저면역원성 만능[hypoimmunogenic pluripotent, HIP] 세포 집단에서 저면역원성 심장 세포 집단을 생산하는 방법은: (a) GSK 억제제를 포함하는 배양 배지에서 HIP 세포 집단을 배양하는 단계, (b) WNT 길항제를 포함하는 배양 배지에서 HIP 세포 집단을 배양하여 예비-심장 세포 집단을 생산하는 단계, 및 (c) 인슐린을 포함하는 배양 배지에서 예비-심장 세포 집단을 배양하여 저면역원성 심장 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, GSK 억제제는 CHIR-99021, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, GSK 억제제는 약 2 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 존재한다. 일부 구현예에서, WNT 길항제는 IWR1, 이의 유도체, 또는 이의 변이체이다. 일부 경우에서, WNT 길항제는 약 2 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 존재한다.

[1237] 일부 구현예에서, 저면역원성 심장 세포 집단은 비-심장 세포에서 단리된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 심장 세포의 단리된 집단은 투여 전에 확장된다. 특정 구현예에서, 저면역원성 심장 세포의 단리된 집단은 투여 전에

확장 및 동결보존된다.

[1238] 유도 만능 줄기 세포 또는 만능 줄기 세포를 심장 세포로 분화시키는 다른 유용한 방법은 예를 들어, 제US2017/0152485호, 제US2017/0058263호, 제US2017/0002325호, 제US2016/0362661호, 제US2016/0068814호, 제US9,062,289호, 제US7,897,389호, 및 제US7,452,718호에 기재되어 있다. 유도 만능 줄기 세포 또는 만능 줄기 세포로부터 심장 세포를 생산하는 추가적인 방법은 예를 들어, 문헌[Xu et al, Stem Cells and Development, 2006, 15(5): 631-9, Burridge et al, Cell Stem Cell, 2012, 10: 16-28, and Chen et al, Stem Cell Res, 2015, 15(2):365-375]에 기재되어 있다.

[1239] 다양한 구현예에서, 저면역원성 심장 세포는 BMP 경로 억제제, WNT 신호전달 활성자, WNT 신호전달 억제제, WNT 효능제, WNT 길항제, Src 억제제, EGFR 억제제, PCK 활성자, 시토킨, 성장 인자, 심장 강화제, 화합물 등을 포함하는 배양 배지에서 배양될 수 있다.

[1240] WNT 신호전달 활성자에는 CHIR99021이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. PCK 활성자는 PMA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. WNT 신호전달 억제제는 KY02111, SO3031(KY01-I), SO2031(KY02-I), SO3042(KY03-I) 및 XAV939에서 선택되는 화합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. Src 억제제는 AG419259를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. EGFR 억제제는 AG1478을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1241] iPSC에서 심장 세포를 생성하기 위한 작용제의 비제한적인 예는 액티빈 A, BMP-4, Wnt3a, VEGF, 가용성 프리즐드 단백질, 시클로스포린 A, 안지오텐신 II, 페닐에프린, 아스코르브산, 디메틸설폭사이드, 5-아자-2'-데옥시시티딘 등을 포함한다.

[1242] 본원에 제공된 세포는 저면역원성 만능 세포의 심장 세포로의 분화를 지지 및/또는 촉진하기 위해 합성 표면과 같은 표면에서 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 표면은 선택된 하나 이상의 아크릴레이트 단량체의 단독중합체 또는 공중합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 중합체 재료를 포함한다. 아크릴레이트 단량체 및 메타크릴레이트 단량체의 비제한적인 예는 테트라(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트, 글리세롤 디메타크릴레이트, 1,4-부탄디올 디메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트, 디(에틸렌 글리콜) 디메타크릴레이트, 테트라(에틸렌 글리콜) 디메타크릴레이트, 1,6-헥산디올 프로폭실레이트 디아크릴레이트, 네오펜틸 글리콜 디아크릴레이트, 트리메틸올프로판 벤조에이트 디아크릴레이트, 트리메틸올프로판 에이옥실레이트(1 EO/QH) 메틸, 트리시클로[5.2.1.$0^{2,6}$] 데칸 디메탄올 디아크릴레이트, 네오펜틸 글리콜 에톡실레이트 디아크릴레이트, 및 트리메틸올프로판 트리아크릴레이트를 포함한다. 아크릴레이트는 당업계에서 알려진 바와같이 합성되거나, Polysciences, Inc., Sigma Aldrich, Inc. 및 Sartomer, Inc와 같은 상업적 공급자로부터 입수된다.

[1243] 중합체 재료는 지지체 재료의 표면상에 분산될 수 있다. 세포 배양에 적합한 유용한 지지체 재료는 세라믹 성분, 유리, 플라스틱, 중합체 또는 공중합체, 이들의 임의의 조합, 또는 하나의 재료의 또 다른 재료 상의 코팅물을 포함한다. 일부 경우에 있어서, 유리는 소다석회 유리, 파이렉스 유리, 바이코르 유리, 석영 유리, 규소, 또는 이들의 유도체 등을 포함한다.

[1244] 일부 경우에서, 플라스틱 또는 수지상 중합체를 포함하는 중합체는 폴리(염화비닐), 폴리(비닐 알코올), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(비닐 아세테이트-말레산 무수물), 폴리(디메틸실록산) 모노메타크릴레이트, 환형 올레핀 중합체, 플루오로카본 중합체, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌이민 또는 이들의 유도체 등을 포함한다. 일부 경우에서, 공중합체는 폴리(비닐 아세테이트-코-말레산 무수물), 폴리(스티렌-코-말레산 무수물), 폴리(에틸렌-코-아크릴산) 또는 이들의 유도체 등을 포함한다.

[1245] 본원에 기재된 바와 같이 제조된 심장 세포의 효능은 좌심실 벽 조직의 55%가 치료 없이 반흔 조직이 되도록 유발하는, 심장 동결손상에 대한 동물 모델에서 평가될 수 있다(문헌[Li et al, Ann. Thorac. Surg. 62:654, 1996; Sakai et al, Ann. Thorac. Surg. 8:2074, 1999, Sakai et al., Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:715, 1999)]). 성공적인 치료는 반흔 부위를 감소시키고, 반흔 확장을 제한하며, 수축기, 이완기 및 발달된 압력에 의해 결정되는 바와 같이 심장 기능을 개선할 수 있다. 심장 손상은 또한 좌측 전하행 동맥의 원위 부분에서 색전 코일을 사용하여 모델링될 수 있고(문헌[Watanabe et al., Cell Transplant. 7:239, 1998]), 치료 효능은 조직학 및 심장 기능에 의해 평가될 수 있다.

[1246] 일부 구현예에서, 조작된 심장 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 심장 세포 집단은 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, 심장 세포 집단은 투여 전에 확장되고 동결보존된다.

[1247] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 심장 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 심장 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현이 감소되거나 결여된다.

[1248] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 심장 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 심장 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 간세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 심장 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1249] 일부 구현예에서, 투여는 대상의 심장 조직 내로의 삽입이식, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 관상동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 근육내 주사, 심내막-경유 주사, 심외막-경유 주사, 또는 주입을 포함한다.

[1250] 일부 구현예에서, 조작된 심장 세포가 투여된 환자는 심장 약물 또한 투여받는다. 병용 요법에 사용하기에 적합한 심장 약물의 예시적인 예는 성장 인자, 성장 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 혈관신생제, 칼슘 채널 차단제, 항고혈압제, 항유사분열제, 수축촉진[inotropic]제, 항죽상동맥경화제, 항-응고제, 베타-차단제, 항-부정맥제, 소염제, 혈관확장제, 혈전용해제, 강심 배당체, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 원생동물 억제제, 질산염, 안지오텐신 전환 효소[ACE] 억제제, 안지오텐신 II 수용체 길항제, 뇌 나트륨이뇨 펩티드[brain natriuretic peptide, BNP], 항신생물제, 스테로이드 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1251] 방법에 따른 요법의 효과는 다양한 방식으로 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 심전도[electrocardiogram, ECG] 또는 홀리어 모니터(holier monitor)를 사용하여 치료의 효능을 결정할 수 있다. ECG는 심장 박동 및 전기 충격의 척도이며, 치료법이 대상의 심장에서 전기 전도의 저하를 개선 또는 유지, 예방 또는 느리게 하였는지를 결정하기 위한 매우 효과적이고 비침습적인 방법이다. 심장 이상, 부정맥 장애 등을 모니터링하기 위해 장기간 착용할 수 있는 휴대용 ECG인, 홀리어 모니터의 사용 또한 치료 효과를 평가하기 위한 신뢰성 있는 방법이다. ECG 또는 핵 연구를 사용하여 심실 기능의 개선을 결정할 수 있다.

[1252] 심근 세포

[1253] 세포 치료제에 사용되는 심근 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1254] 세포치료제에 사용되는 심근 세포는 일차 심근 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 심근 세포상에서 수행될 수 있다.

[1255] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 심근 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 심근 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 심근 세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 심근 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1256] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 심근 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 심근 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 심근 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 심근 세포는 세포 치료제의 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1257] 본원에 기재된 심근 세포는 대상에서 질환을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[1258] 본원에 개시된 세포는 심근 세포일 수 있으며, 예를 들어 심근 세포 집단이 사용될 수 있다. '세포', 예를 들어, 아래에서 '심근 세포'에 대한 임의의 지칭은, 본 출원에 기재된 바와 같은 '세포 집단' 예를 들어, '심근 세포 집단'에도 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[1259] 심근 세포는 전형적으로 단백질 NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2, 및 MYL7을 발현한다.

따라서, 이들 단백질은 심근 세포의 마커로서 사용될 수 있다.

[1260] 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2 및 MYL7로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 MYH6 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, MYH6, 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5 및 cTNT을 포함한다.

[1261] 심근 세포는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다.

[1262] 일부 구현예에서, 심근 세포는 만능 줄기 세포에서 분화하는 것일 수 있으며, 여기서 집단은 8일 내지 22일에 또는 약 이 시점 중 어느 하나에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, 하나 이상의 심근 세포 마커의 존재 빈도를 가지며, 분화는 0일에 개시된다.

[1263] 일부 구현예에서, 심근 세포는 만능 줄기 세포에서 분화될 수 있으며, 여기서 집단은 8일 내지 22일에 또는 약 이 시점 중 어느 하나에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, 하나 이상의 심근 세포 마커의 존재 빈도를 가지며, 분화는 0일에 개시된다.

[1264] 일부 구현예에서, 분화는 만능 줄기 세포를 글리코겐 합성효소 키나제 3[glycogen synthase kinase 3, GSK3]/Wnt/β카테닌 신호전달의 활성자의 억제제를 포함하는 배지에서 배양하는 제1일에 개시된다.

[1265] 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2, 및 MYL7로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 MYH6 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, MYH6, 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5 및 cTNT를 포함한다.

[1266] 일부 구현예에서, 집단은 8, 9, 10, 11 또는 12일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 8, 9, 10, 11 또는 12일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 8, 9, 10, 11 또는 12일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 8, 9, 10, 11 또는 12일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다.

[1267] 일부 구현예에서, 집단은 20, 21, 또는 22일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 20, 21, 또는 22일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 20, 21, 또는 22일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 20, 21, 또는 22일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다.

[1268] 일부 구현예에서, 집단은 9, 10, 또는 11일에 또는 약 이 시점에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 10일에 또는 약 10일에서, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다.

[1269] 일부 구현예에서, 집단은 8, 9, 10, 11, 또는 12일에 또는 약 이 시점에서, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인 NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 9, 10, 또는 11일에 또는 약 이 시점에서, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 10일에 또는 약 10일에서, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 8, 9, 10, 11, 또는 12일에 또는 약 이 시점에서, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 9, 10, 또는 11일에 또는 약 이 시점에서, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 집단은 10일에 또는 약 10일에서, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다.

[1270] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수-중간엽 줄기 세포, 심장 조직 줄기 세포, 및 지방 조직 줄기 세포로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포를 포함한다.

[1271] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 임의의 하나 이상의 방법, 즉 인큐베이션, 예를 들어 제1 인큐베이션, 제2 인큐베이션, 및/또는 제3 인큐베이션, 및 접촉에 의한 해리, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 해리제와 접촉을 사용하여 생산되었다.

[1272] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 2, 3, 4, 5, 또는 6일에 또는 약 이 시점에 해리제와 접촉되었다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 2, 3 또는 4일에 또는 약 이 시점에 해리제와 접촉되었다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 4일에 또는 약 4일에 해리제와 접촉되었다.

[1273] 일부 구현예에서, 해리제는 절단 효소이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 효소는 단백질분해효소이다. 몇몇 구현예에서, 단백질분해효소는 리신 또는 아르기닌 잔기의 C-말단 측에서 펩티드 결합을 절단하는 재조합 효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 펩티드내부분해효소이다. 일부 구현예에서, 펩티드내부분해효소는 트립신이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 트립신, 콜라겐분해효소, 키모트립신, 엘라스타제, 히알루론산분해효소, 파핀 및 디스파제로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 콜라겐분해효소는 I형 콜라겐분해효소, II형 콜라겐분해효소, 또는 III형 콜라겐분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 I형 콜라겐분해효소, II형 콜라겐분해효소, 또는 III형 콜라겐분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 콜라겐분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질 분해효소는 히알루론산분해효소이다.

[1274] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8-22일에 또는 약 이 시점 중 어느 하나에 존재한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22일에 또는 약 이 시점에 존재한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일에 또는 약 이 시점에 존재한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11, 또는 12일에 또는 약 이 시점에 존재한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 9, 10, 또는 11일에 또는 약 이 시점에 존재한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 10일 또는 약 10일에 존재한다.

[1275] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8-22일에 또는 약 이 시점 중 어느 하나에 수확하였다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22일에 또는 약 이 시점에 수확하였다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일에 또는 약 이 시점에 수확하였다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11, 또는 12일에 또는 약 이 시점에 수확하였다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 9, 10, 또는 11일에 또는 약 이 시점에 수확하였다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 10일에 또는 약 10일에서 수확하였다.

[1276] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 분화하는 심근

세포 집단은 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 분화하는 심근 세포 집단은 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 분화하는 심근 세포 집단은 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다.

[1277] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 분화하는 심근 세포 집단은 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 분화하는 심근 세포 집단은 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 분화하는 심근 세포 집단은 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+ 세포, 또는 MYH6+/MYL7+ 세포, 또는 NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+ 세포의 빈도를 갖는다.

[1278] 일부 구현예에서, 세포 집단은 임의의 제1 집합체의 세포 집단, 해리된 세포 집단, 예를 들어, 제1 집합체로부터 해리된 세포 집단, 임의의 제2 집합체의 세포 집단, 및/또는 심근 세포 집단 중에서 선택되는 하나 이상의 세포 집단을 포함하는 세포의 혼합된 집단일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 특정 시점에서 세포를 수확하는 것은 심근 세포를 포함하는 제2 집합체 및 제2 집합체를 형성하지 않은 해리된 세포 집단과 같은 세포의 혼합된 집단을 수확하는 것을 포함할 수 있다.

[1279] 일부 구현예에서, 세포 집단은 (a) 제1 집합체, 예컨대 본원에 기재된 제1 집합체 중 임의의 집합체, (b) 해리된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 해리된 세포 집단 중 임의의 집단, (c) 제2 집합체, 예컨대 본원에 기재된 제2 집합체 중 임의의 집합체, 및/또는 (d) 심근 세포 집단, 예를 들어, 제2 집합체의 심근 세포 집단 및/또는 제2 집합체에서 분화된 및/또는 그로부터 해리된 심근 세포 집단 중 하나 이상을 포함하는 세포의 혼합된 집단일 수 있다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단을 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션에 따라 배양하였지만, 제2 집합체를 형성하지 않았다.

[1280] 일부 구현예에서, 세포 집단은 제1 집합체 및 제2 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체 및/또는 제2 집합체를 포함하는 세포의 혼합된 집단이다.

[1281] 일부 구현예에서, 세포 집단은 제1 집합체, 해리된 세포 집단, 및 제2 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체 및/또는 해리된 세포 및/또는 제2 집합체의 집단을 포함하는 세포의 혼합된 집단이다.

[1282] 일부 구현예에서, 세포 집단은 제1 집합체 및 해리된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 제1 집합체 및/또는 해리된 세포 집단을 포함하는 혼합된 세포 집단이다.

[1283] 일부 구현예에서, 세포 집단은 해리된 세포 집단 및 제2 집합체, 예컨대 본원에 기재된 해리된 세포 집단 및 제2 집합체를 포함하는 혼합된 세포 집단이다.

[1284] 일부 구현예에서, 세포 집단은 제1 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체에서 분화된 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 제1 집합체에서 분화된 세포 집단은 본원에 기재된 임의의 시약, 조건 및/또는 인큐베이션에 따라 분화된다.

[1285] 일부 구현예에서, 세포 집단은 제2 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제2 집합체에서 분화된 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 제2 집합체에서 분화된 세포 집단은, 본원에 기재된 임의의 시약, 조건 및/또는 본원에 기재된 임의의 제2 및/또는 제3 인큐베이션을 포함하는 인큐베이션에 따라 분화된다.

[1286] 일부 구현예에서, 세포 집단은 제1 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체에서 분화된 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 제1 집합체로부터의 세포 집단의 해리는 임의의 수단 및/또는 시약 및/또는 조건에 의해 발생하거나, 또는 그로부터 발생할 수 있다.

[1287] 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션에 따라 배양되었지만, 제2 집합체를 형성하지 않았다.

[1288] 일부 구현예에서, 제1 집합체는 해리제와의 접촉 및/또는 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션에 따라 배양

되었지만, 해리된 세포 집단을 초래하지 않았다.

[1289] 일부 구현예에서, 세포 집단은 (a) 제1 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체, (b) 해리된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 임의의 해리된 세포 집단, (c) 제2 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제2 집합체, (d) 심근 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 임의의 심근 세포 집단, (e) 제1 집합체로부터 해리된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체로부터 해리된 세포 집단, (f) 제2 집합체로부터 해리된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제2 집합체로부터 해리된 세포 집단, (g) 해리된 세포 집단으로 해리되지 않고, 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션의 조건에 따라 배양된 제1 집합체, 예컨대 본원에 기재된 임의의 제1 집합체, 및 (h) 제2 집합체를 형성하지 않고, 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션의 조건에 따라 배양된 해리된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 임의의 해리된 세포 집단으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 세포 집단을 포함하는 세포의 혼합된 집단이다. 일부 구현예에서, 제1 집합체, 해리된 세포 집단, 제2 집합체, 심근 세포 집단, 제1 집합체에서 해리된 세포 집단, 제2 집합체에서 해리된 세포 집단, 해리된 세포 집단으로 해리되지 않고 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션의 조건에 따라 배양된 제1 집합체, 및 제2 집합체를 형성하지 않고 제2 인큐베이션 및/또는 제3 인큐베이션의 조건에 따라 배양된 해리된 세포 집단 중 하나 이상을, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24일에 또는 약 이 시점 중 어느 하나에서 수확하였다.

[1290] 일부 구현예에서, 임의의 이러한 세포 집단, 예를 들어, 만능 줄기 세포 집단, 해리된 세포 집단, 카리오미오사이트(cariomyocyte) 집단, 및/또는 집합체, 예를 들어, 제1 집합체 및/또는 제2 집합체와 이의 조합을 포함하여, 이들은 예컨대 질환 또는 병태의 치료를 위해, 수확, 동결보존, 및/또는 대상에게 투여될 수 있다.

[1291] 본원에 개시된 심근 세포는 만능 줄기 세포에서 분화될 수 있다. 상기 만능 줄기 세포에서 심근 세포를 분화시키는 방법은 만능 줄기 세포 집단을 배양하여 형성된 집합체를 해리제와 접촉시켜 해리된 세포 집단을 형성한 후, 해리된 세포를 집합시키고 이들을 심근 세포 집단으로 분화시키는 조건 하에서 배양하는 것을 포함할 수 있다.

[1292] 현탁 상태에서 만능 줄기 세포를 심근 세포로 분화시키는 현재의 방법은, 분화의 첫 주 동안 크기가 급격히 증가하고(예를 들어, 500 ㎛ 초과), 분화 과정의 종료시에 수확 및 동결보존을 위해 세포의 집합체가 단일 세포로 해리될 때까지, 분화 전반에 걸쳐 대략 그 크기로 유지되는 세포(예를 들어, 대략 250 ㎛의 평균 직경을 가짐)의 집합체(또한 때때로 클러스터로 지칭됨)로 시작한다.

[1293] 분화 첫 주 동안 도달된 크기(예를 들어, 500 ㎛ 초과)로 또는 대략 그 정도로 집합체를 유지하는 것은 만능 줄기 세포의 성숙한 심근 세포로의 분화 달성에 필요한 신호전달을 허용하는 데 필요한 것으로 여겨졌다. 이와 같이, 분화 동안, 예를 들어, 분화의 첫 주 동안 이러한 큰 집합체를 해리시키고, 이를 그러한 해리 전의 집합체 크기보다 더 작은 집합체로 재집합시키는 것은 통상적이지 않았을 것이다.

[1294] 만능 줄기 세포에서부터의 심근 세포 분화는 전형적으로 글리코겐 합성효소 키나제 3[GSK3]/Wnt/β-카테닌 신호전달의 활성화제, 예컨대 CHIR99021의 억제제를 사용한 유도 및 중배엽 형성으로 시작되며, 이어서 심장으로 집중[cardiac commitment]되어진다. 그러나, 과소 유도(적은 중배엽)와 과다 유도(많은 중배엽에 이어 적은 심장 집중) 사이의 좁은 시기 범위로 인해 부분적으로 만능 줄기 세포를 심근 세포로 분화시킬 때 재현성 문제가 발생할 수 있다. 또한, 분화 동안 큰 집합체의 중심에 있는 CD56+/PDFGRα+ 세포는, 세포가 분화에 걸쳐 큰 집합체에 존재할 때 발생하는 영양소 및/또는 공간적 제한으로 인해 심근 세포로 분화되는 것을 방지하거나 지연시킬 수 있다. 이는 생성된 분화된 심근 세포 집단의 감소된 일관성 및/또는 감소된 순도를 초래할 수 있다.

[1295] 일부 구현예에서, 개선된 분화 가능성, 심근 세포 분화의 개선된 일관성, 심근 세포 및 그의 전구체의 개선된 수확 및 동결보존, 및 세포 치료법, 예를 들어 심장 세포 치료법을 위한 해리된 집합체를 동결보존하고 사용하는 능력을 제공할 수 있는 하기 기재된 다른 방법이 사용될 수 있다.

[1296] 일부 구현예에서, 심근 세포는 a) 만능 줄기 세포 집단을 제1 집합체를 형성하는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 제1 배양을 수행하는 단계로서, 제1 배양은 0일에 개시되는 것인 단계, b) 제1 집합체를 해리제와 접촉시켜 해리된 세포 집단을 형성하는 단계, c) 해리된 세포 집단을 제2 집합체로 집합시키는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 제2 배양을 수행하는 단계, 및 d) 제2 집합체 내의 세포 집단을 심근 세포 집단으로 분화시키는 조건 하에 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하는 제3 배양을 수행하는 단계를 포함하는 방법에 의해 만능 줄기 세포에서 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 현탁 상태에서 수행된다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션, 접촉, 제2 인큐베이션, 및 제3 인큐베이션은 각각 현탁액에서 수행된다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션, 접

촉, 제2 인큐베이션, 및 제3 인큐베이션 중 하나 이상은 각각 현탁액에서 수행된다.

[1297] 만능 줄기 세포

[1298] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단[PSC]은 임의의 만능 줄기 세포, 예를 들어, 심근 세포로 분화할 수 있는 임의의 만능 줄기 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 심근 세포는 만능 줄기 세포로부터 유도된다.

[1299] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 골수-중간엽 줄기 세포, 심장 세포 줄기 세포, 및 지방 조직 줄기 세포로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 인간 만능 줄기 세포이거나 인간-유래 만능 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]이다. 일부 구현예에서, iPSC는 공여자, 예컨대 인간 공여자에게서 유래된다.

[1300] iPSC 집단은 임의의 이용 가능한 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 만능 줄기 세포를 생성하는 다양한 상이한 방법(일반적으로 iPSC; 쥣과 세포에 대한 miPSC, 또는 인간 세포에 대한 hiPSC로 지칭됨)이 알려져 있다. 원래의 유도는 네 개의 전사 인자, Oct3/4, Sox2, c-Myc 및 Klf4의 바이러스 도입을 사용하여 마우스 배아 또는 성체 섬유아세포에서 수행되었으며, 문헌[Takahashi and Yamanaka Cell 126:663-676 (2006)]을 참조하고, 이는 그 전체, 및 특히 거기에 약술된 기술에 대해 본원에 참조로 포함된다. 그 이후에, 다수의 방법이 개발되었으며, 검토를 위해 문헌[Seki et al, World J. Stem Cells 7(1): 116-125 (2015), 및 Vermuri, editors, Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013]을 참조하고, 이들 모두는 그 전체, 및 특히 hiPSC를 생성하는 방법(예를 들어 후자의 참조문헌의 3 장을 참조).

[1301] 일반적으로, iPSC는 보통 에피솜 벡터를 이용하여 도입된 숙주 세포에서 하나 이상의 '재프로그래밍 인자'의 일시적 발현에 의해 생성된다. 이들 조건하에서, 소량의 세포는 iPSC가 되도록 유도된다(일반적으로, 선발 마커가 사용되지 않아서, 이 단계의 효율은 낮다). 일단 세포가 '재프로그래밍되고', 만능이 되면, 이들은 에피솜 벡터(들)을 잃고, 내인성 유전자를 사용하여 인자를 생산한다. 에피솜 벡터(들)의 이러한 손실은 '제로 풋프린트(zero footprint)' 세포로 지칭되는 세포를 초래한다. 이는 유전자 변형이 적을수록(특히 숙주 세포의 유전체에서) 바람직하다. 따라서, 생성된 hiPSC는 영구적인 유전자 변형을 갖지 않는 것이 바람직하다.

[1302] 또한 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 사용될 수 있거나 사용되는 재프로그래밍 인자의 수는 다양할 수 있다. 일반적으로, 더 적은 재프로그래밍 인자가 사용될 때, 세포는 만능 상태로 형질전환하는 효율이 떨어지고, 또한 '만능성'도 떨어지며, 예를 들어, 더 적은 재프로그래밍 인자는 완전히 만능이 아니지만 단지 더 적은 수의 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포를 초래할 수 있다.

[1303] 일부 구현예에서, 단일 재프로그래밍 인자, OCT4가 사용된다. 다른 구현예에서, 두 개의 재프로그래밍 인자인 OCT4 및 KLF4가 사용된다. 다른 구현예에서, 세 개의 재프로그래밍 인자인 OCT4, KLF4 및 SOX2가 사용된다. 다른 구현예에서, 네 개의 재프로그래밍 인자들, OCT4, KLF4, SOX2 및 c-Myc가 사용된다. 다른 구현예에서, SOKMNLT, SOX2, OCT4(POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28, 및 SV40L T 항원에서 선택된 5, 6, 또는 7개의 재프로그래밍 인자가 사용될 수 있다.

[1304] 일반적으로, 이들 재프로그래밍 인자 유전자는 당업계에 알려져 있고, 시판되는 에피솜 벡터상에 제공된다. 예를 들어, ThermoFisher/Invitrogen은 hiPSC의 제로 풋프린트 생성을 위한 센다이(sendai) 바이러스 리프로그래밍 키트를 판매한다(카탈로그 번호 A34546 참조). ThermoFisher는 또한 EBNA-기반 시스템을 판매하며, 카탈로그 번호 A14703을 참조한다.

[1305] 또한, 다수의 시판되는 hiPSC 계열이 존재한다: 예를 들어, Gibco® Episomal hiPSC 계열, K18945를 참조하며, 이는 제로 풋프린트, 바이러스-통합이 없는 인간 iPSC 세포주이다(또한, 상기 문헌 [Burridge et al, 2011] 참조).

[1306] 일반적으로, iPSC는 본원에 기재된 바와 같은 재프로그래밍 인자를 일시적으로 발현시킴으로써, 비-다능성 세포, 예컨대, CD34+ 제대혈 세포, 섬유아세포 등으로부터 제조된다. 예를 들어, C-Myc를 생략하면서 재프로그래밍 효율은 감소되었지만, Oct3/4, Sox2 및 Klf4만을 사용하여 성공적인 iPSC가 생성되었다.

[1307] 일반적으로, iPSC는 KLF4, Nanog, OCT4, SOX2, ESRRB, TBX3, c-Myc 및 TCL1을 포함하는 특정 인자의 발현을 특징으로 한다. 이들 인자의 신규 또는 증가된 발현은 내인성 좌위의 유도 또는 조절을 통해 또는 이식유전자로부터의 발현을 통해 이루어질 수 있다.

[1308] 예를 들어, 쥣과 iPSC는 문헌[Diecke et al, Sci Rep. 2015, Jan. 28;5:8081 (doi: 10.1038/srep08081)]의 방법을 사용하여 생성될 수 있으며, 이는 그 전체가 그리고 구체적으로 miPSC의 생성을 위한 방법 및 시약에 대해

본원에 참조로 포함된다. 또한, 예를 들어 문헌[Burridge et al., PLoS One, 2011 6(4): 18293]을 참조하며, 그 전체가 그리고 구체적으로 거기 약술된 방법에 대해 본원에 참조로 포함된다.

[1309] 일부 구현예에서, 본원에 기재되고/되거나 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 생성된 PSC(예를 들어, iPSC)는 심근 세포로 분화되어, 예컨대 심근 세포가 고도로 농축된 조성물을 생성한다.

[1310] PSC(예를 들어, iPSC)는 문헌[Murry and Keller, Cell (2008) 132(4):661- 80; Burridge et al., Cell Stem Cell (2012) 10:16-28; Lian et al., Nature Protocols (2013) 8:162-65; Batalov and Feiberg, Biomark. Insight (2015) 10(Suppl. 1):71-6; Denning et al., Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. (2016) 1863:1728-48; Breckwoldt et al., Nature Protocols (2017) 12:1177-97; Guo et al., Stem Cell Res. And Ther. (2018) 9:44; 및 Leitolis et al., Front. Cell Dev. Biol. (2019) 8:164]에 기재된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 알려진 방법에 의해 심근 세포로 분화될 수 있다.

[1311] 일부 구현예에서, 심근 세포는 심근 세포의 이식을 받는 대상에게 동종이계이다. 따라서, 일부 구현예에서, 심근 세포가 유래하는 PSC(예를 들어, iPSC)는 임의의 알려진 방법에 의해 저면역원성이 되도록 조작된다.

[1312] 예를 들어, 핵산 서열은 PSC(예를 들어, iPSC) 내에서 변형되어 저면역원성 PSC를 생성할 수 있다. 세포 내에서 핵산 서열을 변형시키는 기술은 상동성 재조합, 녹인, 녹아웃, ZFN[아연 집게 핵산분해효소], TALEN[전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소], CRISPR[군집화된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부]/Cas9, 및 다른 부위-특이적 핵산분해효소 기술을 포함한다. 이들 기술은 원하는 좌위 부위에서 이중 가닥 DNA 파손을 가능하게 한다. 이들 제어된 이중 가닥 파손은 특정 좌위 부위에서 상동성 재조합을 촉진한다. 이 과정은 서열을 인식 및 결합하고 핵산 분자에서 이중 가닥 절단을 유도하는 핵산내부분해효소로 염색체와 같은 핵산 분자의 특정 서열을 표적화하는 데 중점을 둔다. 이중 가닥 파손은 오류 경향의 비-상동성 단부 결합[NHEJ]에 의해 또는 상동성 재조합[homologous recombination, HR]에 의해 복구된다.

[1313] 제WO 2020/018615호에 기재된 것을 포함하여, 그 전체가 본원에 참조로 포함된 다수의 상이한 기술을 사용하여 PSC(예를 들어, iPSC)를 저면역원성이 되도록 조작할 수 있다. 일부 구현예에서, PSC[iPSC]를 저면역원성으로 조작하는 것은 저면역원성 PSC(예를 들어, iPSC)에서 분화된 심근 세포를 비롯한 세포에 대한 수용체의 면역 반응을 감소시킨다.

[1314] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것은 만능 줄기 세포를, 예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 또는 6일 또는 약 이 시점까지, 집합체, 예를 들어 약 300 내지 약 700 ㎛의 직경을 갖는 집합체를 형성하기에 적합한 임의의 농도로 시딩함으로써 수행될 수 있다.

[1315] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 약 1 x 105 내지 3 x 107 세포/mL, 2 x 105 내지 2 x 107 세포/mL, 3 x 105 내지 1 x 107 세포/mL, 4 x 105 내지 9 x 106 세포/mL, 5 x 105 내지 8 x 106 세포/mL, 6 x 105 내지 7 x 106 세포/mL, 7 x 105 내지 6 x 106 세포/mL, 8 x 105 내지 5 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 4 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 3 x 106 세포/mL, 1 x 106 내지 2 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 내지 1.9 x 106 세포/mL, 1.2 x 106 내지 1.8 x 106 세포/mL, 1.25 x 106 내지 1.75 x 106 세포/mL의 범위 또는 약 이 범위의 세포 생존 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 0일에서의 접종 시점 또는 약 이 시점에서, 또는 0일에 제1 인큐베이션의 개시 시점 또는 약 이 시점에서, 약 1 x 105 내지 3 x 107 세포/mL, 2 x 105 내지 2 x 107 세포/mL, 3 x 105 내지 1 x 107 세포/mL, 4 x 105 내지 9 x 106 세포/mL, 5 x 105 내지 8 x 106 세포/mL, 6 x 105 내지 7 x 106 세포/mL, 7 x 105 내지 6 x 106 세포/mL, 8 x 105 내지 5 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 4 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 3 x 106 세포/mL, 1 x 106 내지 2 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 내지 1.9 x 106 세포/mL, 1.2 x 106 내지 1.8 x 106 세포/mL, 1.25 x 106 내지 1.75 x 106 세포/mL 범위 또는 약 이 범위의 세포 생존 농도를 갖는다.

[1316] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 약 1.0 x 106 세포/mL, 1.05 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 세포/mL, 1.15 x 106 세포/mL, 1.2 x 106 세포/mL, 1.25 x 106 세포/mL, 1.3 x 106 세포/mL, 1.35 x 106 세포/mL, 1.4 x 106 세포/mL, 1.45 x 106 세포/mL, 1.5 x 106 세포/mL, 1.55 x 106 세포/mL, 1.6 x 106 세포/mL, 1.65 x 106 세포/mL, 1.7 x 106 세포/mL, 1.75 x 106 세포/mL, 1.8 x 106 세포/mL, 1.85 x 106 세포/mL, 1.9 x 106 세포/mL, 1.95 x 106 세포/mL, 2.0 x 107 세포/mL, 2.05 x 107 세포/mL, 2.1 x 107 세포/mL, 2.15 x 107 세포/mL, 또는 2.2 x 107 세포/mL 범위 또는 약 이 범위의 세포 생존 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 0일에서의 접종 시점 또는 약 이 시점에서, 또는 0일에 제1 인큐베이션의 개시 시점 또는 대략 이 시점에서, 1.0 x 106 세포/mL, 1.05 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 세포/mL, 1.15 x 106 세포/mL, 1.2 x 106 세포

/mL, 1.25 x 106 세포/mL, 1.3 x 106 세포/mL, 1.35 x 106 세포/mL, 1.4 x 106 세포/mL, 1.45 x 106 세포/mL, 1.5 x 106 세포/mL, 1.55 x 106 세포/mL, 1.6 x 106 세포/mL, 1.65 x 106 세포/mL, 1.7 x 106 세포/mL, 1.75 x 106 세포/mL, 1.8 x 106 세포/mL, 1.85 x 106 세포/mL, 1.9 x 106 세포/mL, 1.95x 106 세포/mL, 2.0 x 107 세포/mL, 2.05 x 107 세포/mL, 2.1 x 107 세포/mL, 2.15 x 107 세포/mL, 또는 2.2 x 107 세포/mL 범위 또는 약 이 범위의 세포 생존 농도를 갖는다.

[1317] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 1.4 x 106 세포/mL, 1.45 x 106 세포/mL, 1.5 x 106 세포/mL, 1.55 x 106 세포/mL, 1.6 x 106 세포/mL, 1.65 x 106 세포/mL, 1.7 x 106 세포/mL, 1.75 x 106 세포/mL, 또는 1.8 x 106 세포/mL 범위 또는 약 이 범위의 세포 생존 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 0일에서의 접종 시점 또는 약 이 시점에서, 또는 0일에 제1 인큐베이션의 개시 시점 또는 대략 이 시점에서, 1.4 x 106 세포/mL, 1.45 x 106 세포/mL, 1.5 x 106 세포/mL, 1.55 x 106 세포/mL, 1.6 x 106 세포/mL, 1.65 x 106 세포/mL, 1.7 x 106 세포/mL, 1.75 x 106 세포/mL, 또는 1.8 x 106 세포/mL 범위 또는 약 이 범위의 세포 생존 농도를 갖는다.

[1318] 배양 및 해리를 위한 시약 및 조건

[1319] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포에서 심근 세포를 분화시키기 위한 시약 및 조건, 예를 들어, 제1 인큐베이션, 제2 인큐베이션, 및/또는 제3 인큐베이션 중 하나 이상은 알려진 방법을 포함하거나 이에서 변형될 수 있다.

[1320] 배아 심장 발달에 중요한 가용성 인자에는 액티빈 A, BMP4, 노달, Wnt 효능제 및 길항제, bFGF 및 기타 분자가 포함된다(문헌[Conlon et al, Development 120(7): 1919 (1994); Lough et al, Dev. Biol. (1996) 178(1): 198; Mima et al, PNAS (1995) 92(2):467; Zaffran and Frasch, Circ. Res. (2002) 91 (6), 457]). 심근 세포 분화를 유도하는 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들어 문헌[Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2):e16734; Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1):25-35; Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2):367-76; Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5):581-9; Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1):29-39; Yang et al., Nature (2008) 453:524-28; Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8:228-40; Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24; Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134; Xu et al., Regen Med (2011) 6(1):53-66; Mignone et al., Circ J (2010) 74(12):2517-26; and Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6):H1793-803]에 기재된 임의의 것들이 사용될 수 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. PSC(예를 들어, iPSC 또는 ESC)는 또한 제WO2013013206호 및 제WO2013056072호에 기재된 임의의 방법에 의해 심근 세포로 분화될 수 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 포함된다.

[1321] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포에서 심근 세포를 분화시키는 방법은 a) 만능 줄기 세포 집단을 제1 집합체를 형성하는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는 제1 인큐베이션을 수행하는 단계로서, 여기서 제1 인큐베이션은 0일에 개시되는 것인 단계, b) 제1 집합체를 해리제와 접촉시켜 해리된 세포 집단을 형성하는 단계, c) 해리된 세포를 제2 집합체로 응집시키는 조건 하에서 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함하는 제2 인큐베이션을 수행하는 단계, 및 (d) 제2 집합체 내의 세포 집단을 심근 세포 집단으로 분화시키는 조건 하에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하는 제3 인큐베이션을 수행하는 단계를 포함한다. 제1 인큐베이션, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 것을 통한 해리, 제2 인큐베이션, 및 제3 인큐베이션을 위한 예시적인 시약 및 조건이 아래에 제공되며, 이는 제한하고자 의도되지 않는다.

[1322] 제1 인큐베이션

[1323] 제1 인큐베이션은 0일에 개시되고, 만능 줄기 세포 집단을 제1 집합체를 형성하는 조건 하에 배양하는 것을 포함한다.

[1324] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 만능 줄기 세포가 제1 집합체를 형성하도록 하기에 적합한 임의의 조건, 예컨대 임의의 배지, 시약, 및/또는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 및 6 일 중 하나 이상에서 사용된 조건 하에 만능 줄기 세포 집단을, 만능 줄기 세포에서 심근 세포를 분화시키기 위한 임의의 알려진 방법, 예컨대 문헌[Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2):e16734; Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1):25-35; Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2):367-76; Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5):581-9; Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1):29-39; Yang et al., Nature (2008) 453:524-28; Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8:228-40; Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24; Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134; Xu et al., Regen Med (2011) 6(1):53-66; Mignone et al., Circ J (2010)

74(12):2517-26; Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6):H1793-803, 제WO2013013206호, 및 제WO2013056072호]에 기재된 방법에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 만능 줄기 세포가 제1 집합체를 형성하도록 하기에 적합한 임의의 하나 이상의 배지, 예를 들어 문헌[Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2):e16734; Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1):25-35; Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2):367-76; Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5):581-9; Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1):29-39; Yang et al., Nature (2008) 453:524-28; Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8:228-40; Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24; Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134; Xu et al., Regen Med (2011) 6(1):53-66; Mignone et al., Circ J (2010) 74(12):2517-26; Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6):H1793-803, 제WO2013013206호, 및 제WO2013056072호]에 기재된 바와 같이 알려진 임의의 배지를 0, 1, 2, 3, 4, 5, 및 6 일 중 하나 이상에서 사용하여 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1325] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 만능 줄기 세포 집단을 글리코겐 합성효소 키나제 3[GSK3]의 억제제/Wnt/β-카테닌 신호전달의 활성자를 포함하는 배지에서 분화 0일[differentiation day 0, DD0]에 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, GSK3의 억제제/Wnt/β-카테닌 신호전달의 활성자, 및 L-알라닐-L-글루타민(L-글루타민을 위한 이펩티드 치환체)를 포함하는 DD0 배지 중에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, DD0 배지는 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제를 더 포함한다. 일부 구현예에서, DD0 배지는 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제는 B27™ 마이너스 인슐린 보충제(Cat#A18956-01; Life Technologies)이다.

[1326] 일부 구현예에서, DD0 배지는 MCDB 131 배지(Cat#10372-019; Life Technologies)인 기본 배지를 포함한다.

[1327] 일부 구현예에서, L-알라닐-L-글루타민은 GlutaMax™, 예컨대 CTS GlutamMax™ (Cat #A12860-01; Life Technologies) 또는 GlutaMax™ (Cat# 35050-061; Life Technologies)이다.

[1328] 일부 구현예에서, GSK-3α 및/또는 GSK-3β의 억제제는 GSK-3α 및 GSK-3β의 억제제이다. 일부 구현예에서, GSK-3α 및/또는 GSK-3β의 억제제는 CHIR99021이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 4 μM 내지 약 8 μM 이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 5 μM 내지 약 7 μM이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 5, 5.5, 6, 6.5, 또는 7 μM , 또는 전술된 임의의 값들 사이의 임의의 값이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 또는 7 μM이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 5 μM 내지 약 6 μM, 또는 약 4.5 μM 내지 약 6.5 μM이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 5 μM이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 약 6 μM이다. 일부 구현예에서, CHIR99021의 농도는 5 μM 또는 약 6 μM이다.

[1329] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 GSK-3α 및/또는 GSK-3β의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD0 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 0일에 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 GSK-3α 및/또는 GSK-3β의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD0 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 0일 및 1일에 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 0 및 1일에, 그리고 제1 인큐베이션의 후속일 중 하나 이상에서, GSK-3α 및/또는 GSK-3β의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD0 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1330] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 분화 1일[differentiation day 1, DD1] 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지, 예를 들어 DD1 배지는 MCDB 131 배지인 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, L-알라닐-L-글루타민은 GlutaMax™(Cat#35050-061; Life Technologies)이다. 일부 구현예에서, 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제는 B27™ 마이너스 인슐린 보충제(Cat#A18956-01; Life Technologies)이다.

[1331] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 1일에 또는 약 1일에서 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD1 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 1 및 2일에 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD1 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 1 및 2일에, 그리고 제1 인큐베이션의 후속일 중 하나 이상에서, L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 및 무인슐린 성장 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD1 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1332] 일부 구현예에서, 0일 후에, 제1 인큐베이션은 만능 줄기 세포 집단을 Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함

하는 배지, 예를 들어 분화 제2일[DD2] 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지, 예를 들어 DD2 배지는 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함한다. 일부 구현예에서, 배지, 예를 들어 DD2 배지는 MCDB 131 배지인 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제는 WIKI4, NSC668036, iCRT3, iCRT5, iCRT14, IWP-2, XAV-939, ICG-001, LGK-974, OMP-18R5, FJ9, IWR-1-endo, KY02111, PFK115-584, Wnt-059, DKK1, FH-535, Box5, 및 펩티드 Pen-N3으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제는 WIKI4이다. 일부 구현예에서, L-알라닐-L-글루타민은 GlutaMax™(Cat#35050-061; Life Technologies)이다. 일부 구현예에서, 무혈청 분화 보충제는 B27™ 보충제(Cat#A1486701; Life Technologies)이다.

[1333] 일부 구현예에서, Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD2 배지에서 만능 줄기 세포 집단의 배양은, 제1 인큐베이션이 0일에 개시된 후 대략 36 내지 48시간에 시작된다. 일부 구현예에서, Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD2 배지에서 만능 줄기 세포 집단의 배양은 제1 인큐베이션이 0일에 개시된 후 대략 40시간 후에 시작된다.

[1334] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 2일에 또는 약 2일에서 Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD2 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 1, 2 및 3일에 또는 대략 이 시점 중 하나 이상에서 Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD2 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 2 및 3일에 또는 약 이 시점에서 Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD2 배지 중에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 제1 인큐베이션의 2 및 3일에 또는 약 이 시점에서, 및 제1 인큐베이션의 하나 이상의 후속일에서 Wnt/β-카테닌 신호전달의 억제제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD2 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1335] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 제3 분화일[DD3] 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지, 예를 들어, DD3 배지는 MCDB 131 배지인 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, L-알라닐-L-글루타민은 GlutaMax™(Cat#35050-061; Life Technologies)이다. 일부 구현예에서, 무혈청 분화 보충제는 B27™ 보충제(Cat#A1486701; Life Technologies)이다.

[1336] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 3일 또는 약 3일에서 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어, 분화 3일[DD3] 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 3, 4, 5 및 6일에 또는 약 이 시점 중 하나에서 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어, 분화 3일[DD3) 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 3 및 4일에 또는 약 이 시점에서 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 분화 3일[DD3] 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 3 및 4일 및 제1 인큐베이션의 후속일 중 하나 이상에서, L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어, 분화 3일[DD3] 배지에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1337] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 직경이 300 내지 1,000 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 직경이 300 내지 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1,000 ㎛ 또는 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 2, 3, 4, 5, 또는 6일에 또는 약 이 시점에서, 직경이 300 내지 1,000 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 2, 3, 4, 5 또는 6일에 또는 약 이 시점에서, 직경이 300 내지 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1,000 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 직경이 300 내지 700 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 2, 3, 4, 5 또는 6일에 또는 약 이 시점에서, 직경이 300 내지 700 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 2, 3, 4, 5 또는 6일에 또는 약 이 시점에서, 직경이 350 내지 650 ㎛, 400 내지 650 ㎛, 450 내지 650 ㎛, 450 내지 600 ㎛, 500 내지 650 ㎛, 550 내지 650 ㎛, 또는 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위들이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 직경이 500 내지 650 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 직경이 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 3 또는 4일에 또는 약 이 시점에서, 직경이 300 내지 약 700 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 3 또는 4일에 또는 약 이 시점에서, 직경이 350 내지 650 ㎛, 400 내지

650 ㎛, 450 내지 650 ㎛, 450 내지 600 ㎛, 500 내지 650 ㎛, 550 내지 650 ㎛, 또는 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위들이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 3 또는 4일에 직경이 500 내지 650 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 3 또는 4일에 또는 약 이 시점에서 직경이 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위이다.

[1338] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 만능 줄기 세포 집단이 DDO 배지에 의해 먼저 접촉될 때 개시된다.

[1339] 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 현탁액에서 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 만능 줄기 세포 집단을 현탁액에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은 제1 인큐베이션의 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 또는 4일 이상, 또는 5일 이상 동안 현탁액에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 인큐베이션은, 제1 인큐베이션 전체 동안 현탁액 중에서 만능 줄기 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1340] 해리제를 이용한 해리

[1341] 제1 인큐베이션 동안 형성되는 제1 집합체는 해리제를 사용하여 해리되어 해리된 세포 집단을 형성한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이 방법은 제1 집합체를 해리제와 접촉시켜 해리된 세포 집단을 형성하는 단계를 포함한다.

[1342] 일부 구현예에서, 접촉은 제1 집합체의 직경이 300 내지 1,000 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 제1 집합체의 직경이 300 내지 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1,000 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다.

[1343] 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 300 내지 1,000 ㎛이거나 약 이 범위일 때, 예컨대 직경이 300 내지 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1,000 ㎛이거나 약 이 범위일 때, 직경이 350 내지 650 ㎛, 400 내지 650 ㎛, 450 내지 650 ㎛, 450 내지 600 ㎛, 500 내지 650 ㎛, 550 내지 650 ㎛, 또는 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 집합체는 직경이 500 내지 650 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 집합체는 직경이 약 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는, 제1 집합체의 직경이 400 내지 1,000, 400 내지 950, 400 내지 900, 400 내지 850, 400 내지 800, 400 내지 750, 400 내지 700, 450 내지 1,000, 450 내지 950, 450 내지 900, 450 내지 850, 450 내지 800, 450 내지 750, 또는 450 내지 700 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다.

[1344] 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 300 ㎛ 내지 1,000 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 300 내지 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1,000 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 350 내지 650 ㎛, 400 내지 650 ㎛, 450 내지 650 ㎛, 450 내지 600 ㎛, 500 내지 650 ㎛, 550 내지 650 ㎛, 또는 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 400 내지 1,000, 400 내지 950, 400 내지 900, 400 내지 850, 400 내지 800, 400 내지 750, 400 내지 700, 직경 450 내지 1,000, 450 내지 950, 450 내지 900, 450 내지 850, 450 내지 800, 450 내지 750, 또는 450 내지 700 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 500 내지 650 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 제1 집합체를 해리제와 접촉시키는 단계는 제1 집합체의 직경이 550 내지 600 ㎛이거나 약 이 범위일 때 발생한다. 일부 구현예에서, 시간, 예를 들어, 제1 집합체가 해리제와 접촉되는 시간은 2, 3, 4, 5, 또는 6일이거나 약 이 시간이다. 일부 구현예에서, 시간, 예를 들어 제1 집합체가 해리제와 접촉되는 시간은 2 또는 3일이거나 약 이 시간이다. 일부 구현예에서, 시간, 예를 들어 제1 집합체가 해리제와 접촉되는 시간은 3일 또는 4일이거나 대략 이 시간이다. 일부 구현예에서, 시간, 예를 들어 제1 집합체가 해리제와 접촉되는 시간은 4 또는 5일이거나 약 이 시간이다. 일부 구현예에서, 시간, 예를 들어 제1 집합체가 해리제와 접촉되는 시간은 4일 또는 약 이 4일이다.

[1345] 일부 구현예에서, 접촉은 2, 3, 4, 5, 및 6일 중 어느 하나에 또는 대략 이 시점에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 2 또는 3일 또는 약 이 시점에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 3 또는 4일에 또는 약 이 시점에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 4 또는 5일에 또는 약 이 시점에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 5 또는 6일에 또는 약 이 시점에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 4일 또는 약 4일에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 2 내지 6일 중 어느 하나에 또는 약 이 시점에서, 또는 3 내지 6일 중 어느 하나에 또는 약

이 시점에서, 또는 4 내지 6일 중 어느 하나에 또는 약 이 시점에서 발생한다.

[1346] 일부 구현예에서, 접촉은 제1 인큐베이션 후, 제1 인큐베이션의 마지막 날에 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 제1 인큐베이션의 마지막 날의 다음 날에 발생한다.

[1347] 일부 구현예에서, 접촉 시, 제1 집합체는 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95%이거나 적어도 이 수치인 CD56+/PDGFRα+ 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 접촉 시, 제1 집합체는 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95%이거나 적어도 이 수치인 CD56+/PDGFRα+ 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 접촉 시, 제1 집합체는 80%, 81%, 92%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%이거나 적어도 이 수치인 CD56+/PDGFRα+ 세포의 빈도를 포함한다.

[1348] 해리제는, 일부 구현예에서, 적절한 배양 조건 하에서 후속적으로 증식 및/또는 성장 및/또는 분화하는 해리된 세포의 능력에 영향을 주지 않으면서, 세포의 집합체가 서로 해리될 수 있게 하는 임의의 작용제일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 해리제는 절단 효소거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 효소는 단백질분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 리신 또는 아르기닌 잔기의 C-말단상에서 펩티드 결합을 절단하는 재조합 효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 TrypLE™ Select(Cat#A1217702; Life Technologies)이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 리신 또는 아르기닌 잔기의 C-말단상에서 펩티드 결합을 절단하는 재조합 효소, 예컨대 TrypLE™ Select이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 펩티드내부분해효소이다. 일부 구현예에서, 펩티드내부분해효소는 트립신이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 트립신, 콜라겐분해효소, 키모트립신, 엘라스타제, 히알루론산분해효소, 파핀 및 디스파제로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 콜라겐분해효소는 I형 콜라겐분해효소, II형 콜라겐분해효소, 또는 III형 콜라겐분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 I형 콜라겐분해효소, II형 콜라겐분해효소, 또는 III형 콜라겐분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질분해효소는 콜라겐분해효소이다. 일부 구현예에서, 단백질 분해효소는 히알루론산분해효소이다.

[1349] 일부 구현예에서, 접촉은 해리된 세포 집단을 초래하기에 충분한 지속기간 동안 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 약 15분 내지 약 2시간의 기간 동안 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 약 30분 내지 약 90분, 약 30분 내지 약 75분, 약 40분 내지 약 60분, 약 40분 내지 약 55분, 약 40분 내지 약 50분, 약 45분 내지 55분, 또는 약 45분 내지 약 50분의 기간 동안 일어난다. 일부 구현예에서, 접촉은 약 40 내지 약 55분의 기간 동안 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉은 약 45 내지 약 50분의 기간 동안 일어난다.

[1350] 일부 구현예에서, 이 방법은, 접촉 동안, 제1 집합체를 교반하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 교반은 진탕기, 예를 들어 플랫폼 진탕기를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 교반은 20 내지 100 RPM이거나 약 이 범위의 분당 회전수[RPM]로 수행된다. 일부 구현예에서, 교반은 약 20 내지 100, 20 내지 90, 20 내지 80, 20 내지 70, 20 내지 60, 20 내지 50, 30 내지 100, 30 내지 90, 30 내지 80, 30 내지 70, 30 내지 60, 30 내지 50, 40 내지 100, 40 내지 90, 40 내지 80, 40 내지 70, 40 내지 60, 40 내지 50 RPM, 50 내지 100, 50 내지 90, 50 내지 80, 50 내지 70, 50 내지 60, 60 내지 100, 60 내지 90, 60 내지 80, 또는 60 내지 70의 RPM에서 수행된다. 일부 구현예에서, 교반은 45 내지 55 RPM이거나 약 이 범위, 예컨대 50 RPM이거나 대략 이 수치의 RPM에서 수행된다. 일부 구현예에서, 교반은 50 RPM이거나 대략 이 수치에서 수행된다. 일부 구현예에서, 교반은 임의의 하나 이상의 전술된 RPM 및/또는 RPM 범위, 예컨대 각각 일정 기간 동안 1, 2, 3, 또는 4개 이상의 상이한 RPM에서 수행된다.

[1351] 일부 구현예에서, 방법은 접촉 동안 및/또는 접촉 후에, 해리된 세포 집단을 분쇄하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 분쇄는 해리된 세포 집단을 피펫을 통해 일 회 이상 통과시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 분쇄는 해리된 세포 집단을 피펫을 통해 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25회 또는 적어도 이 횟수로 통과시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 분쇄는 해리된 세포 집단을 피펫을 통해 약 15 내지 약 25회, 예컨대 약 20회 통과시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 분쇄는, 해리된 세포 집단을 분쇄하는 것을 포함하지 않는 방법의 경우보다, 더 높은 빈도의 단일 세포를 갖는 해리된 세포 집단을 초래한다.

[1352] 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 1 x 105 내지 3 x 107 세포/mL, 2 x 105 내지 2 x 107 세포/mL, 3 x 105 내지 1 x 107 cells/mL, 4 x 105 내지 9 x 106 세포/mL, 5 x 105 내지 8 x 106 세포/mL, 6 x 105 내지 7 x 106 세포/mL, 7 x 105 내지 6 x 106 세포/mL, 8 x 105 내지 5 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 4x 106 세포/mL, 9 x

10^5 내지 3 x 106 세포/mL, 1 x 106 내지 2 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 내지 1.9 x106 세포/mL, 1.2 x 106 내지 1.8 x 106 세포/mL, 1.25 x 106 내지 1.75 x 106 세포/mL이거나 약 이 범위들의 생존 세포 밀도를 갖는다.

[1353] 일부 구현예에서, 접촉 및/또는 분쇄 후, 해리된 세포 집단은 약 1 x 105 내지 3 x 107 세포/mL, 2 x 105 내지 2 x 107 세포/mL, 3 x 105 내지 1 x 107 세포/mL, 4 x 105 내지 9 x 106 세포/mL, 5 x 105 내지 8 x 106 세포/mL, 6 x 105 내지 7 x 106 세포/mL, 7 x 105 내지 6 x 106 세포/mL, 8 x 105 내지 5 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 4 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 3 x 106 세포/mL, 1 x 106 내지 2 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 내지 11.9 x 106 세포/mL, 1.2 x 106 내지 1.8 x 106 세포/mL, 1.25 x 106 및 1.75 x 106 세포/mL이거나 약 이 범위들의 생존 세포 밀도를 갖는다.

[1354] 일부 구현예에서, 접촉이 개시된 후 1 또는 2시간 또는 약 이 시점에서, 해리된 세포 집단은 1 x 105 내지 3 x 107 세포/㎖, 2 x 105 내지 2 x 107 세포/㎖, 3 x 105 내지 1 x 107 세포/㎖, 4 x 105 내지 9 x 106 세포/mL, 5 x 105 내지 8 x 106 세포/mL, 6 x 105 내지 7 x 106 세포/mL, 7 x 105 내지 6 x 106 세포/mL, 8 x 105 내지 5 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 4 x 106 세포/mL, 9 x 105 내지 3 x 106 세포/mL, 1 x 106 내지 2 x 106 세포/mL, 1.1 x 106 내지 1.9 x 106 세포/mL, 1.2 x 106 내지 1.8 x 106 세포/mL, 1.25 x 106 및 1.75 x 106 세포/mL이거나 약 이 범위들의 생존 세포 밀도를 갖는다.

[1355] 일부 구현예에서, 접촉은 현탁액에서 발생한다. 일부 구현예에서, 접촉시키는 단계는 제1 집합체를 현탁액 중의 해리제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 분쇄 및/또는 교반은 현탁액에서 수행된다.

[1356] 제2 인큐베이션

[1357] 제2 인큐베이션은 접촉 후에 수행되고, 해리된 세포를 제2 집합체로 집합시키기 위한 조건 하에서 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1358] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 해리된 세포 집단이 제2 집합체로 집합될 수 있게 하기에 충분한 기간 동안 발생한다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단이 제2 집합체로 집합되도록 하기에 충분한 기간은 약 1 내지 3일 또는 약 이 기간이다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단이 제2 집합체로 집합되도록 하기에 충분한 기간은 1일 또는 2일 또는 대략 이 기간이다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단이 제2 집합체로 집합되도록 하기에 충분한 기간은 1일 또는 약 1일이다.

[1359] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 해리된 세포 집단을 L-알라닐-L-글루타민 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 분화 4 일[DD4] 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지, 예를 들어, DD3 배지는 MCDB 131 배지인 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, L-알라닐-L-글루타민은 GlutaMax™, 예컨대 CTS GlutamMax™(Cat #A12860-01; Life Technologies)이다. 일부 구현예에서, 무혈청 분화 보충제는 B27™ 보충제(Cat#A1486701; Life Technologies)이다.

[1360] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 2-7일 중에서 연속 하루 또는 이틀을, 예를 들어 DD4 배지에서 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일에 또는 약 이 시점에서 예를 들어 DD4 배지에서 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함하고/하거나, 제2 인큐베이션은 2 및 3일에 또는 약 이 시점에서, 3 및 4일에 또는 약 이 시점에서, 4 및 5일에 또는 약 이 시점에서, 5 및 6일에 또는 약 이 시점에서, 또는 6 및 7일 또는 약 이 시점에서 예를 들어 DD4 배지에서, 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 2 및 3일, 3 및 4일, 4 및 5일, 5 및 6일, 또는 6 및 7일 중에서 선택된 연속된 이틀에, 예를 들어 DD4 배양 배지에서 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 배양은 4 및 5일에 또는 약 이 시점에서, 예를 들어 DD4 배양 배지에서 해리된 세포 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[1361] 일부 구현예에서, 제2 집합체는 제1 집합체보다 직경이 더 작다. 일부 구현예에서, 제2 집합체는 제1 집합체의 직경보다 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 더 작은 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 접촉 후 1 또는 2일에 또는 약 이 시점에서, 제2 집합체는 접촉 직전의 제1 집합체보다 직경이 더 작다. 일부 구현예에서, 접촉 후 제1 또는 2일에 또는 약 이 시점에서, 제2 집합체는 접촉 직전의 제1 집합체의 직경보다 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 더 작은 직경을 갖는다.

[1362] 일부 구현예에서, 집합체, 예를 들어 제1 집합체 및/또는 제2 집합체의 직경은 동일한 조건 하에 배양된 복수의 이러한 집합체, 예를 들어 복수의 제1 집합체 또는 복수의 제2 집합체의 평균 직경에 기초한다.

[1363] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 2일에 및/또는 접촉 후 24시간에 또는 약 24시간에, 예를 들어 접촉이 개시

된 후 24시간 또는 약 24시간에, 형성된 제2 집합체의 직경은 25 내지 200 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 2일에 및/또는 접촉 후 24시간 또는 약 24시간에, 예를 들어 접촉이 개시된 후 24시간 또는 약 24시간에, 형성되는 제2 집합체의 직경은 25 내지 200, 25 내지 175, 25 내지 150, 25 내지 125, 30 내지 200, 30 내지 175, 30 내지 150, 30 내지 125, 35 내지 200, 35 내지 175, 35 내지 150, 35 내지 125, 40 내지 200, 40 내지 175, 40 내지 150, 40 내지 125, 45 내지 200, 45 내지 175, 45 내지 150, 45 내지 125, 50 내지 200, 50 내지 175, 50 내지 150, 50 내지 125, 55 내지 200, 55 내지 175, 55 내지 150, 55 내지 125, 60 내지 200, 60 내지 175, 60 내지 150, 60 내지 125, 65 내지 200, 65 내지 175, 65 내지 150, 65 내지 125, 70 내지 직경 200, 70 내지 175, 70 내지 150, 70 내지 125, 75 내지 200, 75 내지 175, 75 내지 150, 또는 75 내지 125 ㎛이거나 또는 약 이 범위이다.

[1364] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일 및/또는 접촉 후 24시간 또는 약 24 시간, 예를 들어 접촉이 개시된 후 24시간 또는 약 24시간에, 형성된 제2 집합체는, (a) 해리제와 접촉되기 직전의 제1 집합체의 직경의 50% 미만의 직경을 갖고/갖거나, (b) 해리제와 접촉되기 직전의 제1 집합체의 직경의 5-50% 또는 약 이 범위의 직경을 갖고/갖거나, (c) 해리제와 접촉되기 직전의 제1 집합체의 직경의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 또는 대략 이 수치의 직경을 갖고/갖거나, (d) 해리제와 접촉되기 직전의 제1 집합체의 직경의 5-25% 또는 약 이 범위의 직경을 갖는다.

[1365] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일에 및/또는 접촉 후 24시간 또는 약 24시간에, 예를 들어 접촉이 개시된 후 24시간 또는 약 24시간에, 제2 집합체는 해리제와 접촉되기 직전의 제1 집합체의 직경의 5-25% 또는 약 이 범위의 직경을 갖는다.

[1366] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 날에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 200, 25 내지 175, 25 내지 150, 25 내지 125, 30 내지 200, 30 내지 175, 30 내지 150, 30 내지 125, 35 내지 200, 35 내지 175, 35 내지 150, 35 내지 125, 40 내지 200, 40 내지 175, 40 내지 150, 40 내지 125, 45 내지 200, 45 내지 175, 45 내지 150, 45 내지 125, 50 내지 200, 50 내지 175, 50 내지 150, 50 내지 125, 55 내지 200, 55 내지 175, 55 내지 150, 55 내지 125, 60 내지 200, 60 내지 175, 60 내지 150, 60 내지 125, 65 내지 200, 65 내지 175, 65 내지 150, 65 내지 125, 70 내지 200, 70 내지 175, 70 내지 150, 70 내지 125, 75 내지 200, 75 내지 175, 75 내지 150, 또는 75 내지 125㎛ 또는 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 해리제와 접촉한 날의 다음 날은 3, 4, 5, 6, 또는 7일이다. 일부 구현예에서, 해리제와 접촉한 날의 다음 날은 5일이다.

[1367] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 200, 25 내지 175, 25 내지 150, 25 내지 125, 30 내지 200, 30 내지 175, 30 내지 150, 30 내지 125, 35 내지 200, 35 내지 175, 35 내지 150, 35 내지 125, 40 내지 200, 40 내지 175, 40 내지 150, 40 내지 125, 45 내지 200, 45 내지 175, 45 내지 150, 45 내지 125, 50 내지 200, 50 내지 175, 50 내지 150, 50 내지 125, 55 내지 200, 55 내지 175, 55 내지 150, 55 내지 125, 60 내지 200, 60 내지 175, 60 내지 150, 60 내지 125, 65 내지 200, 65 내지 175, 65 내지 150, 65 내지 125, 70 내지 200, 70 내지 175, 70 내지 150, 70 내지 125, 75 내지 200, 75 내지 175, 75 내지 150, 또는 75 내지 125 ㎛이거나 약 이 범위들이다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일은 3, 4, 5, 6, 또는 7일이다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일은 5일이다.

[1368] 일부 구현예에서, 해리제와 접촉한 다음 제2일 및/또는 제2 인큐베이션의 시작 다음 제2일 및/또는 제3 인큐베이션의 제1일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 해리제와 접촉한 날의 다음 제2일 및/또는 제2 인큐베이션을 개시한 날의 다음 제2일 및/또는 제3 인큐베이션의 제1일은 4, 5, 6, 7 또는 8일 또는 약 이 시점이다. 일부 구현예에서, 해리제와 접촉한 날의 다음 제2일 및/또는 제2 인큐베이션을 개시한 날의 다음 제2일 및/또는 제3 인큐베이션의 제1일은 6일 또는 약 6일이다.

[1369] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션의 제2일 및/또는 제3 인큐베이션의 제1일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 200, 25 내지 175, 25 내지 150, 25 내지 125, 30 내지 200, 30 내지 175, 30 내지 150, 30 내지 125, 35 내지 200, 35 내지 175, 35 내지 150, 35 내지 125, 40 내지 200, 40 내지 175, 40 내지 150, 40 내지 125, 45 내지 200, 45 내지 175, 45 내지 150, 45 내지 125, 50 내지 200, 50 내지 175, 50 내지 150, 50 내지 125, 55 내지 200, 55 내지 175, 55 내지 150, 55 내지 125, 60 내지 200, 60 내지 175, 60 내지 150, 60 내지 125, 65 내지 200, 65 내지 175, 65 내지 150, 65 내지 125, 70 내지 200, 70 내지 175, 70 내지 150, 70 내지 125, 75 내지 200, 75 내지 175, 75 내지 150, 또는 75 내지 125 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 5일 또는 약 5

일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 200, 25 내지 175, 25 내지 150, 25 내지 125, 30 내지 200, 30 내지 175, 30 내지 150, 30 내지 125, 35 내지 200, 35 내지 175, 35 내지 150, 35 내지 125, 40 내지 200, 40 내지 175, 40 내지 150, 40 내지 125, 45 내지 200, 45 내지 175, 45 내지 150, 45 내지 125, 50 내지 200, 50 내지 175, 50 내지 150, 50 내지 125, 55 내지 200, 55 내지 175, 55 내지 150, 55 내지 125, 60 내지 200, 60 내지 175, 60 내지 150, 60 내지 125, 65 내지 200, 65 내지 175, 65 내지 150, 65 내지 125, 70 내지 200, 70 내지 175, 70 내지 150, 70 내지 125, 75 내지 200, 75 내지 175, 75 내지 150, 또는 75 내지 125㎛이거나 약 이 범위이다.

[1370] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션을 개시한 날의 다음 제2일 및/또는 제3 인큐베이션의 제1일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250 ㎛이거나 약 이 범위이다. 6일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250㎛이거나 약 이 범위이다.

[1371] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션을 개시한 날의 다음 제3일 및/또는 제3 인큐베이션의 제2일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 400, 25 내지 350, 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 400, 40 내지 350, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 400, 60 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 400, 60 내지 350, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 400, 70 내지 350, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 400, 80 내지 350, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 7일에 제2 집합체의 직경은 25 내지 400, 25 내지 350, 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 400, 40 내지 350, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 400, 60 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 400, 60 내지 350, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 400, 70 내지 350, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 400, 80 내지 350, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250 ㎛이거나 약 이 범위이다.

[1372] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션을 개시한 날의 다음 제4일 및/또는 제3 인큐베이션의 제3일에, 제2 집합체의 직경은 25 내지 400, 25 내지 350, 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 400, 40 내지 350, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 400, 60 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 400, 60 내지 350, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 400, 70 내지 350, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 400, 80 내지 350, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250 ㎛이거나 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 8일에 제2 집합체의 직경은 25 내지 400, 25 내지 350, 25 내지 300, 25 내지 275, 25 내지 250, 40 내지 400, 40 내지 350, 40 내지 300, 40 내지 275, 40 내지 250, 50 내지 400, 60 내지 350, 50 내지 300, 50 내지 275, 50 내지 250, 60 내지 400, 60 내지 350, 60 내지 300, 60 내지 275, 60 내지 250, 70 내지 400, 70 내지 350, 70 내지 300, 70 내지 275, 70 내지 250, 80 내지 400, 80 내지 350, 80 내지 300, 80 내지 275, 또는 80 내지 250㎛이거나 약 이 범위이다.

[1373] 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 현탁액에서 발생한다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 해리된 세포 집단을 현탁액에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 제2 인큐베이션의 1일 이상, 예컨대 1, 2 또는 3일 동안 해리된 세포 집단을 현탁액에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 제2 인큐베이션 전체 동안 해리된 세포 집단을 현탁액에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 인큐베이션은 해리된 세포 집단을 12 내지 72시간, 12 내지 60시간, 12 내지 48시간, 12 내지 36시간, 12 내지 24시간, 18 내지 72시간, 18 내지 60시간, 18 내지 48시간, 18 내지 36시간, 18 내지 24시간, 24 내지 72시간, 24 내지 60시간, 24 내지 48시간, 또는 24 내지 36시간 동안 또는 대략 이 시간 동안 현탁액에서 배양하는 것을 포함한다.

[1374] 제3 인큐베이션

[1375] 제3 인큐베이션은 제2 집합체의 형성 후에, 예를 들어 제2 인큐베이션 후에 수행되며, 제2 집합체 내의 세포 집단을 심근 세포 집단으로 분화시키기 위한 조건 하에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다.

[1376] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션의 배양은 제2 집합체 내의 세포 집단을 심근 세포 집단으로 분화시키기에 적합한 임의의 조건 하에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션의 배양은 예를 들어 문헌 [Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2):e16734; Dambrot et al., Biochem J.

(2011) 434(1):25-35; Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2):367-76; Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5):581-9; Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1):29-39; Yang et al., Nature (2008) 453:524-28; Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8:228-40; Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24; Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134; Xu et al., Regen Med (2011) 6(1):53-66; Mignone et al., Circ J (2010) 74(12):2517-26; Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6):H1793-803, 제WO2013013206호, 및 제WO2013056072호]에 기재된 바와 같은 배지, 시약 및/또는 조건을 포함할 수 있으며, 이는 0일에 분화 방법의 개시 후, 예를 들어 22일에 심근 세포의 수확을 통해 3일 중 임의의 하나 이상에서 사용된 것들을 포함한다.

[1377] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 제2 집합체를 글루코스를 포함하는 배지, 예를 들어, 분화 제6일[DD6] 배지, 및 젖산나트륨을 포함하는 배지, 예를 들어, 분화 제10일[DD10] 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 글루코스를 포함하는 배지 및 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 동시에 배양되지 않는다.

[1378] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 글루코스를 포함하는 배지, 예를 들어, 분화 제6일[DD6] 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하며, 무혈청 분화 보충제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 배지, 예를 들어, DD6 배지는 RPMI 1640 배지(Cat#11875-093; Life Technologies)인 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 분화 보충제는 B27™ 보충제(Cat#A1486701; Life Technologies)이다.

[1379] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 4일 내지 22일 중에서 선택된 하나 이상의 날 동안 또는 심근 세포 집단이 수확될 때까지 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 4, 5, 6, 또는 7일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 또는 6일 이상으로 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어, DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 5, 6 또는 7일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 3, 4 또는 5일로 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 제6일에 또는 약 6일에 시작하여 연속 5일로 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다.

[1380] 일부 구현예에서, 젖산나트륨을 포함하는 배지는 글루코스가 부족하다. 일부 구현예에서, 젖산나트륨은 나트륨-S-젖산염(Cat#106522; Millipore-Sigma)이다.

[1381] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 제3 인큐베이션의 개시에서 시작하고, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 1, 2, 3, 또는 4일의 기간은 제외하고, 예를 들어 22일 또는 약 22일에 수확될 때까지 지속하여, 글루코스를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하며, 여기서 글루코스를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배양 배지는 젖산나트륨을 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지로 대체된다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 제3 인큐베이션의 개시에서 시작하고, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 1, 2, 3, 또는 4일의 기간은 제외하고, 예를 들어 22일 또는 약 22일에 수확될 때까지 지속하여, 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하며, 여기서 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지는 젖산나트륨을 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지로 대체된다.

[1382] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 제3 인큐베이션의 개시에서 시작하고, 10일 또는 약 10일, 예를 들어 10, 11, 및 12일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 3일의 기간은 제외하고, 예를 들어 22일 또는 약 22일에 수확될 때까지 지속하여, 글루코스를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하며, 여기서 글루코스를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지는 젖산나트륨을 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지로 대체된다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 제3 인큐베이션의 개시에서 시작하고, 10일 또는 약 제10일, 예를 들어 10, 11, 및 12일에 시작하여 연속 3일의 기간은 제외하고, 예를 들어 22일 또는 약 22일에 수확될 때까지 지속하여, 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함하며, 여기서 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD6 배지는 젖산나트륨을 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지로 대체된다.

[1383] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 7 내지 15일 중에서 선택된 하나 이상의 날에 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 7 내지 15일 중에서 선택되는 연속 1, 2 이상, 3 이상, 또는 4일 이상으로 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서,

제3 인큐베이션은 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 1, 2, 3, 또는 4일로 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배양 배지, 예를 들어 DD10 배양 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 9, 10, 또는 11일 또는 약 이 시점에서 시작하여 연속 3일로 글루코스 및 무혈청 분화 배지를 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 10, 11 및 12일에 글루코스 및 무혈청 분화 보충제를 포함하는 배지, 예를 들어 DD10 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다.

[1384] 일부 구현예에서, (a) 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 6-10일 및 12-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 10-12일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하거나, 또는 (b) 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 4-8일 및 12-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 8-12일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하거나, 또는 (c) 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 5-9일 및 13-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 9-13일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하거나, 또는 (d) 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 7-11일 및 13-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 11-13일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하거나, 또는 (e) 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 8-12일 및 14-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 12-14일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함한다.

[1385] 일부 구현예에서, 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 6-10 일 및 12-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 10-12일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 4-8일 및 12-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 8-12일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 5-9일 및 13-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 9-13일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 7-11일 및 13-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 11-13일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 8-12일 및 14-22일 또는 약 이 시점에서 글루코스를 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계를 포함하고, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 12-14일 또는 약 이 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다.

[1386] 일부 구현예에서, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 약 9-13일 중 임의의 하나 이상의 날에 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 10-12일 중 하나 이상의 날에 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 단계는 10-12일 또는 대략 시점에서 젖산나트륨을 포함하는 배지에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다.

[1387] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 심근 세포 집단이 수확될 때까지 계속된다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 4 내지 8일 또는 약 이 시점에서 어느 하나에, 예를 들어, 4, 5, 6, 7일 또는 8일에서 시작되고, 심근 세포 집단이 수확될 때까지 계속된다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 4 또는 5일 또는 약 이 시점에서 시작

한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 6 내지 8일 또는 약 이 시점에서의 어느 하나에, 예를 들어, 6, 7 또는 7일에 시작되고, 심근 세포 집단이 수확될 때까지 계속된다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 6 또는 7일 또는 약 이 시점에서 시작된다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 6일 또는 약 6일에 시작된다.

[1388] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 8, 9, 10, 11 및 12일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 또는 98% 또는 적어도 이 수치인 하나 이상의 심근 세포 마커의 빈도를 포함한다. 심근 세포 마커의 예는, 예를 들어 단백질 NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2 및 MYL7을 포함한다. NKX2.5는 NK2 호메오박스 5(NKX2-5로도 알려짐)이고, NKX2-5 유전자(NM_001166175; NCBI 유전자 ID 1482)에 의해 암호화된다. cTNT는 트로포닌 T2 심장 유형(TNNT2로도 알려짐)이고, TNNT2 유전자(NG_007556; NCBI 유전자 ID 7139)에 의해 암호화된다. ACTN2는 악티닌 알파 2이고 ACTN2 유전자(NCBI 수탁: NG_009081; NCBI 유전자 ID 88)에 의해 코딩된다. TNNI1은 트로포닌 I1 골격 유형(SSTNII로도 알려짐)이고 TNNI1 유전자(NG_016649; NCBI 유전자 ID 7135)에 의해 암호화된다. TNNI3은 트로포닌 I3 심장 유형이고, TNNI3 유전자(NM_000363; NCBI 유전자 ID 7137)에 의해 암호화된다. MYH6은 미오신 중쇄 6이고 MYH6 유전자(NM_002471; NCBI 유전자 ID 4624)에 의해 암호화된다. MYH7은 미오신 중쇄 7이고 MYH7 유전자(NM_000257; NCBI 유전자 ID 4625)에 의해 암호화된다. MYL2는 미오신 경쇄 2이고 MYL2 유전자(NM_000432; NCBI 유전자 ID 4633)에 의해 암호화된다. MYL7은 미오신 경쇄 7이고 MYL2 유전자(NM_021223; NCBI 유전자 ID 58498)에 의해 암호화된다.

[1389] 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2, 및 MYL7로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5 및 cTNT를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 MYH6 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, MYH6, 및 MYL7을 포함한다.

[1390] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션 동안, 심근 세포 집단은 8-12일 중 임의의 하나 이상의 날, 즉 제8, 9, 10, 11, 및 12일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인 NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 8-12일 중 임의의 하나 이상, 즉 8, 9, 10, 11, 및 12일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션 동안, 심근 세포 집단은 9-11일 중 임의의 하나 이상, 즉 9, 10, 및 11일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인 NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 9-11일 중 임의의 하나 이상, 즉 9, 10, 및 11일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션 동안, 심근 세포 집단은 10일 또는 약 10일 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인 NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 10일 또는 약 10일 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다. 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 10일 또는 약 10일에, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다.

[1391] 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 8-12일 중 임의의 하나 이상, 즉 8, 9, 10, 11, 및 12일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다. 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 9-11일 중 임의의 하나 이상, 즉 9, 10 및 11일 중 임의의 하나 이상의 날 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다. 일부 구현예에서, NKX2.5+/cTNT+ 세포의 빈도는, 10일 또는 약 제10일 및/또는 해리제와 접촉한 날의 다음 제6일에, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98%이거나 적어도 이 수치이다.

[1392] 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 현탁액에서 발생한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 현탁액에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 또는 약 이

시점에서 시작하여 현탁액에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 6일 또는 약 6일에 시작하여 현탁액에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 해리제와 접촉 후 1, 2, 3, 또는 4일 또는 약 이 시점에서 시작하여 현탁액에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 인큐베이션은 해리제와 접촉 후 2일 또는 약 2일에 시작하여 현탁액에서 제2 집합체를 배양하는 것을 포함한다.

[1393] 심근 세포 집단

[1394] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 75%, 76%, 77%, 78%, 79% 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인 하나 이상의 심근 세포 마커의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2, 및 MYL7로 이루어진 군에서 선택된다. 특히, 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5 및 cTNT를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 MYH6 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, MYH6, 및 MYL7을 포함한다.

[1395] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2 및 MYL7로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 심근 세포 마커의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, MYH6+/MYL7+의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, MYH6+/MYL7+의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 또는 98% 또는 적어도 이 수치인, NKX2.5+/cTNT+/MYH6+/MYL7+의 빈도를 포함한다.

[1396] 일부 구현예에서, 제2 집합체 내의 심근 세포 집단은 이전에 해리되지 않은 세포를 포함하는 집합체 내의 심근 세포의 참조 집단과 비교하여 더 높은 성숙 심근 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 20, 21, 22, 23, 또는 24일 또는 약 이 시점에서, 제2 집합체 내의 심근 세포 집단은 이전에 해리되지 않은 세포를 포함하는 집합체 내 심근 세포의 참조 집단에 비해 더 높은 성숙한 심장 세포의 빈도를 포함한다. 일부 구현예에서, 22일 또는 약 22일에, 제2 집합체 내의 심근 세포 집단은 이전에 해리되지 않은 세포를 포함하는 집합체 내 심근 세포의 참조 집단에 비해 더 높은 성숙한 심장 세포의 빈도를 포함한다.

[1397] 일부 구현예에서, 참조 심근 세포 집단은 b) 및 c)를 제외하고는 제2 집합체 내의 심근 세포 집단과 동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에 분화된다. 일부 구현예에서, 참조 심근 세포 집단은 집합체를 해리제와 접촉시켜 해리된 세포 집단을 형성하는 것을 포함하지 않는 조건 하에 분화된다. 일부 구현예에서, 참조 심근 세포 집단은 집합체를 해리제와 접촉시키는 것을 포함하지 않는 것을 제외하고는 제2 집합체 내의 심근 세포 집단과 동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에 분화된다. 일부 구현예에서, 참조 심근 세포 집단은 집합체를 해리제와 접촉시키는 것을 포함하지 않는 것을 제외하고는 제2 집합체 내의 심근 세포 집단과 동일하거나 실질적으로 동일한 조건 하에 분화된다. 일부 구현예에서, 참조 심근 세포 집단은 해리제를 이용하여 이전에 분해되지 않았다.

[1398] 일부 구현예에서, 성숙 심근 세포의 빈도는 제2 집합체 내의 심근 세포 집단 내의 하나 이상의 성숙 심근 세포 마커의 존재 빈도에 기초한다. 심근 세포 마커는 심근 세포를 확인하는 데 사용되는 임의의 마커, 예를 들어 임의의 세포 표면 마커일 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는, NKX2.5, cTNT, ACTN2, TNNI1, TNNI3, MYH6, MYH7, MYL2 및 MYL7로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 마커를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 MYH6 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5, cTNT, MYH6, 및 MYL7을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 심근 세포 마커는 NKX2.5 및 cTNT를 포함한다.

[1399] 생착 부정맥[engraftment arrhythmia, AE] 감소를 위한 변형

[1400] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 대상에게 생착될 때 생착 부정맥[EA]을 감소시키거나 방지하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 대상에게 생착될 때 EA를 감소시키거나 방지하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 집합체의 세포 집단은 대상에게 생착될 때 EA를 감소시키거나 방지하는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[1401] 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 (i) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키고/시키거나, (ii) 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 심근 세포 집단에 비해, 하나 이상의 주조직적합성 복합체[MHC] 클래스 I 분자 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[1402] 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 (a) CACNA1G, HCN4, 및 SLC8A1 중 하나 이상의 발현을 감소시키고/시키거나, (b) KCNJ2, TRDN, SRL, HRC, 및 CASQ2 중 하나 이상의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[1403] 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 (a) CACNA1H, HCN4, 및 SLC8A1 중 하나 이상의 발현을 감소시키고/시키거나, (b) KCNJ2, TRDN, SRL, HRC, 및 CASQ2 중 하나 이상의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[1404] 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형은 (a) CACNA1H, HCN4, 및 SLC8A1의 발현을 감소시키고, (b) KCNJ2의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[1405] 발현을 변경하기 위해 세포 내로 변형을 도입하기 위한 예시적인 방법이 알려져 있고 또한 본원에 기재된다. 예를 들어, 유전자 또는 단백질의 과발현 또는 발현을 증가시키기 위한 임의의 다양한 방법이, 예컨대 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드(즉, 이식유전자)의 도입 또는 전달, 또는 유전자를 표적화하는 DNA-표적화 도메인 및 전사 활성자의 융합 단백질의 전달의 도입에 의해 사용될 수 있다. 또한, 억제 핵산(예를 들어, RNAi)의 도입 또는 전달에 의한 것과 같은 비-유전자 편집 방법 또는 표적화된 핵산분해효소 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas)의 도입 또는 전달을 수반하는 유전자 편집 방법을 포함하는, 유전자 또는 단백질의 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 임의의 다양한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 방법은 핵산분해효소-기반 유전자 편집 기술을 통한 것이다.

[1406] 일부 구현예에서, 희귀-절단 핵산내부분해효소(예를 들어, CRISPR/Cas, TALEN, 아연 집게 핵산분해효소, 메가핵산분해효소 및 귀소 핵산내부분해효소 시스템)을 활용하는 유전체 편집 기술은 또한 인간 세포에서 (예를 들어, 중요한 면역 유전자의 유전체 DNA를 결실시킴으로써) 면역 유전자를 포함한, 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 유전체 편집 기술은 틈내기효소, 염기 편집, 프라임 편집, 및 유전자 기록의 사용을 포함한다.

[1407] 특정 구현예에서, 유전체 편집 기술 또는 기타 유전자 조절 기술을 사용하여: KCNJ2, TRDN, SRL, HRC, 및 CASQ2 유전자 중 하나 이상을 삽입하고, CACNA1G, CACNA1H, HCN4, 및 SLC8A1 유전자 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 제거하고, 또는 이의 임의의 조합으로, 이에 따라 조작된 세포, 예를 들어 대상에서의 생착 후 EA를 감소시키거나 제거할 수 있는, 심근 세포의 조작된 집단을 생산한다.

[1408] 따라서, 본원에 제공된 세포, 예를 들어 심근 세포 집단, 또는 해리된 세포 집단, 또는 제2 집합체 내의 세포 집단은, 일부 구현예에서, CACNA1G, CACNA1H, HCN4, 및 SLC8A1 중 하나 이상의 조절된 발현(예를 들어, 감소 또는 제거된 발현), 및/또는 KCNJ2, TRDN, SRL, HRC, 및 CASQ2 중 하나 이상의 조절된 발현(예를 들어, 증가된 발현 또는 과발현)을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포, 예를 들어 심근 세포 집단, 또는 해리된 세포 집단, 또는 제2 집합체 내의 세포 집단은 CACNA1G, HCN4, 및 SLC8A1의 조절된 발현(예를 들어, 감소되거나 제거된 발현), 및 KCNJ2의 조절된 발현(예를 들어, 증가된 발현 또는 과발현)을 나타낸다.

[1409] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포, 예를 들어 심근 세포 집단, 또는 해리된 세포 집단, 또는 제2 집합체 내의 세포 집단은 대상에서 생착 후 생착 부정맥을 유발하지 않는다.

[1410] 관심 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위한 방법이 알려져 있다. 표적 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키기 위한 임의의 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 표적 폴리뉴클레오티드의 발현의 영구적 제거 또는 감소를 초래한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 또는 유전자는, 예컨대 표적화 핵산내부분해효소를 사용하여, 표적 폴리뉴클레오티드에서 DNA 파손을 도입함으로써 파괴된다. 다른 구현예에서, 변형(예를 들어, 유전자 변형)은 표적 폴리뉴클레오티드의 발현에서의 일시적인 감소를 초래한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 유전자 억제는 예를 들어, RNA 간섭[RNAi], 짧은 간섭 RNA[siRNA], 짧은 헤어핀[shRNA] 및/또는 리보자임에 의한 것과 같은 안티센스 기술을 사용하여, 유전자의 발현을 선택적으로 저해하거나 억제하기 위해 표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 억제 핵산을 사용하여 달성된다.

[1411] 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 인간 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 포유동물 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 서열은 척추동물 유전체 서열이다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 유전자에서 전형적으로 표적화된 방식으로 하나 이상의 이중 가닥 파손 및/또는 하나 이상의 단일 가닥 파손의 유도에 의해 실시된다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손은 핵산분해효소, 예를 들어 유전자 표적화된 핵산분해효소와 같은 핵산내부분해효소에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, 표적화된 핵산분해효소는, 유전자 서열 또는 이의 일부를 표적화하도록 특별히 설계된, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자-유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 및 RNA-안내 핵산분해효소, 예컨대 CRISPR-연관 핵산분해효소[Cas]에서 선택된다. 일부 구현예에서, 표적화된 핵산분해효소는 DNA 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 생성하고, 그 후 오류 경향 비-상동성 단부 접합[NHEJ]을 통해, 또는 일부 경우에서, 주형이 사용되는 정확한 상동성 유도 복구[HDR]을 통해 복구를 진행한다. 일부 구현예에서, 표적화된 핵산분해효소는 DNA 이중 가닥 파손[DSB]을 생성한다. 일부 구현예에서, 파손을 생산 및 복구하는 과정은 전형적으로 오류 경향이 있으며, NHEJ 복구 유래의 DNA 염기의 삽입 및 결실[인델]을 초래한다. 일부 구현예에서, 유전자 변형은 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열의 결실, 삽입 또는 돌연변이를 유도할 수 있다. 일부 경우에서, 유전자 변형은 미성숙 정지 코돈을 초래할 수 있는, 해독틀이동 돌연변이를 초래할 수 있다. 핵산분해효소-매개된 유전자 편집의 예에서, 표적화된 편집은 유전자의 양쪽 대립유전자 모두에서 발생하여, 유전자의 이중대립유전자 파괴 또는 편집을 초래한다. 일부 구현예에서, 유전자 중 모든 대립유전자는 유전자 편집에 의해 표적이 된다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas를 이용하는 것과 같은, 표적화된 핵산분해효소를 이용한 유전자 변형은 유전자의 완전한 녹아웃을 일으킨다.

[1412] 수확 및 동결보존

[1413] 일부 구현예에서, 상기 방법은 심근 세포 집단을 수확하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 해리된 세포 집단을 수확하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 제2 집합체를 수확하는 단계를 더 포함한다.

[1414] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 임의의 적합한 시간에, 예를 들어, 제3 인큐베이션 동안 또는 그 이후에 임의의 적합한 시간에 수확된다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 하나 이상의 심근 세포 마커의 빈도를 기준으로 수확된다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 역치 초과인 하나 이상의 심근 세포 마커의 빈도를 포함하는 기준에 근거하여 수확된다. 일부 구현예에서, 역치는 85%, 96%, 97%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 초과이다.

[1415] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 20, 21, 22, 23, 또는 24일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 21, 22, 또는 23일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단은 22일 또는 약 22일에 수확된다.

[1416] 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 2, 3, 4, 5 또는 6일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 3, 4, 또는 5일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 4 또는 5일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단은 4일 또는 약 4일에 수확된다.

[1417] 일부 구현예에서, 제2 집합체는 제3 내지 22일 중 어느 하나 또는 약 이 시점에 수확된다. 일부 구현예에서, 제2 집합체는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15일 중 어느 하나 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 제2 집합체는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일 중 어느 하나 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 제2 집합체는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 또는 약 이 시점에서 수확된다. 일부 구현예에서, 제2 집합체는 5, 6, 또는 7일 또는 약 이 시점에서 수확된다.

[1418] 수확, 예를 들어 심근 세포 집단, 해리된 세포 집단, 및/또는 제2 집합체의 수확은 임의의 적합한 방법, 예컨대 임의의 알려진 방법, 예를 들어 문헌 [Fujiwara et al., PLoS One. (2001) 6(2):e16734; Dambrot et al., Biochem J. (2011) 434(1):25-35; Foldes et al., J Mol Cell Cardiol. (2011) 50(2):367-76; Wang et al., Sci China Life Sci. (2010) 53(5):581-9; Chen et al., J Cell Biochem. (2010) (1):29-39; Yang et al., Nature (2008) 453:524-28; Kattman et al., Cell Stem Cell (2011) 8:228-40; Laflamme et al., Nat. Biotechnol. (2007) 25: 1015-24; Paige et al., PLoS One (2010) 5(6): e11134; Xu et al., Regen Med (2011) 6(1):53-66; Mignone et al., Circ J (2010) 74(12):2517-26; Takei et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol. (2009) 296(6):H1793-803, 제WO2013013206호, 및 제WO2013056072호]에 기재되거나 사용된 임의의 방

법을 비롯한 임의의 적합한 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[1419] 일부 구현예에서, 심근 세포 집단의 수확은 심근 세포 집단을 펠렛으로 원심분리하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 심근 세포 집단의 수확은 하나 이상의 세척 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 수확된 심근 세포 집단을 동결보존하는 단계를 더 포함한다.

[1420] 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단의 수확은 해리된 세포 집단을 펠렛으로 원심분리하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 해리된 세포 집단의 수확은 하나 이상의 세척 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 해리된 세포의 수확된 집단을 동결보존하는 단계를 더 포함한다.

[1421] 일부 구현예에서, 제2 집합체를 수확하는 단계는 제2 집합체를 펠렛으로 원심분리하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 집합체의 수확 단계는 하나 이상의 세척 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 수확된 제2 집합체를 동결보존하는 단계를 더 포함한다.

[1422] 동결보존은 임의의 알려진 방법을 포함하는 임의의 적합한 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[1423] 심근 세포를 사용함으로써, 다양한 심장 질환이나 병태와 싸우기 위한 대규모의 효과적인 세포 기반 치료법이 생성될 수 있다.

[1424] 유전체-편집된 심근 세포가(예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2022187379A1호에 기재된 바와 같이) 대상의 질환을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다. 방법은 대상에게 본원에 기재된 또는 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 유전체-편집된 심근 세포를 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 질환은 예를 들어 심장 질환 또는 심장 병태를 포함할 수 있다.

[1425] 유전체-편집된 심근 세포는 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료법과 조합하여 대상에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 유전체-편집된 심근 세포는 활성제 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물과 조합되어 및/또는 세포 치료법과 조합되어 대상에게 투여될 수 있다. 심근 세포는, 원하는 효과를 생성하기에 효과적인 양으로 환자, 바람직하게는 포유동물 및 더욱 바람직하게는 인간에게 투여될 수 있다. 심근 세포는, 예를 들어 정맥내, 종양내, 동맥내, 경피적으로, 카테테르 또는 스텐트에 의한 국소 전달, 종양내 주사를 위한 바늘 또는 기타 장치를 통한 것을 포함하는 각종 경로로 투여될 수 있다. 심근 세포는 한번 또는 여러번 투여될 수 있다. 당업계에서 통상의 기술을 가진 의사라면, 적용되는 심근 세포 및 임의로 필요한 약학 조성물의 유효량 및 용량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[1426] 심장 질환 또는 심장 병태는, 예를 들어, 소아 심근병증, 연령-관련 심근병증, 확장성 심근병증, 비대성 심근병증, 제한성 심근병증, 만성 허혈성 심근병증, 산후 심근병증, 염증성 심근병증, 기타 심근병증, 심근염, 심근경색, 심근 허혈성 재관류 손상, 심실 기능 장애, 심부전, 울혈성 심부전, 관상 동맥 질환, 말기 심장 질환, 죽상동맥경화증, 허혈, 고혈압, 재협착, 협심증, 류마티스성 심장, 동맥 염증, 또는 심혈관 질환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 심장 질환 또는 병태는 심근 경색[myocardial infarction, MI]이다. 임의의 제공된 구현예에서, 심근 세포 세포 치료법을 투여받은 대상은 심장 병태 또는 질환과 같은, 병태 또는 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 심장 병태 또는 질환은 소아 심근병증, 연령-관련 심근병증, 확장성 심근병증, 비후성 심근병증, 제한성 심근병증, 만성 허혈성 심근병증, 산후 심근병증, 염증성 심근병증, 기타 심근병증, 심근염, 심근경색[MI], 심근 허혈성 재관류 손상, 심실 기능 장애, 심부전, 울혈성 심부전, 관상동맥 질환, 말기 심장 질환, 죽상동맥경화증, 허혈, 고혈압, 재협착, 협심증, 류마티스성 심장, 동맥 염증 또는 심혈관 질환 또는 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 심장 병태 또는 질환은 심근 경색[MI]이다. 따라서, 일부 구현예에서, 심근 세포 치료법은 MI를 치료하기 위해(예를 들어, 심근 세포를 포함하는 조성물로서) 대상에게 투여된다.

[1427] h. 신경 세포

[1428] 세포 치료제에 사용되는 신경 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1429] 세포 치료제에 사용되는 신경세포는 일차 신경세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 신경 세포상에서 수행될 수 있다.

[1430] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 신경 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 신경세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법

은 신경 세포를 형성하도록 분화될 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 신경 세포상에서 수행될 수 있다.

[1431] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 신경 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 신경 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 신경 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 신경 세포는 세포 치료제의 제조의 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1432] 본원에 기재된 신경 세포는 대상에서 질환을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[1433] 본원은 수용자 대상으로의 후속 이식 또는 생착에 유용한, 기재된 바와 같은 조작된 만능 세포[예를 들어, iPSC]에서 분화된 상이한 신경 세포 유형을 제공한다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 예시적인 신경 세포 유형은 대뇌 내피 세포, 신경세포(예를 들어, 도파민성 신경세포), 신경아교 세포 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1434] 일부 구현예에서, 유도 만능 줄기 세포의 분화는 특정 세포 계통(들)을 생성하는 것으로 알려진 특정 인자에 세포를 노출시키거나 접촉시켜 특정의 원하는 계통 및/또는 관심의 세포 유형으로의 분화를 표적화함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 말단 분화된 세포는 특수화된 표현형 특징 또는 특성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 줄기 세포는 신경외배엽, 신경세포, 신경내분비, 도파민성, 콜린성, 세로토닌성(5-HT), 글루타메이트성, GABA성, 아드레날린성, 노르아드레날린성, 교감 신경, 부교감 신경, 교감 말초 신경 또는 신경아교 세포 집단으로 분화된다. 일부 경우에서, 신경아교 세포 집단은 미세아교(예를 들어, 아메바형[amoeboid], 분지형, 활성화된 식세포 및 활성화된 비-식세포) 세포 집단 또는 거대아교(중추 신경계 세포: 별아교세포, 희돌기아교세포, 뇌실막 세포, 및 방사상 신경아교, 및 말초 신경계 세포: 슈반(Schwann) 세포 및 위성 세포) 세포 집단, 또는 임의의 선행 세포의 전구물질 및 전구체를 포함한다.

[1435] 상이한 유형의 신경 세포를 생성하기 위한 프로토콜은 PCT 출원 번호 제WO2010144696호, 미국 특허 제9,057,053호, 제9,376,664호, 및 제10,233,422호에 기재되어 있다. 저면역원성 만능 세포를 분화하는 방법에 대한 추가 설명은 예를 들어, 문헌[Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 및 Han et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446]에서 찾을 수 있다. 신경 장애 또는 병태의 동물 모델에서 신경 세포 이식의 효과를 결정하는 방법은 다음 참조 문헌에 설명되어 있다: 척수 손상의 경우 - 문헌[Curtis et al., Cell Stem Cell, 2018, 22, 941-950], 파킨슨병의 경우 - 문헌[Kikuchi et al., Nature, 2017, 548:592-596], ALS의 경우 - 문헌[Izrael et al., Stem Cell Research, 2018, 9(1):152 and Izrael et al., IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72862], 간질의 경우 - 문헌[Upadhya et al., PNAS, 2019, 116(1):287-296].

[1436] 일부 구현예에서, 조작된 신경 세포 집단, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래된 iPSC에서 분화된 신경 세포는 투여 전에, 배양 내에 유지되고, 일부 경우 확장된다. 특정 구현예에서, 신경 세포 집단은 투여 전에 동결보존된다.

[1437] 일부 구현예에서, 본 기술은 조작된 신경 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래한 iPSC에서 분화된 신경 세포에 관한 것으로, 이는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원 분자)의 발현이 감소되거나 결여된다.

[1438] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 신경 세포는 면역 인식을 회피한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 신경 세포, 예컨대 하나 이상의 개별 공여자(예를 들어, 건강한 공여자)에서 유래된 iPSC에서 분화된 신경 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 질환의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에게 본원에 기재된 조작된 신경 세포 집단을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1439] 일부 구현예에서, 신경 세포는 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 기타 신경퇴행성 질환 또는 병태, 주의력 결핍 과잉행동 장애[ADHD], 투렛 증후군[TS], 정신분열증, 정신병, 우울증, 기타 신경정신 장애를 치료하기 위

해 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경 세포는 뇌졸중을 치료하거나 개선하기 위해 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경세포 및 신경아교 세포는 근위축성 측삭 경화증[amyotrophic lateral sclerosis, ALS]을 갖는 대상에게 투여된다.

[1440] 1) 대뇌 내피 세포

[1441] 세포 치료제에 사용되는 대뇌 내피 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1442] 세포치료제에 사용되는 대뇌 내피 세포는 일차 대뇌 내피 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대한 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 대뇌 내피 세포상에서 수행될 수 있다.

[1443] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포치료제에 사용되는 대뇌 내피 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 대뇌 내피 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 대뇌 내피 세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 대뇌 내피 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1444] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 내피 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 내피 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 내피 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 뇌 내피 세포는 세포 치료제 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1445] 일부 구현예에서, 대뇌 내피 세포[EC], 이의 전구물질 및 전구체는 대뇌 EC 또는 신경 세포의 생성을 촉진하는 하나 이상의 인자를 포함하는 배지에서 세포를 배양함으로써 표면 상의 만능 줄기 세포(예를 들어, 유도 만능 줄기 세포)에서 분화된다. 일부 경우에서, 배지는 CHIR-99021, VEGF, 염기성 FGF(bFGF), 및 Y-27632 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 신경 세포의 생존 및 기능성을 촉진하도록 설계된 보충제를 포함한다.

[1446] 일부 구현예에서, 대뇌 내피 세포[EC], 전구물질, 및 이의 전구체는 조건화된 또는 조건화되지 않은 배지에서 세포를 배양하므로써 표면상에서 만능 줄기 세포에서 분화된다. 일부 경우에서, 배지는 분화를 촉진하거나 용이하게 하는 인자 또는 소분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 배지는 VEGR, FGF, SDF-1, CHIR-99021, Y-27632, SB 431542, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 인자 또는 소분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 분화를 위한 표면은 하나 이상의 세포외 기질 단백질을 포함한다. 표면은 하나 이상의 세포외 기질 단백질로 코팅될 수 있다. 세포는 현탁액에서 분화될 수 있고, 이어서, 세포 생존을 용이하게 하기 위해 겔 매트릭스 형태, 예컨대, 매트리겔, 젤라틴 또는 피브린/트롬빈 형태 내로 들어갈 수 있다. 일부 경우에서, 분화는 일반적으로 세포-특이적 마커의 존재를 평가함으로써 당업계에 공지된 바와 같이 분석된다.

[1447] 일부 구현예에서, 대뇌 내피 세포는 CD31, VE 카드헤린, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 인자를 발현하거나 분비한다. 특정 구현예에서, 대뇌 내피 세포는 CD31, CD34, CD45, CD117(c-키트), CD146, CXCR4, VEGF, SDF-1, PDGF, GLUT-1, PECAM-1, eNOS, 클라우딘-5, 오클루딘, ZO-1, p-당단백질, 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자, VE-카드헤린, 저밀도 지질단백질 수용체 LDLR, 저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1 LRP1, 인슐린 수용체 INSR, 렙틴 수용체 LEPR, 기저 세포 접착 분자 BCAM, 트랜스페린 수용체 TFRC, 고급 당화 최종산물-특이적 수용체 AGER, 레티놀 흡수를 위한 수용체 STRA6, 큰 중성 아미노산 수송체 작은 소단위 1 SLC7A5, 흥분성 아미노산 수송체 3 SLC1A1, 나트륨 연결 중성 아미노산 수송체 5 SLC38A5, 용질 운반체 16족 1원 SLC16A1, ATP-의존적 자리옮김효소 ABCB1, ATP-ABCC2-결합 카세트 수송체 ABCG2, 다중약물 저항성-연관된 단백질 1 ABCC1, 소관 다중특이적 유기 음이온 수송체 1 ABCC2, 다중약물 저항성-연관된 단백질 4 ABCC4 및 다중약물 저항성-연관된 단백질 5 ABCC5로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 인자를 발현하거나 분비한다.

[1448] 일부 구현예에서, 대뇌 EC는 긴밀한 접합의 높은 발현, 높은 전기 저항, 적은 천공, 작은 혈관주위 공간, 인슐린 및 트랜스페린 수용체의 높은 우세, 및 많은 수의 미토콘드리아로 이루어진 군에서 선택된 특징들 중 하나 이상을 특징으로 한다.

[1449] 일부 구현예에서, 대뇌 EC는 양성 선발 전략을 사용하여 선발 또는 정제된다. 일부 경우에서, 대뇌 EC는 CD31과 같지만 이에 제한되지 않는 내피 세포 마커에 대해 분류된다. 즉, CD31 양성 대뇌 EC가 단리된다. 일부 구현예에서, 대뇌 EC는 양성 선택 전략을 사용하여 선택되거나 정제된다. 일부 구현예에서, 분화되지 않은 또는 만능 줄기 세포는 TRA-1-60 및 SSEA-1을 포함하지만 이에 제한되지 않는 만능 마커를 발현하는 세포를 선택함으로써 제거된다.

[1450] 일부 구현예에서, 뇌 내피 세포는 뇌 출혈의 증상 또는 효과를 완화시키기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 도파민성 신경세포는 파킨슨병 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 노르아드레날린성 신경세포, GABA성 사이신경세포는 간질 발작을 경험한 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 운동 신경세포, 사이신경세포, 슈반 세포, 희돌기아교세포, 및 미세아교세포는 척수 손상을 경험한 환자에게 투여된다.

[1451] 2) 도파민성 신경세포

[1452] 세포 치료제에 사용되는 도파민성 신경세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1453] 세포치료제에 사용되는 도파민성 신경세포는 일차 도파민성 신경세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 도파민성 신경세포상에서 수행될 수 있다.

[1454] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 도파민성 신경세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 도파민성 신경세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 도파민성 신경세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 도파민성 신경세포상에서 수행될 수도 있다.

[1455] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 도파민성 신경세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 도파민성 신경세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 도파민성 신경세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 도파민성 신경세포는 세포 치료제의 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1456] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 HIP 세포는 신경세포 줄기 세포, 신경세포 전구세포, 미성숙 도파민성 신경세포 및 성숙한 도파민성 신경세포를 포함하는 도파민성 신경세포로 분화된다.

[1457] 일부 경우에서, 용어 '도파민성 신경세포'는 도파민 합성을 위한 속도-제한 효소인 티로신 수산화효소[tyrosine hydroxylase, TH]를 발현하는 신경세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 도파민성 신경세포는 신경전달물질 도파민을 분비하고, 도파민 수산화효소의 발현이 거의 또는 전혀 없다. 도파민성[dopaminergic, DA] 신경세포는 다음 마커들, 즉 신경세포-특이적 에놀라제[neuron-specific enolase, NSE], 1-방향족 아미노산 탈카르복실화효소, 소포성 모노아민 수송체 2, 도파민 수송체, Nurr-1, 및 도파민-2 수용체[D2 수용체] 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 특정 경우에, 용어 '신경 줄기 세포'는 신경 세포 경로를 따라 부분적으로 분화되고, 예를 들어 네스틴을 비롯한 하나 이상의 신경 마커를 발현하는 만능 세포 집단을 포함한다. 신경 줄기 세포는 신경 세포 또는 아교 세포(예를 들어, 별아교세포 및 희소돌기아교세포)로 분화될 수 있다. 용어 '신경 전구세포'는 FOXA2 및 낮은 수준의 b-튜불린을 발현하지만, 티로신 수산화효소는 발현하지 않는 배양된 세포를 포함한다. 이러한 신경 전구세포는 본원에 기재된 것과 같은 적절한 인자를 배양할 때 다양한 도파민성 신경 하위유형, 예를 들어 특히 다양한 도파민성 신경세포 하위유형으로 분화하는 능력을 갖는다.

[1458] 일부 구현예에서, HIP 세포에서 유래한 DA 신경세포는 신경퇴행성 질환 또는 병태를 치료하기 위해 환자, 예를 들어 인간 환자에게 투여된다. 일부 경우에서, 신경퇴행성 질환 또는 병태는 파킨슨병, 헌팅턴병, 및 다발성 경화증으로 이루어진 군에서 선택된다. 다른 구현예에서, DA 신경세포는 신경정신 장애, 예컨대 주의력 결핍 과잉행동 장애[ADHD], 뚜렛 증후군[TS], 정신분열증, 정신병 및 우울증의 하나 이상의 증상을 치료 또는 개선하기 위해 사용된다. 또 다른 구현예에서, DA 신경세포는 손상된 DA 신경세포를 갖는 환자를 치료하는 데 사용된다.

[1459] 일부 구현예에서, DA 신경세포, 전구체 및 이의 전구세포는 하나 이상의 인자 또는 첨가제를 포함하는 배지에서

줄기 세포를 배양함으로써 만능 줄기 세포에서 분화된다. DA 신경세포의 분화, 성장, 확장, 유지 및/또는 성숙을 촉진하는 유용한 인자 및 첨가제는 Wnt1, FGF2, FGF8, FGF8a, 소닉 헤지호그[sonic hedgehog, SHH], 뇌 유래된 신경영양 인자[brain derived neurotrophic factor, BDNF], 전환 성장 인자 a[TGF-a], TGF-b, 인터루킨 1 베타, 아교 세포주-유래된 신경영양 인자[glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF], GSK-3 억제제(예를 들어, CHIR-99021), TGF-b 억제제(예를 들어, SB-431542), B-27 보충물질, 도르소모르핀, 푸르모르파민, 노긴(noggin), 레티노산, cAMP, 아스코르브산, 뉴르투린, 녹아웃 혈청 대체물질, N-아세틸 시스테인, c-키트 리간드, 이의 변형된 형태, 이의 모방체, 이의 유사체, 및 이의 변이체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, DA 신경세포는 WNT 경로, NOTCH 경로, SHH 경로, BMP 경로, FGF 경로, 등을 활성화 또는 억제하는 하나 이상의 인자들의 존재하에 분화된다. 분화 프로토콜 및 이의 상세한 설명은 예를 들어, 제US9,968,637호, 제US7,674,620호, 문헌[Kim et al, Nature, 2002, 418,50-56; Bjorklund et al, PNAS, 2002, 99(4), 2344-2349; Grow et al., Stem Cells Transl Med. 2016, 5(9): 1133-44, 및 Cho et al, PNAS, 2008, 105:3392- 3397]에 제공되며, 실시예, 방법, 도 및 결과의 상세한 설명을 포함하는 개시 내용 전체는 본원에 참조로 포함된다.

[1460] 일부 구현예에서, 저면역원성 도파민성 신경세포 집단은 비-뉴런 세포로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 단리된 저면역원성 도파민성 신경세포 집단은 투여 전에 확장된다. 특정 구현예에서, 저면역원성 도파민성 신경세포의 단리된 집단은 투여 전에 확장되고 동결보존된다.

[1461] DA 분화를 특성화 및 모니터링하고 DA 표현형을 평가하기 위해, 임의의 수의 분자 및 유전자 마커의 발현이 평가될 수 있다. 예를 들어, 유전자 마커의 존재는 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 분자 마커의 발현은 qPCR-기반 분석, 면역분석, 면역세포화학 분석, 면역블롯팅 분석, 등과 같지만 이에 제한되지 않는 정량화 방법에 의해 결정될 수 있다. DA 신경세포에 대한 예시적인 마커는 TH, b-튜불린, 페어드 박스(paired box) 단백질(Pax6), 인슐린 유전자 인핸서 단백질[insulin gene enhancer protein, Isl1], 네스틴, 디아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB), G 단백질-활성화 내부 정류기 칼륨 채널 2[G protein-activated inward rectifier potassium channel 2, GIRK2], 미세소관-연관 단백질 2[microtubule-associated protein 2, MAP-2], NURR1, 도파민 수송체[dopamine transporter, DAT], 포크헤드 박스 단백질 A2[forkhead box protein A2, FOXA2], FOX3, 더블코르틴(doublecortin), 및 LIM 호메오박스 전사 인자 1-베타[LIM homeobox transcription factor 1-beta, LMX1B], 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, DA 신경세포는 코린, FOXA2, TuJ1, NURR1, 및 이들의 임의의 조합에서 선택된 마커 중 하나 이상을 발현한다.

[1462] 일부 구현예에서, DA 신경세포는 세포 전기생리학적 활성에 따라 평가된다. 세포의 전기생리학은 당업자에게 알려진 분석을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 전체세포 및 천공된 패치 클램프(patch clamp), 세포의 전기생리학적 활성을 검출하기 위한 분석, 세포의 활동 전위의 크기 및 지속기간을 측정하기 위한 분석, 및 DA 세포의 도파민 생성을 검출하기 위한 분석이 있음.

[1463] 일부 구현예에서, DA 신경세포 분화는 자발적인 리듬 활동 전위, 및 탈분극 전류의 주입시 스파이크 주파수 적응을 갖는 고주파 활동 전위를 특징으로 한다. 다른 구현예에서, DA 분화는 도파민의 생성을 특징으로 한다. 생성된 도파민 수준은 활동 전위가 최대 진폭(스파이크 반-최대 폭)의 절반에 도달한 지점에서 활동 전위의 폭을 측정하여 계산된다.

[1464] 일부 구현예에서, 분화된 DA 신경세포는 정맥내로 또는 환자의 특정 위치에의 주입에 의해 이식된다. 일부 구현예에서, 분화된 DA 세포는, 그의 변성이 파킨슨병을 초래한 DA 신경세포를 대체하기 위해 뇌의 (특히, 치밀[compact] 영역 내 또는 이에 인접한) 흑질, 복부 피개부 영역[ventral tegmental area, VTA], 미상[caudate], 피각[putamen], 중격핵[nucleus accumbens], 시상 하부 핵, 또는 이들의 임의의 조합 내로 이식된다. 분화된 DA 세포는 세포 현탁액으로서 표적 영역 내로 주입될 수 있다. 대안적으로, 분화된 DA 세포는 이러한 전달 장치에 포함될 때 지지 매트릭스 또는 뼈대에 매립될 수 있다. 일부 구현예에서, 뼈대는 생분해성이다. 다른 구현예에서, 뼈대는 생분해성이 아니다. 뼈대는 천연 또는 합성(인공) 재료를 포함할 수 있다.

[1465] DA 신경세포의 전달은 리포좀, 미세입자, 또는 미세캡슐과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 적합한 비히클을 사용함으로써 달성될 수 있다. 다른 구현예에서, 분화된 DA 신경세포는 등장성 부형제를 포함하는 약학 조성물로 투여된다. 약학 조성물은 인간 투여를 위해 충분히 멸균된 조건 하에 제조된다. 일부 구현예에서, HIP 세포에서 분화된 DA 신경세포는 약학 조성물의 형태로 공급된다. 세포 조성물의 치료 제형의 일반 원리는 문헌[Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996, 및 Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. Ball, J. Lister & P.

Law, Churchill Livingstone, 2000]에서 찾아볼 수 있으며, 이 개시 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[1466] 줄기 세포에서 유래한 신경세포 및 그의 제조 방법에 대한 유용한 설명은, 예를 들어, 문헌[Kirkeby et al., Cell Rep, 2012, 1:703-714; Kriks et al., Nature, 2011, 480:547-551; Wang et al., Stem Cell Reports, 2018, 11(1):171-182; Lorenz Studer,"Chapter 8 - Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial" in Progress in Brain Research, 2017, volume 230, pg. 191-212; Liu et al., Nat Protoc, 2013, 8:1670-1679; Upadhya et al., Curr Protoc Stem Cell Biol, 38, 2D.7.1-2D.7.47, 미국 특허 출원 공보 제20160115448호, 및 제US8,252,586호, 제US8,273,570호, 제US9,487,752호 및 제US10,093,897호]에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1467] DA 신경세포에 추가하여, 다른 신경세포, 이의 전구물질 및 전구체는 하나 이상의 인자 또는 첨가제를 포함하는 배양 배지에서 세포를 배양함으로써 본원에 약술된 HIP 세포에서 분화될 수 있다. 인자 및 첨가제의 비제한적 예는 GDNF, BDNF, GM-CSF, B27, 염기성 FGF, 염기성 EGF, NGF, CNTF, SMAD 억제제, Wnt 길항제, SHH 신호전달 활성화제, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, SMAD 억제제는 SB431542, LDN-193189, 노긴 PD169316, SB203580, LY364947, A77-01, A-83-01, BMP4, GW788388, GW6604, SB-505124, 레르텔리무맙(lerdelimumab), 메텔리무맙, GC-I008, AP-12009, AP-110I4, LY550410, LY580276, LY364947, LY2109761, SB-505124, E-616452(RepSox ALK 억제제), SD-208, SMI6, NPC-30345, K 26894, SB-203580, SD-093, 액티빈-M108A, P144, 가용성 TBR2-Fc, DMH-1, 도르소모르핀 이염산염 및 이의 유도체로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, Wnt 길항제는 XAV939, DKK1, DKK-2, DKK-3, DKK-4, SFRP-1, SFRP-2, SFRP-3, SFRP-4, SFRP-5, WIF-1, 소기(Soggy), IWP-2, IWR1, ICG-001, KY0211, Wnt-059, LGK974, IWP-L6 및 이의 유도체들로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 활성자는 평활화 작용제[Smoothened agonist, SAG], SAG 유사체, SHH, C25-SHH, C24-SHH, 푸르모르파민, Hg-Ag 및/또는 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택된다.

[1468] 일부 구현예에서, 신경세포는 글루타메이트 이온트로픽(ionotropic) 수용체 NMDA 유형 소단위 1 GRIN1, 글루타메이트 탈카르복실화효소 1 GAD1, 감마-아미노부티르산 GABA, 티로신 수산화효소 TH, LIM 호메오박스 전사 인자 1-알파 LMX1A, 포크헤드 박스 단백질 O1 FOXO1, 포크헤드 박스 단백질 A2 FOXA2, 포크헤드 박스 단백질 O4 FOXO4, FOXG1, 2',3'-시클릭-뉴클레오티드 3'-포스포디에스테라제 CNP, 미엘린 염기성 단백질 MBP, 튜불린 베타 사슬 3 TUB3, 튜불린 베타 사슬 3 NEUN, 용질 운반체 1족 6원 SLC1A6, SST, PV, 칼빈딘, RAX, LHX6, LHX8, DLX1, DLX2, DLX5, DLX6, SOX6, MAFB, NPAS1, ASCL1, SIX6, OLIG2, NKX2.1, NKX2.2, NKX6.2, VGLUT1, MAP2, CTIP2, SATB2, TBR1, DLX2, ASCL1, ChAT, NGFI-B, c-포스(c-fos), CRF, RAX, POMC, 하이포크레틴, NADPH, NGF, Ach, VAChT, PAX6, EMX2p75, CORIN, TUJ1, NURR1 및/또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 마커 중 하나 이상을 발현한다.

[1469] 3) 신경아교 세포

[1470] 세포 치료제에 사용되는 신경아교 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1471] 세포 치료제에 사용되는 신경아교 세포는 일차 신경아교 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 신경아교 세포상에서 수행될 수 있다.

[1472] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 신경아교 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 신경아교 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 신경아교 세포를 형성하도록 분화될 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) 신경아교 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1473] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 신경아교 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 신경아교 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 신경아교 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 신경아교 세포는 세포 치료제의 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1474] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경 세포는 신경아교 세포 예컨대, 미세아교세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포, 뇌실막 세포 및 슈반 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 그의 신경아교 전구체, 및 신경아교 전구세포는 만능 줄기 세포를 치료 효과적인 신경아교 세포 등을 분화시킴으로써 생성된다. 저면역원성 만능 줄기 세포의 분화는 저면역원성 신경아교 세포와 같은 저면역원성 신경 세포를 생산한다.

[1475] 일부 구현예에서, 신경아교 세포, 이의 전구물질, 및 전구체는 레티노산, IL-34, M-CSF, FLT3 리간드, GM-CSF, CCL2, TGF베타 억제제, BMP 신호전달 억제제, SHH 신호전달 활성자, FGF, 혈소판 유래 성장 인자 PDGF, PDGFR-알파, HGF, IGF1, 노긴, SHH, 도르소모르핀, 노긴, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 작용제를 포함하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양함으로써 생성된다. 특정 예에서, BMP 신호전달 억제제는 LDN193189, SB431542, 또는 이들의 조합이다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 NKX2.2, PAX6, SOX10, 뇌 유래 신경영양 인자[BDNF], 뉴트로트로핀-3 NT-3, NT-4, EGF, 모양체 신경영양 인자[ciliary neurotrophic factor, CNTF], 신경 성장 인자[nerve growth factor, NGF], FGF8, EGFR, OLIG1, OLIG2, 미엘린 염기성 단백질[myelin basic protein, MBP], GAP-43, LNGFR, 네스틴, GFAP, CD11b, CD11c, CX3CR1, P2RY12, IBA-1, TMEM119, CD45, 및 이들의 임의의 조합을 발현한다. 예시적인 분화 배지는 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 신경아교 세포 유형의 생성을 용이하게 하거나 가능하게 할 수 있는 임의의 특정 인자 및/또는 소분자를 포함할 수 있다.

[1476] 시험관내 분화 프로토콜에 따라 생성된 세포가 아교세포 특징 및 특성을 나타내는지 여부를 결정하기 위해, 세포를 동물 모델에 이식할 수 있다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 면역손상된 마우스, 예를 들어, 면역손상된 떨림[shiverer] 마우스에 주사된다. 신경아교 세포는 마우스의 뇌에 투여되고, 미리 선택된 시간 후에 생착된 세포가 평가된다. 일부 경우에서, 뇌에 생착된 세포는 면역염색 및 영상화 방법을 사용하여 시각화된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 알려진 신경아교 세포 바이오마커를 발현하는 것으로 결정된다.

[1477] 줄기 세포로부터 신경아교 세포, 이의 전구물질, 및 전구체를 생성하기 위한 유용한 방법은 예를 들어, 제US7,579,188호, 제US7,595,194호, 제US8,263,402호, 제US8,206,699호, 제US8,252,586호, 제US9,193,951호, 제US9,862,925호, 제US8,227,247호, 제US9,709,553호, 제US2018/0187148호, 제US2017/0198255호, 제US2017/0183627호, 제US2017/0182097호, 제US2017/253856호, 제US2018/0236004호, 제WO2017/172976호, 및 제WO2018/093681호에서 찾을 수 있다. 만능 줄기 세포를 분화시키는 방법은, 예를 들어, 문헌[Kikuchi et al., Nature, 2017, 548, 592-596; Kriks et al., Nature, 2011, 547-551; Doi et al., Stem Cell Reports, 2014, 2, 337-50; Perrier et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101, 12543-12548; Chambers et al., Nat Biotechnol, 2009, 27, 275-280; 및 Kirkeby et al., Cell Reports, 2012, 1, 703-714]에 기재되어 있다.

[1478] 척수 손상에 대한 신경 세포 이식의 효능은 예를 들어, 문헌[McDonald, et al., Nat. Med., 1999, 5:1410) 및 Kim, et al., Nature, 2002, 418:50]에 의해 기재된 바와 같이, 급성으로 손상된 척수에 대한 래트 모델에서 평가될 수 있다. 예를 들어, 성공적인 이식은 2-5주 후 병변 내에 존재하고, 별아교세포, 희소돌기아교세포, 및/또는 신경세포로 분화되고, 병변 말단에서 척수를 따라 이동하고, 보행, 조정 및 체중 부하가 개선되는, 이식-유래 세포를 보일 수 있다. 특정 동물 모델은 신경 세포 유형 및 치료될 신경 질환 또는 병태에 기반하여 선택된다.

[1479] 신경 세포는 그들이 의도된 조직 부위에 이식되고 기능적으로 결핍된 영역을 재구성하거나 재생하도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 신경 세포는 치료되는 질병에 따라 중추신경계의 실질 또는 척수강 내 부위에 직접 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 뇌 내피 세포, 신경세포, 도파민성 신경세포, 뇌실막 세포, 별아교세포, 소교세포, 희소돌기아교세포 및 슈반 세포를 포함하는 본원에 기재된 임의의 신경 세포는 정맥내, 척수내, 뇌실내, 경막내, 동맥내, 근육내, 복강내, 피하, 근육내, 복강내, 안구내, 안구후방 및 이들의 조합의 방식으로 환자에게 주사된다. 일부 구현예에서, 세포는 볼러스 주사나 연속 주입의 형태로 주사되거나 침적된다. 특정 구현예에서, 신경 세포는 뇌, 적절한 뇌 및 이들의 조합으로 주입하여 투여된다. 주사는, 예를 들어, 대상의 두개골에 뚫린 구멍을 통해 이루어질 수 있다. 뇌에 대한 신경 세포의 투여에 적합한 부위는 뇌실, 측뇌실, 대뇌수조, 피각, 기저핵, 해마 피질, 전구체, 뇌의 미상 영역 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1480] 본 기술에 사용하기 위한 도파민성 신경세포를 포함하는 신경 세포에 대한 추가 설명은 제WO2020/018615호에서 찾아볼 수 있으며, 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1481] 본원에 개시된 세포는 아교세포일 수 있으며, 예를 들어 아교세포 집단일 수 있다. '세포', 예를 들어, 아래에서 '신경아교 세포'에 대한 임의의 지칭은, 본 출원에 기재된 바와 같은 '세포 집단' 예를 들어, '신경아교 세

포 집단'에도 적용되는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 신경아교 세포에 대한 관련 정보는 제WO2021195426호에서 찾을 수 있으며, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다. 본원에 기재된 신경아교 세포에 대한 구현예는 안전 스위치를 설명하는 구현예뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 HIP 세포, CAR 세포 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[1482] 신경 세포를 생성하는 분화 방법

[1483] 상이한 신경 세포 유형이, 유도 만능 줄기 세포를 포함하는 만능 줄기 세포에서 분화될 수 있다. 신경 세포 유형은 이를 필요로 하는 대상으로의 후속 이식 또는 생착에 유용하다. 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 분화 방법은 원하는 세포 유형에 따라 달라지며, 알려진 기술을 이용한다. 이러한 방법의 예는 제WO2021195426호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1484] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포, 예컨대 유도 만능 줄기 세포의 분화는 특정 세포 계통(들)을 생성하는 것으로 알려진 특정 인자에 세포를 노출시키거나 접촉시킴으로써 수행되어, 특정, 원하는 계통 및/또는 관심 세포 유형으로의 그들의 분화를 표적화한다. 일부 구현예에서, 말단 분화된 신경 세포는 전문화된 표현형 특징 또는 특성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 신경외배엽 세포, 신경세포 세포, 신경세포내분비 세포, 도파민성 신경세포, 콜린성 신경세포, 세로토닌성 신경세포, 글루타메이트성 신경세포, GABA성 신경세포, 아드레날린성, 노르아드레날린성 신경세포, 교감 신경세포, 부교감 신경세포, 교감 말초 신경세포, 신경아교 세포, 그의 전구체, 또는 그의 전구물질로 분화된다. 일부 경우에서, 신경아교 세포는 소교세포(예를 들어, 아메바형, 분기형, 활성화된 식세포, 및 활성화된 비-식세포) 세포 또는 거대아교 세포(중추신경계 세포: 별아교세포, 희소돌기아교세포, 뇌실막 세포, 및 방사형 아교, 및 말초 신경계 세포: 슈반 세포 및 위성 세포), 그의 전구물질, 및 이들 세포의 임의의 전구체를 포함한다.

[1485] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경 세포는 신경아교 세포 예컨대, 미세아교세포, 별아교세포, 희소돌기아교세포, 뇌실막 세포 및 슈반 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 그의 신경아교 전구물질, 및 신경아교 전구체는 만능 줄기 세포를 치료 효과적인 신경아교 세포 등을 분화시킴으로써 생성된다.

[1486] 신경 세포는 줄기 세포에서 유래할 수 있으며, 이는 그 후 신경계 장애 및 병태를 치료하는데 사용될 수 있다. 신경 세포 유형은 만능 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다른 비-신경 세포 유형으로부터 신경 세포 유형을 생산하는 방법을 사용한다. 이러한 세포를 수득하는 방법은, 예를 들어 제WO2021195426호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1487] 세포 치료법에 사용되는 경우 신경아교 세포의 일부 바람직한 특성을 본원에 기재한다.

[1488] 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 NKX2.2, PAX6, SOX1 0, 뇌 유래 신경영양 인자 BDNF, 뉴로트로핀-3 NT-3, NT-4, 표피 성장 인자 EGF, 모양체 신경영양 인자 CNTF, 신경 성장 인자 NGF, FGF8, EGFR, OLIG1, OLIG2, 미엘린 염기성 단백질 MBP, GAP-43, LNGFR, 네스틴, GFAP, CD11b, CD11c, CD105, CX3CR1, P2RY12, IBA-1, TMEM119, CD45, 및 이들의 임의의 조합을 발현한다. 예시적인 마커 중 임의의 것이 본원에 기재된 신경아교 세포를 특징화하는 데 사용될 수 있다. 신경아교 세포 분화를 모니터링하고 신경아교 세포의 표현형을 평가하기 위해, 신경아교 세포 및 그의 전구체에 특이적인 분자 및 유전적 마커의 임의의 수의 발현이 평가될 수 있다. 예를 들어, 유전자 마커의 존재는 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 분자 마커의 발현은 qPCR-기반 분석, RNA-seq 분석, 단백질체 분석, 면역분석, 면역세포화학 분석, 면역블롯팅 분석 등과 같지만, 이에 제한되지 않는 정량화 방법에 의해 결정될 수 있다.

[1489] 일부 구현예에서, 희소돌기아교세포, 별아교세포, 및 그의 전구세포를 포함하는 신경아교 세포는 A2B5, CD9, CD133, CD140a, FOXG1, GalC, GD3, GFAP, 네스틴, NG2, MBP, 무사시(Musashi), O4, Olig1, Olig2, PDGFaR, S100P, 글루타민 합성효소, 코넥신 43, 비멘틴, BLBP, GLAST 등으로부터 선택되는 마커들 중 하나 이상을 발현한다. 일부 구현예에서, 희소돌기아교세포, 별아교세포, 및 그의 전구체를 포함하는 신경아교 세포는 PSA-NCAM, CD9, CD1 1, CD32, CD36, CD105, CD140a, 네스틴, PDGFaR 등으로부터 선택되는 마커들 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 양성 선발 전략, 음성 선발 전략, 또는 둘 다를 사용하여 선발되거나 정제된다.

[1490] 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 면역세포화학 및 면역조직화학에 의해 결정된 형태에 따라 특징화된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 신경세포 공동 배양 분석, 지질다당류[lipopolysaccharide, LPS]를 사용한 자극 분석, 시험관내 미엘린화 분석, 칼슘 파동 진동 분석을 사용한 ATP 유입, 등과 같지만 이에 제한되지 않는 기능

적 특성화 분석에 따라 평가된다.

[1491] 일부 구현예에서, 신경아교 세포가 세포 특이적 특징 및 특성을 나타내는지 결정하기 위해, 세포가 동물 모델에 이식될 수 있다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 면역손상된 마우스, 예를 들어, 면역손상된 떨림 마우스에 주사된다. 신경아교 세포가 마우스의 뇌에 투여되고, 미리 선택된 시간 후에 생착된 세포가 평가된다. 일부 경우에서, 뇌에 생착된 세포는 면역염색 및 영상화 방법을 사용하여 시각화된다. 일부 구현예에서, 알려진 신경아교 세포 바이오마커의 발현은 생착된 세포에서 결정될 수 있다.

[1492] 상이한 유형의 신경 세포를 생성하기 위한 프로토콜은 PCT 출원 번호 제WO2010144696호, 미국 특허 제9,057,053호, 제9,376,664호, 및 제10,233,422호에 기재되어 있다. 저면역원성 만능 세포를 분화하는 방법에 대한 추가 설명은 예를 들어, 문헌[Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 및 Han et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441-10446]에서 찾을 수 있다.

[1493] 일부 구현예에서, 신경아교 세포, 이의 전구물질, 및 전구체는 레티노산, IL-34, M-CSF, FLT3 리간드, GM-CSF, CCL2, TGF베타 억제제, BMP 신호전달 억제제, SHH 신호전달 활성화제, FGF, 혈소판 유래 성장 인자 PDGF, PDGFR-알파, HGF, IGF-1, 노긴, 소닉 헤지호그(SHH), 도르소모르핀, 노긴, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 작용제를 포함하는 배양 배지에서 만능 줄기 세포를 배양함으로써 생성된다. 특정 경우에서, BMP 신호전달 억제제는 LDN193189, SB431542, 또는 이들의 조합이다. 예시적인 분화 배지는 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 신경아교 세포 유형의 생성을 촉진하거나 가능하게 할 수 있는 임의의 특정 인자 및/또는 소분자를 포함할 수 있다.

[1494] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포의 분화는 신경아교 세포 예컨대 소교세포(예컨대 아메바형, 분기형, 활성화된 식세포, 및 활성화된 비-식세포), 거대아교 세포(예컨대 별아교세포, 희소돌기아교세포, 뇌실막 세포, 방사형 아교, 슈반 세포 및 위성 세포, 그의 전구체, 및 그의 전구세포를 생성하는 것으로 알려진 특정 인자에 세포를 노출시키거나 접촉시킴으로써 수행된다. 줄기 세포로부터 신경아교 세포, 전구물질, 및 그의 전구체를 생성하는 유용한 방법은 예를 들어, 미국 특허 제7,579,188호, 제7,595,194호, 제8,263,402호, 제8,206,699호, 제8,227,247호, 제8,252,586호, 제9,193,951호, 제9,709,553호, 및 제9,862,925호, 및 미국 공개 출원 번호 제2018/0187148호, 제2017/0198255호, 제2017/0183627호, 제2017/0182097호, 제2017/253856호, 제2018/0236004호, 및 PCT 공개 출원 번호 제WO2017/172976호 및 제WO2018/093681호에서 찾아볼 수 있다.

[1495] 본원에 기재된 신경아교 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1496] 본원에 기재된 신경아교 세포는 다양한 신경계 장애 및 병태를 치료하는데 사용될 수 있다.

[1497] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 뇌졸중을 치료하거나 개선하기 위해 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 뇌졸중을 경험한 대상에게 투여된다.

[1498] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 근위축성 측삭 경화증[ALS]의 증상 또는 효과를 완화시키기 위해 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 ALS가 있는 대상에게 투여된다.

[1499] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 뇌출혈의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 뇌출혈을 경험한 대상에게 투여된다.

[1500] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 파킨슨병의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 파킨슨병을 경험한 대상에게 투여된다.

[1501] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 간질 발작의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 간질 발작을 경험한 환자에게 투여된다.

[1502] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 척수 손상의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 척수 손상을 경험한 환자에게 투여된다.

[1503] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 펠리제우스-메르츠바하(Pelizaeus-Merzbacher) 질환의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 펠리제우스-메르츠바하 질환을 경험한 대상에게 투여된다.

[1504] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 진행성 다발성 경화증의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 신경아교 세포는 진행성 다발성 경화증을 경험한 대상에게 투여된다.

[1505] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 신경아교 세포는 헌팅턴 질환의 증상 또는 효과를 완화시키기 위하여 대상에게 투여된다. 일부 구현예에서, 신경아교 세포는 헌팅턴병을 경험한 대상에게 투여된다.

[1506] i. 대식세포

[1507] 세포 치료제에 사용되는 대식세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1508] 세포 치료제에 사용되는 대식세포는 일차 대식세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) 대식세포상에서 수행될 수 있다.

[1509] 세포 치료제에 사용되는 대식세포는 만능줄기 세포[iPSC] 유래 대식세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 대식세포를 형성하도록 분화할 수 있는 줄기 세포 상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유도된(예를 들어, 유전체-편집된) 대식세포상에서 수행될 수도 있다.

[1510] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 대식세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 대식세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함하며, 예를 들어 제WO2017019848호에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로서 포함된다. 본원에 기재된 대식세포에 관한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자(예를 들어, CAR 이식유전자) 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 대식 세포는 세포 치료제의 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1511] 본원에 기재된 대식세포는 대상에서 질환을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[1512] 구현예에서 사용된 세포는 대식세포 또는 다른 식세포, 예를 들어 대식세포 집단일 수 있다. '세포', 예를 들어, 아래에서 '대식세포'에 대한 임의의 지칭은, 본 출원에 기재된 바와 같은 '세포 집단' 예를 들어, '대식세포 집단'에도 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[1513] 식세포, 예컨대 단핵구, 대식세포 및/또는 수지상 세포는(예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같이) 대상에게서 수득될 수 있다. 대상의 비제한적인 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 그의 형질전환 종을 포함한다. 바람직하게는, 대상은 인간이다. 세포는 말초혈 단핵세포, 골수, 림프절 조직, 비장 조직, 제대혈, 및 종양을 포함하는 다수의 공급원에게서 수득할 수 있다. 일부 구현예에서, 당 분야에서 이용가능한 수많은 단핵구, 대식세포, 수지상세포, 또는 전구체 세포주가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 당업자에게 알려진 수많은 기술, 예컨대 Ficoll 분리를 이용하여, 대상에서 수집된 혈액 단위에서 수득할 수 있다. 일부 구현예에서, 개체의 순환 혈액에서 유래한 세포는 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 수득된다. 성분채집술 생성물은 전형적으로, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구 세포, 적혈구 세포, 및 혈소판을 비롯한 림프구를 함유한다. 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 세포를 적절한 완충제 또는 매질, 예컨대 인산염 완충 식염수[PBS] 또는 세척 용액에 두기 위해 세척될 수 있고, 후속 가공 단계를 위해, 칼슘이 결핍되고 마그네슘이 결핍될 수 있거나, 모든 2가 양이온이 아닌 경우, 많은 양이온이 결핍될 수 있다. 세척한 후, 세포는 예를 들면, 무-Ca, 무-Mg PBS와 같은 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁될 수 있다. 대안으로, 성분채집술 시료의 바람직하지 않은 성분은 제거될 수 있고, 세포는 배양 배지에서 직접적으로 재현탁될 수 있다.

[1514] 일부 구현예에서, 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들어, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 림프구 및 적혈구 세포를 고갈시킴으로써 말초혈에서부터 단리된다. 대안적으로, 세포는 제대로부터 단리될 수 있다. 임의의 경우, 단핵구, 대식세포 및/또는 수지상 세포의 특정 아집단은 양성 또는 음성 선발 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다.

[1515] 일부 구현예에서, 세포 집단은 단핵구, 대식세포 또는 수지상 세포를 포함한다. 세포 집단의 예는 말초 혈액 단핵 세포, 제대혈 세포, 단핵구, 대식세포 또는 수지상 세포의 정제된 집단, 및 세포주를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 말초 혈액 단핵구는 단핵구, 대식세포 또는 수지상 세포 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 정제된 세포는 단핵구, 대식세포, 또는 수지상 세포 집단을 포함한다.

[1516] 세포 치료법에 사용될 때 대식세포의 원하는 특징 일부가 본원에 설명된다.

[1517] 일부 구현예에서, 세포는 상향 조절된 M1 마커 및 하향 조절된 M2 마커를 갖는다. 예를 들어, HLA DR, CD86, CD80 및 PDL1과 같은 적어도 하나의 M1 마커는 식세포 내에서 상향 조절된다. 또 다른 예에서, 적어도 하나의 M2 마커, 예컨대 CD206, CD163은 식세포 내에서 하향 조절된다(예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같음). 일부 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 상향 조절된 M1 마커 및 적어도 하나의 하향 조절된 M2 마커를 갖는다.

[1518] 일부 구현예에서, 식세포 내의 표적화된 효과기 활성은 CD47 또는 SIRPa 활성의 억제에 의해 향상된다. CD47 및/또는 SIRPa 활성은 식세포를 항-CD47 또는 항-SIRPa 항체로 처리함으로써 억제될 수 있다. 대안적으로, CD47 또는 SIRPa 활성은 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 억제될 수 있다.

[1519] 대식세포는 제WO2017019848A1호(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 하기 예시적인 방법에 따라 수득될 수 있다.

[1520] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 세포 배양: THP1, K562, SKOV3, SKBR3, HDLM2, MD468, 및 모든 세포주는 37C, 5%CO2에서 10% 우태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640에서 배양될 수 있다. THP1 mRFP+ 하위계통[subline](Wt)은 mRFP+ 세포주의 렌티바이러스 형질도입 및 FACS 정제에 의해 생성될 수 있다. THP1 mRFP+ 하위계통은 HP1 mRFP+ CAR19z+(CAR19z; CARMA19z), THP1 mRFP+ CAR19Az+(CAR19Az; CARMA19Az), THP1 mRFP+ MesoZ+ 및 THP1 mRFP+ CARHer2z+(CARHer2z; CARMAHer2z) 하위계통을 생성하는데 사용될 수 있다. 단핵구 분화는 배양 배지에서 Ing/mL 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트를 이용하여 48시간 동안 세포를 배양함으로써 유도될 수 있다.

[1521] 제WO2017019848A1호에 기재된 일차 인간 대식세포: 일차 인간 단핵구는 밀테니이(Miltenyi) CD14 마이크로비드(Miltenyi, 130-050-201)를 사용하여 정상 공여체 성분채집술 생성물로부터 정제할 수 있다. 단핵구는 7일 동안 MACS GMP 세포 분화 백 (밀테니이, 170-076-400)에서, 페니실린/스트렙토마이신, 글루타맥스 및 10ng/mL 재조합 인간 GM-CSF(PeproTech, 300-03)와 함께 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 배지 또는 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 1640에서 배양될 수 있다. 대식세포를 7일째에 수확하고 후속 사용을 위해 FBS+10% DMSO에서 동결보존할 수 있다.

[1522] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 식세포 작용 분석: Wt 또는 CARMA mRFP+ THP1 하위계통은 Ing/mL 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트로 48시간 동안 분화될 수 있다. GFP+ 항원 함유 종양 하위계통, 즉 K562 CD19+ GFP+ 세포는 PMA 세척 후 1:1 비로 분화된 THP1 대식세포에 첨가될 수 있다. 대식세포를 표적 종양 세포와 4시간 동안 공동 배양할 수 있고, 식세포 작용은 EVOS FL 자동 세포 영상화 시스템을 사용하여 형광 현미경에 의해 정량화하였다. 세 개의 시야의 평균이 n으로 간주될 수 있고, 모든 조건은 삼중으로 정량화될 수 있다. FACS 기반 식세포 작용은 BD LSR-Fortessa상에서 분석될 수 있다. FlowJo(Treestar, Inc.)는 유세포 분석 데이터를 분석하기 위해 사용될 수 있다. 관문이 있는 mRFP/GFP 이중 양성인 경우의 살아있는 단일체[singlets]는 식세포 작용으로 간주될 수 있다. CD47/SIRPa 축 차단은 지시된 농도에서 공동 배양의 개시에서 차단 단일클론 항체의 첨가를 통해 수행될 수 있다(마우스 항-인간 CD47 클론 B6H12, eBioscience #14-0479-82, 음성 대조군으로서의 마우스 항-인간 CD47 클론 2D3, eBioscience #14-0478-82, 마우스 항-인간 SIRPa 클론 SE5A5, BioLegend #323802). TLR 공동-자극은 공동 배양 시에 TLR1-9 효능제(인간 TLR 1-9 효능제 키트; Invivogen #tlrl-kitlhw)를 첨가함으로써 수행될 수 있다.

[1523] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 시험관내 사멸 분석: Wt 또는 CAR 함유 대식세포는 항원-함유 또는 대조군 방아벌레 녹색 발광효소[click-beetle green luciferase, CBG]/녹색 형광 단백질[green fluorescent protein, GFP] 양성 표적 종양 세포와 다양한 효과기 대 표적 비(30:1에서 시작하여 3배 희석기에서 감소함)로 공동 배양될 수 있다. IVIS 스펙트럼 영상화 시스템[Spectrum Imaging System](Perkin Elmer)을 사용하여, 종양 부담을 결정하기 위해 생물발광 영상화가 이용될 수 있다. %특이적 용해 = ((처리된 웰 - 종양 단독 웰)/(최대 사멸 - 종양 단독 웰)* 100).

[1524] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 시간 경과[Time-Lapse] 현미경: CAR 매개 식세포 작용의 형광 시간 경과 비디오 현미경은 EVOS FL 자동 세포 영상화 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 이미지는 18시간 동안 매 40초마다 캡처될 수 있다. 이미지 분석은 FIJI 이미징 소프트웨어로 수행하였다.

[1525] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 생산 및 형질감염: 키메라 항원 수용체 작제물은 GeneArt(Life Technologies)에 의해 신생[de novo] 합성되고, 이전에 기재된 바와 같이 렌티바이러스 벡터 내

로 복제된다. 농축된 렌티바이러스는 이전에 기재된 바와 같이 HEK293T 세포를 사용하여 생성될 수 있다.

[1526] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 아데노바이러스 생산 및 형질감염: GFP, CAR을 암호화하는 Ad5f35 키메라 아데노바이러스 벡터, 또는 CMV 프로모터하에 이식유전자가 없는 것은 표준 분자 생물학 절차에 따라 생산 및 적정될 수 있다. 일차 인간 대식세포는 다양한 다수의 감염으로 형질도입되고, EVOS FL 자동 세포 영상화 시스템을 사용하여 GFP 발현 및 생존력을 위해 연속적으로 영상화될 수 있다. CAR 발현은 His-태깅된[tagged] 항원 및 항-His-APC 이차 항체(R&D Biosystems Clone ADl .1.10)를 사용하여 표면 CAR 발현의 FACS 분석에 의해 평가될 수 있다.

[1527] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 유세포 분석: FACS는 BD LSR Fortessa상에서 수행될 수 있다. 표면 CAR 발현은 비오틴화 단백질 L(GenScript M00097) 및 스트렙타비딘 APC(BioLegend, #405207) 또는 His-태깅된 항원 및 항-His-APC 이차 항체(R&D Biosystems Clone ADl .1.10)로 검출되었다. Fc 수용체는 염색 전에 Human Trustain FcX(BioLegend, #422301)로 차단될 수 있다. CD47 발현은 배경 측정을 위해 마우스 IgGl 카파 APC 동형체 대조군과 함께 마우스 항-인간 CD47 APC(eBioscience #17-0479-41)를 사용하여 결정될 수 있다. 칼레티쿨린(Calreticulin) 발현은 마우스 항-칼레티쿨린 PE 클론 FMC75(Abeam #ab83220)으로 결정할 수 있다. 모든 유동 결과는 살아있는(생/사 수성 고정가능한 사멸 세포 염색[Live/Dead Aqua Fixable Dead Cell Stain], Life Technologies L34957) 단일 세포상에서 관문화될 수 있다.

[1528] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 Imagestream 세포측정법: 단일 세포 형광 영상화를 이용한 FACS는 ImageStream Mark II 이미징 유세포 측정기(EMD Millipore)상에서 수행될 수 있다. 간략하게는, mRFP+ 또는 딜(Dil) 염색된 대식세포(CAR 또는 대조군)은, 고정 및 ImageStream 데이터 획득 전에 4시간 동안 GFP+ 종양 세포와 공동 배양될 수 있다. 데이터는 ImageStream 소프트웨어(EMD Millipore)를 사용하여 분석될 수 있다.

[1529] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 RNA 전기천공법: CAR 작제물은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 T7 프로모터의 제어하에 시험관내 전사 플라스미드 내로 클로닝될 수 있다. CAR mRNA는 mMessage mMachine T7 울트라 시험관 내 전사 키트[Ultra In Vitro Transcription Kit](Thermo Fisher)를 사용하여 시험관내 전사되고, RNEasy RNA 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 정제되고, BTX ECM850 전기천공기(BTX Harvard Apparatus)를 사용하여 인간 대식세포에 전기천공될 수 있다. CAR 발현은 FACS 분석을 사용하여 전기천공 후 다양한 시점에서 분석될 수 있다.

[1530] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 TLR/덱틴-1 프라이밍: 시험관내 식세포 작용 또는 사멸 분석 전의 Wt 또는 CAR 대식세포에서의 TLR 또는 덱틴-1 프라이밍은 공동 배양 전에 세포를 각각 TLR 1-9 효능제(인간 TLR1-9 효능제 키트, Invivogen) 또는 베타-글루칸(MP Biomedicals, LLC)의 권장 용량과 30분 동안 예비-인큐베이션함으로써 수행될 수 있다. Wt 또는 CAR 대식세포의 시험관내 기능은 프라이밍되지 않은 조건과 프라이밍된 조건 사이에서 비교될 수 있다.

[1531] 제WO2017019848A1호에 기재된 대식세포/단핵구 표현형: 하기 표면 마커는 M1/M2 구별을 위해 대식세포/단핵구 면역표현법 FACS 패널의 일부로서 평가될 수 있다: CD80, CD86, CD163, CD206, CD11B, HLA-DR, HLA-A/B/C, PDL1 및 PDL2(BioLegend). TruStain FcX는 면역염색 전에 Fc 수용체 차단에 사용될 수 있다. 대식세포/단핵구는 표현형 평가 전에 활성화 조건, 즉 48시간 동안 Ad5f35 형질도입에 노출되거나 그렇지 않을 수 있다.

[1532] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 시호스 분석[Seahorse assay]: 대식세포의 대사 표현형 및 산소 소비는 시호스 분석(Seahorse XF, Agilent)을 사용하여 측정할 수 있다. 대조군 또는 CAR 대식세포는 분석 전에 24시간 동안 배양 배지 대조군 또는 면역억제 시토킨에 노출될 수 있다. 세포들은 시호스 분석 전반에 걸쳐 올리고마이신, FCCP, 및 로테논으로 순차적으로 처리될 수 있다. 분석은 조건당 6회 반복으로 수행하였다.

[1533] 제WO2017019848A1호에 기재된 바와 같은 생체내 분석: NOD-scid IL2Rg-null- IL3/GM/SF, NSG-SGM3(NSGS) 마우스를 인간 이종이식 모델에 사용할 수 있다. CBG-발광효소 양성 인간 SKOV3 난소암 세포로 이식된 마우스를 처리하지 않은 채로 두거나, 형질도입되지 않은 빈 Ad5f35 형질도입 또는 Ad5f35 CAR-HER2 형질도입된 인간 대식세포로 상이한 용량으로 처리하였다. 종양 부하[tumor burden](IVIS 스펙트럼, Perkin Elmer)를 모니터링하기 위해 직렬 생물발광 이미징을 수행할 수 있다. 장기 및 종양은 FACS 분석을 위해 희생시 수집할 수 있다. 전체 생존율은 카플란-메이어(Kaplan-Meier) 분석을 사용하여 모니터링하고 비교할 수 있다.

[1534] 본원에 기재된 대식세포는 대상의 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1535] 일부 구현예에서, 질환은 자가면역 질환이다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 '자가면역 질환'은 자가면역 반응에서 기인하는 장애로 정의된다. 자가면역 질환은 자가항원에 대한 부적절하고 과도한 반응의 결과이다. 자가

면역 질환의 예는 특히, 아디시온병[Addision's disease], 원형 탈모증, 강직성 척추염, 자가면역 간염, 자가면역 이하선염, 크론병, 당뇨병(I형), 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 전신 홍반성 루프스, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 천포창, 건선, 류마티스열, 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 경피증, 쇼그렌 증후군, 척추관절병증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성 빈혈, 궤양성대장염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1536] 자가면역 질환의 예는 후천성 면역 결핍 증후군[자가면역 성분을 갖는 바이러스성 질환인, AIDS(Acquired Immunodeficiency Syndrome)], 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 용혈성빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환[autoimmune inner ear diease, AIED], 자가면역 림프세포증식증후군[autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS], 자가면역 혈소판감소성자반증[자가면역 혈소판감소성자반증, ATP], 베체트(Behcet)병, 심근병, 셀리악병-포진상 피부염[celiac sprue-dermatitis hepetiformis], 만성 피로 면역 기능 장애 증후[chronic fatigue immune dysfunction syndrome, CFIDS], 만성 염증성 탈수초성 다발성신경병증[chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIPD], 흉터유사천포창, 한랭응집소증, 크레스트(Crest) 증후군, 크론병, 데고(Dego)병, 소아 피부근염, 원반성 루푸스, 필수 혼합 한냉글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판 감소성 자반증[idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP], Iga 신장병, 인슐린 의존형 당뇨병, 소아 만성 관절염(스틸병[Still]), 소아 류마티스성 관절염, 메니에르(Meniere)병, 혼합형 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증근무력증, 악성빈혈[pernacious anemia], 결절성다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군[polyglandular syndrome], 류마티스성 다발근통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 레이노 증후군[Raynaud's phenomenon], 라이터 증후군[Reiter's syndrome], 류마티스열, 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 피부경화증(진행성 전신 피부경화증[progressive systemic sclerosis, PSS]로서, 전신 피부경화증[SS]로도 알려짐), 쇼그렌 증후군, 강직-인간 증후군, 전신 홍반성 루프스, 타카야수동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증, 및 베게너 육아종증을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1537] 본원에 기재된 대식세포는 또한 염증성 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 염증성 장애의 예는 만성 및 급성 염증성 장애를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 염증성 질환의 예는 알츠하이머병, 천식, 아토피성 알레르기, 알레르기, 죽상동맥경화증, 기관지 천식, 습진, 사구체신염, 이식편 대 숙주 질병, 용혈성 빈혈, 골관절염, 패혈증, 뇌졸중, 조직 및 장기의 이식, 혈관염, 당뇨병성 망막증 및 인공호흡기 유발 폐 손상을 포함한다.

[1538] 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 본원에 기재된 대식세포는 암을 치료하는데 이용될 수 있다. 암은 혈관 신생되지 않은, 또는 아직 실질적으로 혈관 신생되지 않은 종양뿐만 아니라 혈관 신생된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양(예컨대 혈액학적 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함할 수 있거나, 고형 종양을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 세포로 치료되는 암의 유형은 암종, 모세포종, 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성 종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성종양, 예를 들어, 육종, 암종, 및 흑색종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암도 포함된다.

[1539] 고형 종양은 조직의 비정상 덩어리로, 일반적으로 낭종이나 액체 영역을 포함하지는 않는다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 다른 유형의 고형 종양은 이를 형성하는 세포의 유형에 따라 명명된다(예컨대, 육종, 암종, 및 림프종).

[1540] 종양의 비제한적인 예는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 및 기타 육종, 활막종, 중피종, 유잉 육종, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 악성 림프종, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 갑상선 수질 암종, 유두상 갑상선 암종, 갈색세포 피지샘 종양, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 융모막 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광 암종, 흑색종, 및 CNS 종양(예컨대, 신경아교종(예컨대, 뇌 신경아교종 및 혼합된 신경아교종)), 교모세포종(다형성 교모세포종으로도 알려짐) 성상세포종, CNS 림프종, 배아세포종, 수모세포종, 신경초종 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교종, 뇌수막종[menangioma], 신경모세포종, 망막모세포종, 및 뇌 전이)을 포함할 수 있다.

[1541] 혈액암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액(또는 조혈) 암의 예는 백혈병, 예컨대 급성 백혈병(예컨대 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 골수모세포성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구

성, 적혈구 및 백혈병), 만성 백혈병(예컨대, 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종(느린 및 고등급 형태), 다발성 골수종, 발덴스트롬(Waldenstrom) 고분자글로불린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 모발상 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한다.

[1542] 각종 암의 추가의 예는, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 암은 갑상선 수질 암종이다.

[1543] j. B 세포

[1544] 세포 치료제에 사용되는 B 세포는 세포 치료제의 제조 공정 중 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1545] 세포 치료제에 사용되는 B 세포는 일차 B 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 일차(예를 들어, 유전체-편집된) B 세포상에서 수행될 수 있다.

[1546] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 세포 치료제에 사용되는 B 세포는 만능 줄기 세포[iPSC]-유래 B 세포일 수 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 B 세포를 형성하도록 분화될 수 있는 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다. 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 줄기 세포 유래(예를 들어, 유전체-편집된) B 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1547] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 B 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 B 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함하며, 예를 들어 이는 제US2019321403A1호에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 본원에 기재된 B 세포에 대한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포(예를 들어, CAR 이식 유전자)를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 B 세포는 세포 치료제 제조 동안 편집 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1548] 본원에 기재된 B 세포는 대상에서 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1549] 본원에 개시된 세포는 B 세포, 예를 들어 B 세포 집단일 수 있다. '세포', 예를 들어, 아래에서 'B 세포'에 대한 임의의 지칭은, 본 출원에 기재된 바와 같은 '세포 집단' 예를 들어, 'B 세포 집단'에도 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[1550] B 세포의 하위 유형 및 하위 집단 중에는 전구물질 또는 미성숙 B 세포, 미감작 성숙 B 세포, 기억 B 세포, 형질모세포 및 형질 세포가 있다. 전구물질 또는 미성숙 B 세포는 HSC, 다능성 전구[multipotent progenitor, MPP] 세포, 공통 림프구 전구[common lymphoid progenitor, CLP] 세포, 초기의 전[pro]-B 세포, 후기의 전-B 세포, 큰 예비-B 세포, 작은 예비-B 세포, 미성숙 B 세포, T1 B 세포, 및 T2 B 세포(예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US2019321403A1호에 기재된 바와 같음)를 포함한다.

[1551] B 세포 또는 B 세포 집단을 수득하는 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 제US2019321403A1호에 기재된 바와 같음). HSC를 분비 B 림프구 및 형질 세포로 시험관내 성숙시키는 다양한 기술이 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Luo, X. M., et al. (2009). Blood, 113(7), 1422-1431] 참조).

[1552] 예를 들어, 제US2019321403A1호에 기재된 바와 같이, 사용된 세포의 출발 집단은 다수의 공급원에서 유래할 수 있다. 출발 세포 집단은 PBMC 또는 다른 혈액 샘플, 편도, 골수 또는 B 세포가 존재하는 다른 유사한 제제로부터 유도될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 출발 집단은 벌크(선발되지 않음) B 세포 또는 특정 B 세포 하위세트, 예컨대 성숙, 미성숙, 기억, 미감작, 또는 다른 B 세포 소집단을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 출발 세포 집단은 B 세포로 분화할 수 있는 전구세포, 예컨대 조혈 줄기 세포[hematopoietic stem cell, HSC]를 포함할 수 있다. 치료되는 대상과 관련하여, 출발 세포는 동종 및/또는 자가 세포일 수 있다. 방법들 중에는 기성품[off-the-shelf] 방식이 있다. 일부 양태에서, 예컨대 기성품 기술의 경우, 출발 세포는 만능성 및/또는 다능성, 예컨대 줄기 세포, 예컨대 유도 만능성 줄기 세포[iPSC]이다. 일부 구현예에서, 방법은 대상에서 세포

를 단리하는 단계, 본원에 기재된 바와 같이 세포를 제조, 가공, 배양 및/또는 조작하는 단계, 및 동결보존 전 또는 후에 이들을 동일한 환자에게 재도입하는 단계를 포함한다.

[1553] 세포 치료법에 사용될 때 B 세포의 원하는 특징 일부가 본원에 기재된다.

[1554] 일부 구현예에서, 하나 이상의 B 세포 집단은 표면 마커와 같은 하나 이상의 특정 마커에 대해 양성(마커+)이거나 높은 수준을 발현하거나(고수준 마커), 하나 이상의 마커에 대해 음성(마커-)이거나 상대적으로 낮은 수준을 발현하는(저수준 마커) 세포가 풍부하거나 고갈된다. 일부 경우에서, 이러한 마커는 B 세포의 특정 집단(예컨대, 미감작 세포)에 부재하거나 상대적으로 낮은 수준으로 발현되지만 B 세포의 특정 다른 집단(예를 들어, 미감작이 아닌[non-naive] 세포)에 상대적으로 높은 수준으로 존재하거나 발현되는 것이다.

[1555] 일부 구현예에서, 세포는 (1) PAX5, BACH2, BCL-2, OBF1, OCT2, PU.1, SPIB, ETS1, 및 IRF8 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 수준의 발현을 나타내는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 IRF4, BLIMP1, 및 XBP1 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 수준의 발현을 나타내는 세포가 고갈되며(예를 들어, 음성으로 선발), 및/또는 (2) CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, 및 CD24 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 CD10, CD27, 및 CD38 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 고갈(예를 들어, 음성으로 선발)된다. 일부 구현예에서, 세포는 천연 성숙 B 세포가 풍부하다.

[1556] 일부 구현예에서, 세포는 (1) IRF4, BLIMP1, 및 XBP1 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 PAX5, BACH2, BCL-2, OBF1, OCT2, PU.1, SPIB, ETS1, 및 IRF8 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 수준을 발현하는 세포가 고갈되며(예를 들어, 음성으로 선발), 및/또는 (2) CD19, CD38, CD27, CD269, 및 MHCII 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 CD20 및/또는 CD138에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 고갈(예를 들어, 음성으로 선발)된다. 일부 구현예에서, 세포는 형질모세포가 풍부하다.

[1557] 일부 구현예에서, 세포는 (1) IRF4, BLIMP1 및 XBP1 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 PAX5, BACH2, BCL-2, OBF1, OCT2, PU.1, SPIB, ETS1 및 IRF8에 대해 양성인 또는 높은 수준을 발현하는 세포가 고갈되며(예를 들어, 음성으로 선발), 및/또는 (2) CXCR4, CD27, CD38, CD138 및 CD269 중 하나 이상(예를 들어, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 CD19, CD20 및 MHCII 중 하나 이상(예를 들어, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 고갈된다(예를 들어, 음성으로 선발). 일부 구현예에서, 세포는 형질 세포가 풍부하다.

[1558] 일부 구현예에서, 세포는 (1) PAX5, BACH2, BCL-2, OBF1, OCT2, PU.1, SPIB, ETS1, 및 IRF8 중 하나 이상(예컨대, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나, IRF4, BLIMPL 및 XBP1에 대해 양성인 또는 높은 수준을 발현하는 세포가 고갈되며(예를 들어, 음성으로 선발), 및/또는 (2) CD19, CD20, CD40, CXCR4, CXCR5, 및 CXCR7 중 하나 이상(예를 들어, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 풍부(즉, 양성으로 선발)하고/하거나 CD23 및/또는 CD38 중 하나 이상(예를 들어, 모두)에 대해 양성인 또는 높은 표면 수준을 발현하는 세포가 고갈된다(예를 들어, 음성으로 선발). 일부 구현예에서, 세포는 기억 B 세포가 풍부하다.

[1559] 일단 세포가 대상(예를 들어, 인간)에게 투여되면, 일부 양태에서 조작된 B 세포 집단의 생물학적 활성은 다수의 알려진 방법 중 임의의 것에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 세포의 생물학적 활성은 외인성 단백질, 예컨대 치료 단백질의 발현 및/또는 분비에 대해 분석함으로써 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 생물학적 활성은 또한 특정 시토킨, 예컨대 IFNγ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 및 TNFα 발현 및/또는 분비를 분석함으로써 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 활성은 종양 부담 또는 부하의 감소와 같은 임상 결과를 평가함으로써 측정된다. 일부 구현예에서, 독성 결과, 세포의 지속성 및/또는 증식, 및/또는 숙주 면역 반응의 존재 또는 부재가 평가된다.

[1560] 일부 구현예에서, 방법은 조작된 B 세포가 외인성 단백질의 생산 및/또는 분비를 증가시키도록 유도하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 유도하는 단계는 조작된 B 세포에서 발현되는 내인성 B 세포 수용체의 리간드 결합 도메인에 결합하는 작용제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제는 기재된 임의의 것과 같은 내인성 B 세포 수용체에 의해 인식되는 백신이다. 일부 구현예에서, 유도하는 단계는 조작된 B 세포에

서 발현되는 구동 수용체, 예컨대 재조합 또는 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인에 결합하는 작용제를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 B 세포의 구동 수용체에 대한 리간드의 결합은 조작된 B 세포가 형질모세포 또는 혈장으로 분화되도록 유도한다. 일부 구현예에서, 조작된 B 세포는 형질모세포 또는 혈장 세포이다. 일부 구현예에서, 외인성 단백질은 내인성 면역글로불린 프로모터 또는 항구적 활성인 프로모터의 제어하에 있다. 일부 구현예에서, 외인성 단백질은 유도성 프로모터의 제어하에 있고, 방법은 대상에게 유도성 프로모터를 활성화시키는 작용제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[1561] 일부 구현예에서, 방법은 대상에서 적어도 약 1개월, 적어도 2개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 2년 또는 그 초과의 작용 기간(특정 방법이 효과적인 기간)을 초래한다. 일부 구현예에서, 대상에게 조작된 B 세포 또는 조성물의 단일 투여는 대상에게 외인성 단백질의 단일 직접 투여로부터 초래되는 최대 허용 작용 지속기간(치료제의 최대 허용 투여량에 대한 작용 지속기간)에 비해 대상에서 증가된 작용 지속기간을 초래한다. 일부 구현예에서, 증가는 적어도 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배 또는 5배이다.

[1562] 본원에 기재된 B 세포는 대상에서의 질환을 치료하거나 예방하는 데 사용될 수 있다.

[1563] 본원에 기재된 B 세포를 사용하여 치료될 수 있는 질환, 상태 및 장애 중에는, 고형 종양, 혈액성 악성 종양 및 흑색종을 포함하는 종양, 및 바이러스 또는 다른 병원체, 예를 들어 HIV, HCV, HBV, CMV 및 기생충 질환에 의한 감염과 같은 감염성 질환이 있다. 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 종양, 암, 악성종양, 신생물 또는 다른 증식성 질환이다. 이러한 질환은 백혈병, 예컨대 급성 백혈병 (예컨대 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 골수모세포성, 전골수구성, 골수단핵구성, 만성 백혈병(예컨대, 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비호지킨 림프종(느린 형태 및 고등급 형태), 다발성 골수종, 형질세포종, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 털세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함하는 혈액(또는 조혈성) 암, 및 육종 및 암종, 예컨대 부신피질 암종, 담관암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종 및 기타 육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암종, 위암, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 갑상선암(예를 들어, 갑상선 수질 암종 및 유두상 갑상선 암종). 갈색세포 피지샘 종양, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 융모막 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암(예를 들어, 자궁경부 암종 및 침습전 자궁경부 이형성), 결장직장암, 항문암, 항문관 또는 항문직장 암, 질암, 외음부암(예를 들어, 편평 세포 암종, 상피내 암종, 선암종 및 섬유육종), 음경암, 구인두암, 식도암, 두부 암(예를 들어, 편평 세포 암종), 경부 암(예를 들어, 편평 세포 암종), 고환암(예를 들어, 정상피종, 기형종, 태아 암종, 기형암종, 융모암, 육종, 레이딕(Leydig) 세포 종양, 섬유종, 섬유선종, 선종 종양 및 지방종), 방광암종, 신장암, 자궁암(예를 들어, 자궁내막암종), 요로상피암(예를 들어, 편평 세포 암종, 이행 세포 암종, 선암종, 요관암, 및 방광암), 및 CNS 종양(예컨대, 신경아교종(예컨대, 뇌간 신경아교종 및 혼합된 신경아교종)), 교모세포종(다형성 교모세포종으로도 알려짐) 성상세포종, CNS 림프종, 배아세포종, 수모세포종, 신경초종 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교종, 뇌수막종[menangioma], 신경모세포종, 망막모세포종, 및 뇌 전이)를 포함할 수 있다.

[1564] 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 바이러스, 레트로바이러스, 박테리아 및 원생동물 감염과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 감염성 질환 또는 병태이다. 이러한 질환은 아시네토박터 바우만니(*Acinetobacter baumannii*), 아나플라즈마(*Anaplasma*) 속, 아나플라즈마 파고사이토필룸(*phagocytophilum*), 안실로스토마 브라질리엔스(*Ancylostoma braziliense*), 안실로스토마 두오데날(*duodenale*), 아르카노박테리움 헤몰리티쿰(*Arcanobacterium haemolyticum*), 회충[*Ascaris lumbricoides*], 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 아스트로바이러스과(*Astroviridae*), 바베시아(*Babesia*) 속, 탄저균(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*cereus*), 바르토넬라 헨셀레(*Bartonella henselae*), BK 바이러스, 블라스토시스티스 호미니스(*Blastocystis hominis*), 블라스토마이세스 데르마티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 속, 보렐리아 종, 브루셀라(*Brucella*) 속, 브루기아 말레이이(*Brugia malayi*), 부냐비리데(*Bunyaviridae*)과, 부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*) 및 기타 부르크홀데리아 종, 부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*), 부르크홀데리아 슈도라미드(*Burkholderia pseudomallei*), 칼리시비리데(*Caliciviridae*) 과, 캄필로박터(*Campylobacter*) 속, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 종, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미도필라 뉴모니아(*Chlamydophila pneumoniae*), 클라미도필라 프시타시(*psittaci*), CJD 프리온, 간흡충(*Clonorchis sinensis*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실리(*difficile*), 클로스트리듐 퍼프린젠스

(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 종, 파상풍균[*Clostridium tetani*], 콕시디오이데스(*Coccidioides*) 종, 코로나바이러스, 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 크리민-콩고(*Crimean-Congo*) 출혈열 바이러스, 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 크립토스포리듐(*Cryptosporidium*) 속, 거대세포바이러스[CMV], 뎅기(Dengue) 바이러스(DEN-1, DEN-2, DEN-3 및 DEN-4), 디엔타모에바 프라길리스(*Dientamoeba fragilis*), 에볼라바이러스(EBOV), 에키노코커스(*Echinococcus*) 속, 에를리키아 샤펜시스(*Ehrlichia chaffeensis*), 에를리키아 에윙기(*Ehrlichia ewingii*), 에를리키아 속, 이질 아메바[*Entamoeba histolytica*], 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속, 엔테로바이러스 속, 엔테로바이러스, 주로 콕사키(*Coxsackie*) A 바이러스 및 엔테로바이러스 71(EV71), 에피데르모피톤(*Epidermophyton*) spp, 엡스타인-바 바이러스[EBV], 대장균 O 157:H7, 0111 및 0104:H4, 간흡충[파시올라 헵티카(*Fasciola hepatica*) 및 파시올라 기간티카(*Fasciola gigantica*)], FPI 프리온, 필라리오이아(*Filarioidea*) 상과, 플라비바이러스(*Flaviviruses*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 속, 게오트리쿰 칸디둠(*Geotrichum candidum*), 지아르디아 인테스티날리스(*Giardia intestinalis*), 그나토스토마(*Gnathostoma*) 종, GSS 프리온, 구아나리토(*Guanarito*) 바이러스, 헤모필루스 듀크레이(*Haemophilus ducreyi*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 헤니파바이러스(*Henipavirus*)(헨드라 바이러스 니파 바이러스(Hendra virus Nipah virus)), A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스[HBV], C형 간염 바이러스[HCV], D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 단순헤르페스 바이러스 1 및 2(HSV-1 및 HSV-2), 히스토플라스마 카프술라툼(*Histoplasma capsulatum*), HIV[인간 면역결핍 바이러스], 호르타에아 베르네키(*Hortaea werneckii*), 인간 보카바이러스[Human bocavirus, HBoV], 인간 헤르페스 바이러스 6[HHV-6] 및 인간 헤르페스 바이러스 7[HHV-7], 인간 메타뉴모바이러스[Human metapneumovirus, hMPV], 인유두종바이러스(Human papillomavirus, HPV], 인간 파라인플루엔자 바이러스[Human parainfluenza virus, HPIV], 인간 T 세포 백혈병 바이러스 1[HTLV-1], 일본 뇌염 바이러스, JC 바이러스, 주닌(Junin) 바이러스, 카포시 육종 연관 헤르페스 바이러스[KSHV], 킹겔라 킹가에(*Kingella kingae*), 클렙시엘라 그라눌로마티스(*Klebsiella granulomatis*), 쿠루 프리온, 라사 바이러스, 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 리슈마니아(*Leishmania*) 속, 렙토스피라(*Leptospira*) 속, 리스테리아(*Listeria*) 속, 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 림프구성 맥락수막염 바이러스[Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV], 마추포(Machupo) 바이러스, 말라세지아(*Malassezia*) 종, 마르부르크(Marburg) 바이러스, 홍역 바이러스, 메타고니무스 요카가와이(*Metagonimus yokagawai*), 마이크로스포리디아 파일룸(*Microsperia phylum*), 몰루스쿰 콘태지오숨 바이러스[MCV], 유행성이하선염 바이러스, 나병균[*Mycobacterium leprae*] 및 나종균[*Mycobacterium lepromatosis*], 결핵균[*Mycobacterium tuberculosis*], 마이코박테리움 울세란(*Mycobacteria ulcerans*), 마이코플라스마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*), 나에글레리아 파울레리(*Naegleria fowleri*), 네카토르 아메리카누스(*Necator americanus*), 네이세리아 고노르호에(*Neisseria gonorrhoeae*), 수막염균[*Neisseria meningitidis*], 노카르디아 아스테로이데스(*Nocardia asteroides*), 노카르디아 종, 회선사상충[*Onchocerca volvulus*], 오리엔티아 쯔쯔가무시(*Orientia tsutsugamushi*), 오르토믹소비리대(*Orthomyxoviridae*) 과 (독감), 파라코시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 파라고니무스(*Paragonimus*) 종, 파라고니무스 베스터마니(*westermani*), 파르보바이러스 B19, 파스퇴렐라 속, 플라스모디움(*Plasmodium*) 속, 뉴모시스티스 지로베키(*Pneumocystis jirovecii*), 소아마비바이러스, 광견병 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스[Respiratory syncytial virus, RSV], 리노바이러스(*Rhinovirus*), 리노바이러스, 리케차 아카리(*Rickettsia akari*), 리케차 속, 리케차 프로바제키(*prowazekii*), 리케차 리케치(*rickettsii*), 리케차 티피(*typhi*), 리프트 밸리 열[Rift Valley fever] 바이러스, 로타바이러스(*Rotavirus*), 루벨라(*Rubella*) 바이러스, 사비아(*Sabia*) 바이러스, 살모넬라 속, 옴진드기[*Sarcoptes scabiei*], SARS 코로나바이러스, 쉬스토소마(*Schistosoma*) 속, 쉬겔라(*Shigella*) 속, 신 놈브레(*Sin Nombre*) 바이러스, 한타바이러스, 스포로트릭스 쉔키(*Sporothrix schenckii*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속, 스태필로코커스 속, 폐렴연쇄상구균[*Streptococcus agalactiae*], 폐렴구균[*Streptococcus pneumoniae*], 스트렙토코커스 피오게네스, 분선충[*Strongyloides stercoralis*], 타에니아(*Taenia*) 속, 갈고리촌충[*Taenia solium*], 진드기 매개 뇌염 바이러스[Tick-borne encephalitis virus, TBEV], 개회충[*Toxocara canis*] 또는 고양이회충[*Toxocara cati*], 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 트레포네마 팔리덤(*Treponema pallidum*), 트리키넬라 스피랄리스(*Trichinella spiralis*), 트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*), 트리코피톤(*Trichophyton*) 종, 트리추리스 트리키우라(*Trichuris trichiura*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*), 우레아플라스마 우레리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*), 바리셀라 조스터 바이러스(*Varicella zoster virus*, VZV), 바리올라(*Variola*) 메이저 또는 바리올라 마이너, vCJD 프리온, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 비브리오 콜레라, 웨스트 나일 바이러스, 웨스턴 말 뇌염 바이러스, 우케리아 반크로프티

(*Wuchereria bancrofti*), 황열 바이러스, 예르시니아 엔테로리티카, 예르시니아 페스티스, 및 예르시니아 가성결핵 중에서 선택된 병원체로의 감염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[1565] 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 바이러스 감염이다. 일부 구현예에서, HIV 감염은 본원에 기재된, HIV 군, 하위유형 또는 변이체 중 어느 하나에 의한 감염을 포함하는 HIV-1 또는 HIV-2 감염이다. 예시적인 HIV-1 군은 HIV-1 군 M, HIV-1 군 N, HIV-1 군 O, 및 HIV-1 군 P를 포함한다. 하위유형 및 이의 재조합 형태가 공지되어 있고, 예시적인 하위유형은 하위유형 A (A1 및 A2 포함), 하위유형 B, 하위유형 C, 및 재조합 형태(CRF_AE 포함)를 포함한다. 예시적인 HIV-2 군은 HIV-2 군 A, HIV-2 군 B, HIV-2 군 C, HIV-2 군 D, HIV-2 군 E, HIV-2 군 F, HIV-2 군 G, 및 HIV-2 군 H를 포함한다.

[1566] k. 조혈 줄기 세포[HSC]

[1567] 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같이 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 (예를 들어, 유전체-편집된) 조혈 줄기 세포상에서 수행될 수도 있다.

[1568] 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 조혈 줄기 세포에 대한 관련 정보는 당업계에 알려져 있으며, 이는 세포 치료법에 사용되는 경우 조혈 줄기 세포의 원하는 특징에 관한 특정 정보를 포함한다. 본원에 기재된 HSC 세포에 관한 구현예는 HIP 세포를 설명하는 구현예(예를 들어, 하나 이상의 MHC의 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄)뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, 및 기타 변형된/유전자 편집된 세포를 설명하는 구현예와 용이하게 적절히 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 세포 치료제에 사용되는 HSC는 세포 치료제의 제조 공정의 임의의 단계에서 공여자 능력에 대해 프로파일링될 수 있다.

[1569] 본원에 기재된 HSC는 대상에서 질환을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[1570] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 경우에서, 조혈 줄기 세포는 백혈구, 적혈구, 혈소판 등 모든 종류의 혈액세포로 발달할 수 있는 미성숙 세포이다. 조혈 줄기 세포[HSC]는 말초 혈액과 골수에서 발견된다. 일부 경우에서, 조혈 줄기 세포는 말초혈액이나 골수에서 단리된다.

[1571] 일부 구현예에서, 조작된 HSC 또는 조작된 HSC를 포함하는 집단은 조혈 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 조혈 질환 또는 장애는 골수이형성증, 무형성 빈혈, 판코니(Fanconi) 빈혈, 발작성 야간 헤모글로빈뇨, 낫세포병, 다이아몬드 블랙판 빈혈, 샤크만 다이아몬드(Schachman Diamond) 장애, 코스트만(Kostmann) 증후군, 만성 육아종성 질환, 부신백질이영양증, 백혈구 부착 결핍, 혈우병, 지중해 빈혈, 베타-지중해 빈혈, 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병[ALL], 급성 골수성(골수) 백혈병[AML], 성인 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병[CLL], B-세포 만성 림프구성 백혈병[B-CLL], 만성 골수성 백혈병[CML], 소아 만성 골수성 백혈병[CML], 및 소아 골수성 백혈병[JMML], 중증 복합 면역결핍 질환[SCID], X-연관 중증 복합 면역결핍, 비스코트-올드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군[WAS], 아데노신-탈아미노효소[ADA] 결핍, 만성 육아종증, 체디악-히가시(Chediak-Higashi) 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종[NHL] 또는 AIDS다.

[1572] 일부 구현예에서, 조작된 HSC 또는 조작된 HSC를 포함하는 집단은 백혈병 또는 골수종과 관련된 세포 결함을 치료하거나, 또는 백혈병 또는 골수종을 치료하기 위해 투여된다.

[1573] 일부 구현예에서, 조작된 HSC 또는 조작된 HSC를 포함하는 집단은 자가면역 질환 또는 병태와 관련된 세포 결함을 치료하거나 자가면역 질환 또는 병태를 치료하기 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환 또는 병태는 급성 파종성 뇌척수염, 급성 출혈성 백질뇌염, 애디슨병, 무감마글로불린혈증, 원형 탈모증, 근위축성 측삭경화증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 항합성효소 증후군, 아토피성 알레르기, 자가면역 무형성 빈혈, 자가면역 심근병증, 자가면역 장질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환, 자가면역 림프증식 증후군, 자가면역 말초 신경병증, 자가면역 췌장염, 자가면역 다내분비 증후군, 자가면역 프로게스테론 피부염, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 자가면역 두드러기, 자가면역 포도막염, 발로병, 발로 동심성 경화증, 베체트 증후군, 베르거병, 비커스태프 뇌염, 블라우 증후군, 물집유사천포창, 암, 캐슬맨병, 셀리악병, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 만성 재발성 다초점 골수염, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 흉터유사천포창, 코간 증후군, 한랭 응집소 질환, 보체 성분 2 결핍, 두개골 동맥염, CREST 증후군, 크론병, 쿠싱 증후군, 피부백혈구 파괴성 혈관염, 데고병, 델컴병, 포진성 피부염, 피부근염, 1형 당뇨병, 미만성 피부 전신 경화증, 드레슬러 증후군, 원반성 홍반성 루푸스, 습진, 부착부염 관련 관절염, 호산구성 근막염, 호산구성 위장염, 후천성 수포성 표피박리증, 결절성 홍반, 본태성 혼합형 한랭글로불린혈증, 에반 증후군, 진행성 골화섬유형성이상, 섬유성 폐포염, 위염, 위장관 천포창, 거대 세포 동맥염, 사구체신염, 굿파스처(good pasture's) 증후군, 그레이

브스병, 길랑-바레 증후군[GBS], 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-쇤라인(Henoch-Schonlein) 자반병, 임신성 헤르페스, 저감마글로불린혈증, 특발성 염증성 탈수초 질환, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, IgA 신병증, 봉입체 근염, 염증성 탈수초 다발신경병증, 간질성 방광염, 소아 특발성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 카와사키병, 램버트-이튼(Lambert-Eaton) 근무력 증후군, 백혈구 파괴성 혈관염, 편평 태선, 공막 태선, 선형 IgA 질환[LAD], 루게릭병, 루포이드 간염, 홍반루푸스, 마지드(Majeed) 증후군, 메니에르병, 현미경적 다발혈관염, 밀러-피셔(Miller-Fisher) 증후군, 혼합형 결합 조직 질환, 국소피부경화증, 무차-하버만(Mucha-Habermann)병, 다발성 경화증, 중증근무력증, 근육염, 시신경 신우신염, 신경근긴장증, 안구 흉터유사천포창, 안구간대경련 근간대경련 증후군, 오드(ord) 갑상선염, 회귀성 류마티즘, 방종양성 소뇌 변성, 발작성 야간 혈색소뇨증[paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH], 패리 롬베르그(Parry Romberg) 증후군, 파슨나주-터너(Parsonnage-Turner) 증후군, 평면부염, 천포창, 심상성천포창, 악성 빈혈, 정맥성 뇌척수염, POEMS 증후군, 결절성다발동맥염, 류마티스성 다발근통, 다발성근염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 진행성 염증성 신경병증, 건선, 건선성 관절염, 괴저성 농피증, 순수 적혈구 무형성증, 라스무센(Rasmussen) 뇌염, 레이노 현상, 재발성 다발연골염, 라이터 증후군, 하지불안 증후군, 후복막 섬유증, 류마티스성 관절염, 류마티스열, 사르코이드증, 슈미트(Schmidt) 증후군, 슈니츨러(Schnitzler) 증후군, 공막염, 경피증, 쇼그렌 증후군, 척추 관절 병증, 스틸병, 강직 인간 증후군, 아급성 세균성 심내막염, 수삭(Susac) 증후군, 스위트(Sweet) 증후군, 시덴함(Sydenham) 무도병, 교감 안염, 타카야수(Takayasu) 동맥염, 측두 동맥염, 톨로사-헌트(Tolosa-Hunt) 증후군, 횡단 척수염, 궤양성 결장염, 미분화 결합 조직 질환, 미분화 척추 관절 병증, 혈관염, 백반증 또는 베게너 육아종증이다.

[1574] 4. ABO형 및 Rh 항원 발현

[1575] 혈액 생성물은 인체 내 모든 적혈구 표면에 항원이 있는지 없는지의 여부에 따라 다른 군으로 분류될 수 있다(ABO 혈액형). A, B, AB 및 Al 항원은 적혈구의 당단백질상의 올리고당 서열에 의해 결정된다. 혈액군 항원군의 유전자는 항원 단백질을 만들기 위한 지침을 제공한다. 혈액군 항원 단백질은 적혈구의 세포막 내에서 다양한 기능을 한다. 이러한 단백질 기능에는 세포 안팎으로 다른 단백질과 분자를 수송하는 기능, 세포 구조를 유지하는 기능, 다른 세포와 분자에 부착하는 기능, 화학 반응에 참여하는 기능 등이 있다.

[1576] 레수스 인자[Rhesus Factor, Rh] 혈액군은 ABO 혈액군 체계 다음으로 두 번째로 중요한 혈액군 시스템이다. Rh 혈액군 시스템은 49개의 정의된 혈액군 항원으로 구성되며, 그 중 5개의 항원 D, C, c, E 및 e가 가장 중요하다. 개인의 Rh(D) 상태는 일반적으로 ABO 유형 다음에 양성 또는 음성 접미어로 기술된다. 용어 'Rh 인자', 'Rh 양성' 및 'Rh 음성'은 Rh(D) 항원만을 지칭한다. Rh 항원에 대한 항체는 용혈성 수혈 반응에 관여할 수 있고, Rh(D) 및 Rh(c) 항원에 대한 항체는 태아 및 신생아의 용혈성 질환의 상당한 위험을 부여한다. ABO 항체는 모든 사람에게서 생명 초기에 발생한다. 그러나 Rh-인간의 레수스 항체는 전형적으로 사람이 감작될 때만 발생합니다. 이는 예를 들어 Rh+ 아기를 출산하거나 Rh+ 수혈을 받음으로써 발생할 수 있다.

[1577] A, B, H 및 Rh 항원은 혈액, 조직 및 세포 이식에 있어서, 공여자와 수용자 간의(benveen) 조직 적합성의 주요 결정 요인이다. ABO 유전자에 의해 암호화되는 글리코실전달효소 활성은 세포 표면에 나타나는 A, B, AB, O 조직-혈액군 항원을 생산하는데 관여한다. A 군 개인은 (1,3)N-아세틸갈락토사미닐전달효소 활성을 생성하는 특이성을 갖는 ABO 유전자 생성물을 암호화하고, B 군 개인은 (1,3) 갈락토실전달효소 활성을 생성하는 특이성을 갖는다. O형 개인은 기능성 갈락토실전달효소를 전혀 생성하지 않으므로 변형을 생성하지 않는다. AB형 개인은 각각 하나의 복제물을 보유하고 두 가지 유형의 변형을 생성한다. ABO 유전자의 효소 생성물은 기질로서 H 항원에 작용하고, 따라서 ABO 활성이 결여된 O형 개체는 미변형 H 항원을 제시하고, 따라서 종종 O(H)형으로 지칭된다.

[1578] H 항원 자체는 a(1,2)푸코실전달효소의 생성물이며, 이는 *FUTI* 유전자에 의해 암호화된다. 매우 드문 개체에서는 *FUTI* 유전자의 파괴의 결과로 전적으로 H 항원의 손실이 존재하며, ABO가 A 또는 B 조직-혈액형을 생성하기 위한 기질이 존재하지 않을 것이다. 이들은 봄베이(Bombay) 조직-혈액형으로 지칭된다. Rh 항원은 *RHD* 유전자에 의해 암호화되고, Rh 음성인 개체는 *RHD* 유전자의 결실 또는 파괴를 보유한다.

[1579] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 또는 세포 집단은 ABO 유형 O Rh 인자 음성이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 ABO 유형 O Rh 인자 음성 세포는 ABO 유형 O Rh 인자 음성 공여자에서 유래한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 ABO 유형 O Rh 인자 음성 세포는 ABO 유형 A, ABO 유형 B, 또는 Rh 인자 항원의 제시가 결여되도록 조작된다. 일부 구현예에서, ABO 유형 O 및/또는 Rh 음성 세포는(예를 들어, *ABO* 유전자의 유해한 변이에 의해 또는 *ABO* 유전자의 엑손 6 258delG 변이의 삽입에 의해) *ABO* 유전자의 부분적 또는 완전한 불활성화를 포함하고/하거나, *RHD* 유전자의 발현은 *RHD* 유전자의 유해한 변이에 의해 부분적으로 또는 완전히 불활성화된다. 일

부 구현예에서, ABO 유형 O Rh 음성 세포는 *FUT1* 유전자의 부분적 또는 완전한 불활성화를 포함하고/하거나 *RHD* 유전자의 발현은 *RHD* 유전자의 유해한 변이에 의해 부분적으로 또는 완전히 불활성화된다. 일부 구현예에서, 조작된 ABO 유형 O 및/또는 Rh 인자 음성 세포는 예를 들어 A형 세포를 O형 세포로, B형 세포를 O형 세포로, AB형 세포를 O형 세포로, A+형 세포를 O-형 세포로, A-형 세포를 O-형 세포로, AB+형 세포를 O-형 세포로, AB-형 세포를 O-형 세포로, B+형 세포를 O-형 세포로, 및 B-형 세포를 O-형 세포로 변형시키기 위한 유전자 편집을 사용하여 생성된다. 예시적인 조작된 ABO 유형 O Rh 인자 음성 세포 및 이를 생성하는 방법은 제WO2021/146222호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1580] 일부 구현예에서, CD46 및 CD59의 증가된 발현을 포함하는 본원에 제공된 세포 또는 세포 집단은 ABO 유형 A, ABO 유형 B, 또는 ABO 유형 AB이고/이거나, CD46 및 CD59의 증가된 발현을 포함하는 본원에 제공된 세포 또는 세포 집단은 Rh 인자 양성이다. 일부 구현예에서, CD46 및 CD59의 증가된 발현을 포함하는 세포는 CDC 반응을 촉발하지 않으면서 ABO 및/또는 Rh 인자 부적합 수용자 환자에게 투여될 수 있다.

[1581] 5. 성염색체

[1582] 특정 양태에서, 성 염색체를 갖는 세포는 특정 항원(예를 들어, Y 항원)을 발현할 수 있고, 수용자는 이러한 항원에 대해 기존의 민감성을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 수컷 태아를 임신한 암컷은 수컷 공여자로부터의 세포를 거부할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 공여자는 남성이고, 수용자는 남성이다. 일부 구현예에서, 공여자는 여성이고, 수용자는 여성이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 프로토카데린(Protocadherin) Y 및/또는 뉴롤리진(Neuroligin) Y와 같은 항원의 발현을 감소시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로토카데린 Y(PCDH11Y; Ensembl ID ENSG00000099715)를 암호화하는 유전자는 조작된 세포에서 감소 또는 제거, 예를 들어 녹아웃된다. 일부 구현예에서, 뉴롤리진 Y(NLGN4Y; Ensembl ID ENSG00000165246)을 암호화하는 유전자는 조작된 세포에서 감소 또는 제거, 예를 들어 녹아웃된다. 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하기 위한 임의의 방법, 예컨대 본원에 기재된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, PCDH11Y 및/또는 NLGN4Y는 핵산분해효소-매개 유전자 편집 방법, 예컨대 CRISPR/Cas 시스템을 사용함으로써 조작된 세포에서 감소되거나 제거된다.

[1583] **D. 이식유전자 삽입을 위한 유전자 편집 시스템**

[1584] 일부 양태에서, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및/또는 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자는 본원에 기재된 특정 방법 및 조성물을 사용하여 숙주 세포 (예를 들어, T 세포)의 유전체 내로 통합될 수 있다.

[1585] 1. 무작위 삽입

[1586] 일부 구현예에서, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및/또는 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자는 숙주 세포의 무작위 유전체 유전자좌 내로 삽입될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터는 유전자 물질을 숙주 세포에 전달하기 위해 통상적으로 사용되고, 외래 또는 외인성 유전자를 숙주 세포 게놈에 무작위로 삽입하여 유전자의 안정한 발현 및 복제를 용이하게 한다.

[1587] 2. 부위-유도 삽입(녹인)

[1588] 일부 구현예에서, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및/또는 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자가 숙주 세포의 특이적 유전체 좌위 내에 삽입될 수 있다. 다수의 유전자 편집 방법은 이식 유전자를 선택된 특정 유전체 좌위에 삽입하는 데 사용될 수 있다. 유전자 편집은 뉴클레오티드 서열이 살아있는 생물의 유전체에 삽입, 결실, 변형 또는 대체될 수 있는 유전자 조작의 유형이다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 핵산분해효소, 통합효소, 전위효소, 재조합효소를 수반하는 시스템을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 단일 가닥 파손[SSB]을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 비-상동성 단부 결합[NHEJ] 또는 상동성 유도 복구[HDR]와 관련된 것을 포함하는 이중 가닥 파손[DSB]을 매개한다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 DNA-기반 편집 또는 프라임-편집을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE]를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 TnpB 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 많은 유전자 편집 기법은 일반적으로 세포가 DNA에서 이중 가닥 파손[DSB]을 복구하는 선천적 메커니즘을 이용한다.

[1589] 진핵 세포는 비상동 말단 접합[NHEJ] 및 상동성 유도 복구[HDR]의 두 가지 주요 복구 경로에 의해 DSB를 복구한다. HDR은 전형적으로 자매염색분체가 복구 주형으로서 작용하도록 이용 가능할 때 후기 S기 또는 G2기 동안 일어난다. NHEJ가 더욱 통상적이고, 세포 주기의 임의의 단계 동안 일어날 수 있지만, 이는 오류를 더욱 유발하는

경향이 있다. 유전자 편집에서, NHEJ는 일반적으로, 열린 해독틀[ORF]을 이동시키고 코딩 영역 또는 연관된 조절 영역에서 변경을 생성함으로써 표적 유전자에서의 표적화된 기능 상실을 생산할 수 있는, 삽입/결실 돌연변이(인델)을 생산하는 데 사용된다. 다른 한편으로, HDR은 상동성 서열을 갖는 복구 주형의 존재하에 특정 돌연변이의 표적화된 녹인, 녹아웃 또는 삽입을 생산하기 위한 바람직한 경로이다. HDR 효능을 개선하기 위한 몇 가지 방법이 당업자에게 알려져 있으며, 이는 예를 들어, 화학적 조절(예를 들어, NHEJ 경로에서 주요 효소의 억제제로 세포를 치료), 세포 주기의 S 및 G2기에서 유전자 편집의 시기 적절한 전달, S 및 G2기에서의 세포 주기 저지, 및 상동성 서열을 갖는 복구 주형의 도입을 포함한다. 본원에 제공된 방법은 HDR-매개 복구, NHEJ-매개 복구, 프라임 편집 또는 이들의 조합을 이용할 수 있다.

[1590] 일부 구현예에서, HDR-매개 삽입을 위해 본원에 제공된 방법은, 예를 들어 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, 전위효소, 및 군집화된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부[CRISPR]/Cas 시스템을 포함하는 부위-유도 핵산분해효소를 이용한다.

[1591] a. ZFN

[1592] ZFN은 세균 FokI 제한 효소의 핵산내부분해효소 도메인에 부착된 아연 집게-함유 전사 인자로부터 적합화된 부위-특이적 DNA 결합 도메인의 배열을 포함하는 융합 단백질이다. ZFN은 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상)의 DNA 결합 도메인 또는 아연 집게 도메인을 가질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Carroll et al., Genetics Society of America (2011) 188:773-782; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:1156-1160] 참조. 각각의 아연 집게 도메인은 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 작은 단백질 구조 모티프이며, 일반적으로 3-bp 내지 4-bp DNA 서열을 인식한다. 탠덤 도메인은, 따라서 세포의 유전체 내에 독특한 확장된 뉴클레오티드 서열에 잠재적으로 결합할 수 있다.

[1593] 알려진 특이성의 다양한 아연 집게를 조합하여 약 6, 9, 12, 15 또는 18-bp 서열을 인식하는 다중-핑거 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-혼성계, 세균 1-혼성 및 2-혼성계, 및 포유동물 세포를 비롯한, 특정 서열을 인식하는 아연 집게(및 이의 조합)을 생성하기 위해, 다양한 선택 및 모듈식 조립 기술이 이용 가능하다. 아연 집게는 예정된 핵산 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 예정된 핵산 서열에 결합하도록 아연 집게를 조작하는 기준은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sera et al., Biochemistry (2002) 41:7074-7081; Liu et al., Bioinformatics (2008) 24:1850-1857] 참조.

[1594] FokI 핵산분해효소 도메인 또는 다른 이량체 핵산분해효소 도메인을 함유하는 ZFN은 이량체로서 기능한다. 따라서, 비-회문 DNA 부위를 표적화하기 위해서는 한 쌍의 ZFN이 필요하다. 두 개의 개별 ZFN은 적절한 간격으로 떨어져 있는 이들의 핵산분해효소를 사용하여 DNA의 반대 가닥에 결합해야 한다. 문헌[Bitinaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95:10570-10575] 참조. 유전체에서 특이적 부위를 절단하기 위해, 한 쌍의 ZFN은 부위에 측면 근접하는 두 개의 서열을 인식하도록 설계되며, 하나는 정방향 가닥에 있고 다른 하나는 역방향 가닥에 있다. 부위의 양쪽에서 ZFN이 결합하면, 핵산분해효소 도메인이 해당 부위에서 DNA를 이량체화하고 절단하여 5' 오버행을 가진 DSB를 생성한다. 그런 다음 HDR을 사용하여 상동성 팔이 측면에 있는 원하는 돌연변이를 함유하는 복구 주형의 도움으로 특정 돌연변이를 도입할 수 있다. 복구 주형은 일반적으로 세포에 도입된 외인성 이중 가닥 DNA 벡터이다. 문헌[Miller et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., Nat. Biotechnol. (2011) 29:731-734] 참조.

[1595] b. TALEN

[1596] TALEN은 표적 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 핵산분해효소의 또 다른 예이다. TALEN은 TALE 반복부로 명명된 DNA 결합 도메인에서 유래되며, 이는 일반적으로 확장된 DNA 서열에 결합하고 이를 인식하는 10 내지 30개의 반복부를 갖는 탠덤 어레이를 포함한다. 각각의 반복부는 33 내지 35개 아미노산 길이이며, 네 개의 DNA 염기쌍 중 하나에 특이성을 부여하는 두 개의 인접한 아미노산(반복부-가변성 두 개 잔기 또는 RVD로 명명됨)을 갖는다. 따라서, 표적 DNA 서열의 반복부 및 염기쌍 사이에는 일-대-일 대응이 있다.

[1597] TALEN은 하나 이상의 TALE DNA 결합 도메인(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상)을 핵산분해효소 도메인, 예를 들어, FokI 핵산내부분해효소 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생산된다. 문헌[Zhang, *Nature Biotech.* (2011) 29:149-153] 참조. TALEN에서의 사용을 위해 FokI에 대한 여러 돌연변이가 만들어졌으며, 예를 들어 이는 절단 특이성 또는 활성을 개선한다. 문헌[Cermak et al., *Nucl. Acids Res.* (2011) 39:e82; Miller et al., *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148; Hockemeyer et al., *Nature Biotech.* (2011) 29:731-734; Wood et al., *Science* (2011) 333:307; Doyon et al., *Nature Methods* (2010) 8:74-79; Szczepek

et al., *Nature Biotech* (2007) 25:786-793; Guo et al., *J. Mol. Biol.* (2010) 200:96] 참조. FokI 도메인은 이량체로서 기능하여, 적절한 배향 및 간격을 갖는, 표적 유전체 내의 부위에 대한 독특한 DNA 결합 도메인을 갖는 두 개의 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 핵산분해효소 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수 및 두 개의 개별적인 TALEN 결합 부위들 사이의 염기의 수 모두는, 높은 수준의 활성을 달성하기 위해 중요한 파라미터인 것으로 여겨진다. 문헌[Miller et al., *Nature Biotech.* (2011) 29:143-148] 참조.

[1598] 조작된 TALE 반복부를 핵산분해효소 도메인과 조합함으로써, 부위-특이적 핵산분해효소가 임의의 원하는 DNA 서열에 특이적으로 생성될 수 있다. ZFN과 유사하게, TALEN은 세포 내로 도입되어 유전체 내의 원하는 표적 부위에서 DSB를 생성할 수 있고, 따라서 유사한 HDR-매개 경로에서 유전자 녹아웃 또는 돌연변이 녹인에 사용될 수 있다. 문헌[Boch, *Nature Biotech.* (2011) 29:135-136; Boch et al., *Science* (2009) 326:1509-1512; Moscou et al., *Science* (2009) 326:3501] 참조.

[1599] c. 메가핵산분해효소

[1600] 메가핵산분해효소는 핵산내부분해효소 족의 효소이며, 이는 큰 DNA 서열(14 내지 40개 염기쌍)을 인식하고 절단하는 능력을 특징으로 한다. 메가핵산분해효소는 핵산분해효소 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 이들의 구조 모티프를 기반으로 한 족들로 그룹화된다. 메가핵산분해효소는 핵산분해효소 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 이들의 구조 모티프에 기반한 족들로 그룹화된다. 가장 널리 퍼져 있고 가장 잘 알려져 있는 메가핵산분해효소는 LAGLIDADG 족의 단백질이며, 이 명칭은 보존된 아미노산 서열에 기인한다. 문헌[Chevalier et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18): 3757- 3774] 참조. 한편, GIY-YIG 족 구성원은 잔기 길이가 70-100개이며, 네 개의 불변 잔기를 갖는 네 개 또는 다섯 개의 보존된 서열 모티프를 포함하고, 두 개의 불변 잔기가 활성에 필요한, GIY-YIG 모듈을 갖는다. 문헌[Van Roey et al., *Nature Struct. Biol.* (2002) 9:806-811] 참조. His-Cys족 메가핵산분해효소는 수백 개의 아미노산 잔기를 포함하는 영역에 걸쳐 고도로 보존된 일련의 히스티딘과 시스테인을 특징으로 한다. 문헌[Chevalier et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774] 참조. NHN족의 구성원은 아스파라긴 잔기로 둘러싸인 두 쌍의 보존된 히스티딘을 함유하는 모티프로 정의된다. 문헌[Chevalier et al., *Nucleic Acids Res.* (2001) 29(18):3757-3774.] 참조.

[1601] 높은 특이성 요건으로 인해 특정 표적 DNA 서열에 대한 천연 메가핵산분해효소의 확인 가능성은 낮기 때문에, 돌연변이유발 및 고속 대량 선별 방법을 비롯한 다양한 방법을 사용하여 독특한 서열을 인식하는 메가핵산분해효소 변이체를 생성하였다. 예를 들어, 예정된 핵산 서열에 결합하기 위해 변경된 DNA-결합 특이성을 갖는 메가핵산분해효소를 조작하기 위한 전략은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Chevalier et al., *Mol. Cell.* (2002) 10:895-905; Epinat et al., *Nucleic Acids Res* (2003) 31:2952-2962; Silva et al., *J Mol. Biol.* (2006) 361:744-754; Seligman et al., *Nucleic Acids Res* (2002) 30:3870-3879; Sussman et al., *J Mol Biol* (2004) 342:31-41; Doyon et al., *J Am Chem Soc* (2006) 128:2477-2484; Chen et al., *Protein Eng Des Sel* (2009) 22:249-256; Arnould et al., *J Mol Biol.* (2006) 355:443-458; Smith et al., *Nucleic Acids Res.* (2006) 363(2):283-294] 참조.

[1602] ZFN 및 TALEN과 마찬가지로, 메가핵산분해효소는 유전체 DNA에서 DSB를 생성할 수 있으며, 이는 예컨대, NHEJ를 통해 부적절하게 복구되는 경우 프레임-이동 돌연변이를 생성하여 세포에서 표적 유전자의 발현의 감소를 야기할 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 메가핵산분해효소와 함께 세포 내로 도입될 수 있다. 외래 DNA 및 염색체 서열에 따라, 이 과정은 표적 유전자를 변형시키는 데 사용될 수 있다. 문헌[Silva et al., *Current Gene Therapy* (2011) 11:11-27] 참조.

[1603] d. 전위효소

[1604] 전위효소는 전위인자의 단부에 결합하고, 잘라 붙이기 메커니즘 또는 복제 전위 메커니즘에 의해 유전체의 다른 부분으로 이의 이동을 촉진시키는 효소이다. CRISPR/Cas 시스템과 같은 다른 시스템에 전위효소를 연결함으로써, 유전체 DNA의 부위 특이적 삽입 또는 조작을 가능하게 하기 위해 새로운 유전자 편집 도구가 개발될 수 있다. 촉매적으로 불활성인 Cas 효과기 단백질 및 Tn7-유사 전위인자를 사용하는 전위인자를 이용하는 두 개의 알려진 DNA 통합 방법이 있다. 전위효소-의존적 DNA 통합은 유전체에서 DSB를 유발하지 않으며, 이는 더 안전하고 더 특이적인 DNA 통합을 보장할 수 있다.

[1605] e. CRISPR/Cas

[1606] CRISPR 시스템은 획득 면역의 형태를 제공하는 침입 파지 및 플라스미드에 대한 방어에 관련된 시스템으로서, 본래 원핵 생물(예를 들어, 박테리아 및 고세균)에서 발견되었다. 지금은 연구 및 임상 응용 분야에서 인기 있

는 유전자 편집 도구로 채택되어 사용되고 있다.

[1607] CRISPR/Cas 시스템은 일반적으로 적어도 두 개의 구성성분, 즉 하나 이상의 안내 RNA[gRNA] 및 Cas 단백질을 포함한다. Cas 단백질은 DSB를 표적 부위에 도입하는 핵산분해효소이다. CRISPR-Cas 시스템은 두 개의 주요 부류에 속하는데, 클래스 1 시스템은 다중 Cas 단백질의 복합체를 사용하여 핵산을 분해하고, 클래스 2 시스템은 동일한 목적을 위해 단일의 거대한 Cas 단백질을 사용한다. 클래스 1은 I, III 및 IV형으로 나누어지고, 클래스 2는 II, V 및 VI형으로 나누어진다. 유전자 편집 적용에 적합한 상이한 Cas 단백질은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, 및 Mad7을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Jinek et al., *Science* (2012) 337(6096):816-821; Dang et al., *Genome Biology* (2015) 16:280; Ran et al., *Nature* (2015) 520:186-191; Zetsche et al., *Cell* (2015) 163:759-771; Strecker et al., *Nature Comm.* (2019) 10:212; Yan et al., *Science* (2019) 363:88-91] 참조. 가장 널리 사용되는 Cas9는 II형 Cas 단백질이고, 본원에 예시로서 기재된다. 이들 Cas 단백질은 상이한 공급원 종으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas9는 S. 피오게네스 또는 S. 아우레우스로부터 유래될 수 있다.

[1608] 원래의 미생물 유전체에서, II형 CRISPR 시스템은 숙주 유전체 내의 배열로서 암호화된 CRISPR 반복부 서열 사이에서 침입 DNA의 서열을 통합한다. CRISPR 반복부 배열 유래의 전사체는 '프로토스페이서' 서열뿐만 아니라 CRISPR 반복부의 부분으로 알려진 침입 DNA에서 전사된 가변 서열을 각각 보유하는 CRISPR RNA(crRNA)로 가공된다. 각각의 crRNA는 제2 전사활성 CRISPR RNA[tracrRNA]와 혼성화하고, 이들 두 RNA는 Cas9 핵산분해효소와 복합체를 형성한다. crRNA의 프로토스페이서-암호화된 부분은 Cas9 복합체가 상보적 표적 DNA 서열을 절단하도록 지시하며, 단, 이들은 '프로토스페이서 인접 모티프'[PAM]로서 알려진 짧은 서열에 인접한다.

[1609] 전술한 설명은 Cas9 핵산분해효소에 중점을 두었지만, 일부 방법에서 이 부분에 대해 기재된 것과 상이한 gRNA를 이용하는 다른 RNA-안내 핵산분해효소가 존재한다는 것이 인식되어야 한다. 예를 들어, Cpf1(Cas12a로도 알려진, 프레보텔라(Prevotella) 및 프란시셀라 1(Francisciella 1) 유래의 CRISPR)은 crRNA만을 필요로 하며 tracrRNA가 기능할 필요가 없는 RNA-안내 핵산분해효소이다.

[1610] 이의 발견 이후로, CRISPR 시스템은 박테리아에서부터 인간 세포를 포함하는 진핵 세포까지 걸쳐 매우 다양한 세포 및 생물에서 서열 특이적 DSB 및 표적화된 유전체 편집을 유도하는 데 적합하게 되었다. 유전자 편집 적용 분야에서의 이의 사용에서, 인공적으로 설계된, 합성 gRNA는 특정 구현예에서 단일 gRNA를 통한 것을 비롯하여, 본래의 crRNA:tracrRNA 복합체를 대체하였다. 예를 들어, gRNA는 crRNA, 테트라루프 및 tracrRNA로 구성된 단일 안내 RNA[sgRNA]일 수 있다. crRNA는 보통 관심의 표적 DNA를 인식하도록 사용자-설계된 상보적 영역(스페이서로도 명명되며, 보통 약 20개의 뉴클레오티드 길이임)을 포함한다. tracrRNA 서열은 Cas 핵산분해효소 결합에 대한 뼈대 영역을 포함한다. crRNA 서열 및 tracrRNA 서열은 테트라루프에 의해 연결되고, 각각은 서로 혼성화를 위해 짧은 반복부 서열을 갖고, 따라서, 키메라 sgRNA를 생성한다. gRNA에 존재하는 스페이서 또는 상보적 영역 서열을 간단히 변화시킴으로써 Cas 핵산분해효소의 유전체 표적을 변화시킬 수 있다. 상보적 영역은 표준 RNA-DNA 상보적 염기쌍 형성 규칙을 통해 Cas 핵산분해효소를 표적 DNA 부위로 향하게 할 것이다.

[1611] Cas 핵산분해효소가 기능하기 위해서는, 유전체 DNA에서 표적 서열의 바로 하류에 PAM이 있어야 한다. Cas 단백질에 의한 PAM의 인식은 인접한 유전체 서열을 탈안정화시켜, gRNA에 의한 서열의 조사를 가능하게 하고 일치 서열이 존재할 때 gRNA-DNA 짝짓기를 일으키는 것으로 여겨진다. PAM의 특이적 서열은 Cas 유전자의 종에 따라 다르다. 예를 들어, S. 피오게네스에서 유래한 가장 통상적으로 사용되는 Cas9 핵산분해효소는 5'-NGG-3' 또는 덜 효율적인 비로, 5'-NAG-3'의 PAM 서열을 인식하며, 여기서 'N'은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대안적인 PAM을 갖는 다른 Cas 핵산분해효소 변이체가 또한 특징화되었고, 아래의 표 1a에 요약된 유전체 편집에 성공적으로 사용되었다.

[1612] 일부 구현예에서, Cas 핵산분해효소는 이들의 활성, 특이성, 인식 및/또는 다른 특징을 변경시키기 위해 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, Cas 핵산분해효소는 표적 이탈 효과를 완화시키기 위해 이의 정확도를 변경시키는 하나 이상의 돌연변이(예를 들어, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 evoSpCas9)를 가질 수 있다. 다른 예를 들어, Cas 핵산분해효소는 PAM 특이성을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다.

[1613] 일부 구현예에서, 본 개시의 CRISPR 시스템은 TnpB 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드

는 Ruv-C-유사 도메인을 포함할 수 있다. RuvC 도메인은 RuvC-I, RuvC-II 및 RuvC-III 하위도메인을 포함하는 분할된 RuvC 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, TnpB는 HTH 도메인, 다리 나선 도메인 및 아연 집게 도메인 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. TnpB 폴리펩티드는 HNH 도메인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, TnpB 단백질은 N-말단에서 출발하는, HTH 도메인, RuvC-I 하위도메인, 다리 나선 도메인, RuvC-II 하위도메인, 아연 집게 도메인 및 RuvC-III 하위도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, RuvC-III 하위도메인은 TnpB 폴리펩티드의 C-말단을 형성한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 엡실론프로테오박테리아(*Epsilonproteobacteria*) 세균, 악티노플레인즈 로바투스(*Actinoplanes lobatus*) 균주 DSM 43150, 악티노마두라 셀룰로실리티카(*Actinomadura celluolosilytica*) 균주 DSM 45823, 악티노마두라 나미비엔시스(*namibiensis*) 균주 DSM 44197, 알리시클로바실러스 마크로스파란지두스(*Alicyclobacillus macrosprangiidus*) 균주 DSM 17980, 리핑잔겔라 할로필라(*Lipingzhangella halophila*) 균주 DSM 102030, 또는 크테도노박터 레세미퍼(*Ktedonobacter recemifer*)에서 유래한다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드는 크테도노박터 라세미퍼로부터 유래하거나, 또는 K. 라세미퍼 TnpB 좌위의 5'ITR과 유사한 보존된 RNA 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, TnpB는 진핵 유전체에서 발견되는 TnpB 동족체인 판조르 단백질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, TnpB 폴리펩티드를 포함하는 CRISPR 시스템은 표적 폴리뉴클레오티드의 표적 인접 모티프[TAM] 서열 5'에 결합한다. 일부 구현예에서, TAM은 전위인자-연관 모티프이다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TCA를 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TTCAN을 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 TTGAT를 포함한다. 일부 구현예에서, TAM 서열은 ATAAA를 포함한다.

[1614] 특정 구현예에서, 제1 및/또는 제2 이식유전자는 기재된 바와 같은 유전자 편집 시스템(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)과 연관된 HDR을 통해 표적 부위 내로 통합되는 DNA 복구 주형으로서 기능할 수 있다. 일반적으로, 삽입될 이식유전자는 적어도 관심 단백질(예를 들어, 관용원성 인자 또는 CAR)을 암호화하는 발현 카세트를 포함할 것이고, 임의로 또한 하나 이상의 조절 요소(예를 들어, 프로모터, 절연체, 인핸서)를 포함할 것이다. 이러한 특정 구현예에서, 삽입될 이식유전자는 표적의 바로 상류 및 하류의 상동성 서열, 즉, 표적 유전체 좌위가 HDR에 대한 주형으로서 작용하도록 특이적으로 설계된 좌측 상동성 팔[left homology arm, LHA] 및 우측 상동성 팔[RHA]에 측면 근접될 것이다. 각각의 상동성 팔의 길이는 일반적으로 도입되는 삽입의 크기에 따르며, 삽입이 클수록 더 긴 상동성 팔을 필요로 한다.

[1615] 일부 구현예에서, 표적-프라임화된 역전사[TPRT] 또는 프라임 편집은 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 암호화하는 외인성 이식유전자와 같은 외인성 유전자를 특정 좌위 내로 조작하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 프라임 편집은 DSB 또는 공여자 DNA 주형을 필요로 하지 않고 인간 세포에서 표적화된 삽입, 결실, 모든 12개의 가능한 염기-대-염기 전환 및 이들의 조합을 매개한다.

[1616] 프라임 편집은 중합효소와 회합하여 작동하는(즉, 융합 단백질의 형태로 또는 그렇지 않으면 napDNAbp와 함께 트랜스로 제공되는) 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질['napDNAbp']을 사용하여 새로운 유전 정보를 특정된 DNA 부위에 직접 기록하는 유전체 편집 방법이며, 여기서 프라임 편집 시스템은 표적 부위를 특정하고 안내 RNA 상에(예를 들어, 5' 또는 3' 단부, 또는 안내 RNA의 내부 부분에) 조작된 연장부(DNA 또는 RNA)를 통한 대체 DNA 가닥의 형태로 원하는 편집의 합성을 주형화하는 프라임 편집[PE] 안내 RNA['PEgRNA']로 프로그램된다. 원하는 편집(예를 들면, 단일 핵염기 치환)을 함유하는 대체 가닥은 (원하는 편집을 포함하는 것을 제외하고는) 편집될 표적 부위의 내인성 가닥과 동일한 서열을 공유한다. DNA 복구 및/또는 복제 기구를 통해, 표적 부위의 내인성 가닥은 원하는 편집을 함유하는 새로 합성된 대체 가닥으로 대체된다. 일부 경우에서, 프라임 편집기는 편집될 원하는 표적 부위를 검색 및 위치시키고, 동시에 상응하는 표적 부위 내인성 DNA 가닥 대신에 도입되는 원하는 편집을 함유하는 대체 가닥을 암호화하기 때문에, 프라임 편집은 '검색 및 대체' 유전체 편집 기술로 생각될 수 있다. 예를 들어, 프라임 편집은 이중 가닥 파손을 우회하기 위해 정밀 CRISPR/Cas 기반 유전체 편집을 수행하도록 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상동성 단백질은 안내 RNA로 특정 DNA 서열을 표적화하고, 표적 부위에서 단일 가닥 틈을 생성하고, 안내 RNA와 통합되는 조작된 역전사제 주형의 역전사용 프라이머로서 틈이 생성된 DNA를 사용하기 위한 Cas 단백질-역전사효소 융합체 또는 관련 시스템이거나 이를 암호화한다. 일부 구현예에서, 프라임 편집기 단백질은 유전체 DNA의 대향하는 가닥상에서 상보적 DNA 플랩의 합성을 주형화하는 두 개의 프라임 편집 안내 RNA[pegRNA]와 쌍을 이루어, 그 결과 PE-유도된 틈 부위 사이의 내인성 DNA 서열을 pegRNA-암호화된 서열로 대체시킨다.

[1617] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 역전사효소 또는 당업계에 알려진 임의의 DNA 중합효소인 프라이머 편집기와 회합된다. 따라서, 일 양태에서, 프라임 편집기는 DNA 서열을 표적 DNA에 있는 상보적인 프로토스페이서에 어닐링하는 스페이서 서열을 함유하는 특수화된 안내 RNA(즉, PEgRNA)와 회합시킴으로써, 그 DNA 서열을 표적화하도록 프로그램된 Cas9(또는 등가의 napDNAbp)를 포함할 수 있다. 그러한 방법은 문헌[Anzalone et al.,

(doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4)], 또는 PCT 공개 번호 제WO2020191248호, 제WO2021226558호, 또는 제WO2022067130호에 개시된 임의의 것을 포함하며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[1618] 일부 구현예에서, 염기 편집 기술은 살아있는 세포 내의 DNA 또는 RNA 내로 단일 뉴클레오티드 변이체[SNV]를 도입하기 위해 사용될 수 있다. 염기 편집은 DSB를 생성하지 않고 RNA 또는 DNA에 점 돌연변이를 도입할 수 있는 CRISPR-Cas9 기반 유전체 편집 기술이다. 염기 편집기[BE]는 일반적으로 Cas('CRISPR 연관') 도메인과 핵염기 변형 도메인(예를 들어, APOBEC1['아포지질단백질 B mRNA 편집 효소, 촉매 폴리펩티드 1'], CDA['시티딘 탈아미노효소'] 및 AID['활성화 유도된 시티딘 탈아미노효소']를 포함하는 시티딘 탈아미노효소와 같은 천연 또는 진화된 탈아미노효소)의 융합체이다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 생성된 단일 뉴클레오티드 변화의 효율 및/또는 안정성을 증가시키기 위해 세포 DNA 복구 과정을 변경하는 단백질 또는 도메인을 포함할 수도 있다. 염기 편집기의 두 가지 주요 부류인, C:G에서 T:A로의 전환을 허용하는 시티딘 염기 편집기[CBE](예를 들어, BE4) 및 A:T에서 G:C로의 전환을 허용하는 아데닌 염기 편집기[ABE](예를 들어, ABE7.10)이 개발되었다. 염기 편집기는 탈아미노효소에 융합되고 sgRNA에 의해 관심 좌위로 안내되는 촉매적으로 사멸한 Cas9[dCas9] 또는 틈내기효소 Cas9[nCas9]에 의해 구성된다. d/nCas9는 특정 PAM 서열을 인식하고, sgRNA와 PAM의 상류에 일반적으로 위치한 DNA 서열(프로토스페이서라고도 명명됨) 사이의 상보성으로 인해 DNA가 풀린다. 그런 다음, 반대쪽 DNA 가닥이 탈아미노효소에 접근할 수 있는데, 이는 프로토스페이서의 특정 DNA 구간에 위치한 염기를 전환한다. HDR 기반 전략과 비교하여, 염기 편집은 실패한 HDR-매개 유전자 교정과 연관된 NHEJ에 의한 유전자 파괴를 피하기 때문에, 유전적 돌연변이를 정밀하게 교정하는 유망한 도구이다. 탈활성화된 Cas9[dCas9]에 융합된 추가 래트 탈아미노효소 APOBEC1[rAPOBEC1]을 사용하여 시티딘을 sgRNA의 PAM의 상류에서 티미딘으로 성공적으로 전환했다. 일부 구현예에서, 이러한 제1 BE 시스템은 dCas9를, 탈아미노화된 시티딘의 반대편의 가닥을 틈내는 '틈내기효소' Cas9 D10A로 변경함으로써 최적화되었다. 이론에 매이지는 않지만, 이는 긴 패치 염기 절제 복구[BER]를 시작할 것으로 예상되며, 여기에서 탈아미노 가닥은 우선적으로 U:A 염기쌍을 생성하기 위해 복구를 주형화하는데 사용되며, 이는 이후 DNA 복제 동안 T:A로 전환된다.

[1619] 일부 구현예에서, 염기 편집기는 촉매적으로 불활성인 제1 DNA 결합 단백질 도메인, 염기 편집 활성을 갖는 도메인 및 틈내기효소 활성을 갖는 제2 DNA 결합 단백질 도메인을 함유하는 핵염기 편집기이며, 여기서 DNA 결합 단백질 도메인은 단일 융합 단백질이거나, (예를 들어, 별도의 발현 벡터에서) 별도로 발현된다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 염기 편집 활성을 갖는 도메인(예를 들어, 시티딘 탈아미노효소 또는 아데노신 탈아미노효소), 및 두 개의 핵산 프로그래밍 가능 DNA 결합 단백질 도메인[napDNAbp]을 포함하는 융합 단백질이며, 첫 번째는 틈내기효소 활성을 포함하고 두 번째 napDNAbp는 촉매적으로 불활성이며, 여기서 적어도 두 개의 napDNAbp는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 틈내기효소 활성을 갖는 CRISPR-Cas(예를 들어, Cas9)의 DNA 도메인(nCas; nCas9), 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 활성을 갖는 CRISPR-Cas 단백질(예를 들어, Cas9)의 촉매적 불활성 도메인(dCas; 예를 들어, dCas9), 및 탈아미노효소 도메인을 포함하는 융합 단백질이며, 여기서 dCas는 링커에 의해 nCas에 결합되고, dCas는 탈아미노효소 도메인에 바로 인접한다. 일부 구현예에서, 염기 편집기는 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기이다. 예시적인 염기 편집기 및 염기 편집기 시스템은 특허 공개 번호 제US20220127622호, 제US20210079366호, 제US20200248169호, 제US20210093667호, 제US20210071163호, 제WO2020181202호, 제WO2021158921호, 제WO2019126709호, 제WO2020181178호, 제WO2020181195호, 제WO2020214842호, 제WO2020181193호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 포함된다.

[1620] 일부 구현예에서, 유전자 편집 기술은 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE]이다. 일부 양태에서, PASTE는 유전체 삽입이 역전사효소 및 세린 통합효소 모두에 융합된 CRISPR-Cas9 틈내기효소를 통해 유도되는 플랫폼이다. 문헌[Ioannidi et al.,(doi.org/10.1101/2021.11.01.466786)]에 설명된 바와 같이, PASTE는 이중 가닥 파손을 생성하지 않지만, ~36kb만큼 큰 서열의 통합을 허용한다. 일부 구현예에서, 세린 통합효소는 당업계에 알려진 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 세린 통합효소는 PASTE가 다중 유전자 통합에 사용될 수 있도록 충분한 직교성을 가지며, 동시에 적어도 두 개의 유전체 좌위에서 적어도 두 개의 상이한 유전자를 통합한다. 일부 구현예에서, PASTE는 비분열 세포에서의 활성 및 더 적은 검출 가능한 표적 이탈 발생과 함께, 상동성 유도 복구 또는 비-상동성 단부 결합 기반 통합의 편집 효율에 필적하거나, 그보다 더 나은 편집 효율을 갖는다.

[1621] 3. 제1 이식유전자 삽입을 위한 유전체 좌위

[1622] 일부 구현예에서, 내인성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자의 부위-유도 삽입을 위한 유전체 좌위는 내인성 TCR 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 내인성 TCR 유전자좌는 TRAC1 좌위 및 TRBC2 좌위로 이루어진 군에서 선택

된다. 유전자좌 내에서 삽입을 위한 특정 부위는, 유전자 코딩 영역(코딩 서열 또는 'CDS'로도 알려짐), 엑손, 인트론, 엑손의 일부 및 인접한 인트론의 일부에 걸쳐있는 서열, 또는 조절 영역(예를 들어, 프로모터, 인핸서)를 포함하는, 유전자의 임의의 적합한 영역에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 삽입은 특정 유전체 좌위의 하나의 대립유전자에서 일어난다. 일부 구현예에서, 삽입은 특정 유전체 좌위의 대립유전자 둘 다에서 일어난다. 이들 구현예 중 하나에서, 표적 유전체 좌위에 삽입된 이식유전자의 배향은 해당 좌위에서 내인성 유전자의 방향과 동일하거나 반대일 수 있다.

[1623] a. TRAC

[1624] TCR은 소형 펩티드로 처리되고 항원 제시 세포[APC]의 표면에서 MHC 분자에 결합된 외래 항원을 인식한다. 각각의 TCR은 하나의 알파 및 하나의 베타 사슬(가장 흔함) 또는 하나의 델타 및 하나의 감마 사슬로 이루어진 이량체이다. TCR 알파 사슬을 암호화하는 유전자는 염색체 14상에 군집된다. TCR 알파 사슬은, N-말단 항원 인식 도메인을 암호화하는 적어도 70개의 가변(V) 유전자 중 하나가 61개의 연결(J) 유전자분절 중 1개로 재배열됨으로써, 분자의 C-말단 부분을 암호화하는 불변 영역 유전자 분절에 전사 및 스플라이싱되는 기능적 가변 영역을 생성시킬 때, 형성된다. 한편, 베타 사슬은 V, D(다양성) 및 J 분절 유전자의 재조합에 의해 생성된다.

[1625] TRAC 유전자는 TCR 알파 사슬 불변 영역을 암호화한다. 인간 TRAC 유전자는 염색체 14의 22,547,506-22,552,156 전방 가닥에 존재한다. TRAC 유전체 서열은 Ensembl ID ENSG00000277734에 기재되어 있다.

[1626] b. TRBC1 및 TRBC2

[1627] TRBC 유전자는 TCR 베타 사슬 불변 영역을 암호화한다. TRBC1 및 TRBC2는 동일한 유전자의 유사체이고, T 세포는 상호 배타적으로 TRBC1 및 TRBC2를 발현한다. 인간 TRBC1 유전자는 142,791,694-142,793,368의 전방 가닥에서 염색체 7상에 존재하고, 그의 유전체 서열은 Ensembl ID ENSG00000211751에 기재되어 있다. 인간 TRBC2 유전자는 142,801,041-142,802,748의 전방 가닥에서 염색체 7상에 존재하고, 그의 유전체 서열은 Ensembl ID ENSG00000211772에 기재되어 있다.

[1628] 4. 제2 이식유전자의 삽입을 위한 유전체 좌위

[1629] 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 제2 이식유전자의 삽입을 위한 유전체 좌위는 (무작위 삽입에 의한) 무작위 좌위 또는 (부위-유도 삽입에 의한) 특이적 좌위일 수 있다. 특정 좌위가 요구되는 경우, 이는 제1 이식유전자의 좌위와 동일하거나 상이한 좌위일 수 있다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 제2 유전자에 대한 유전체 좌위는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, 및 피난항 좌위로 이루어진 군에서 선택된 특이적 좌위이다. 피난항 좌위의 비제한적 예는 AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐), ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3(CD142로도 알려짐), FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1(CD91로도 알려짐), MICA, MICB, RHD, ROSA26 및 SHS231 유전자좌를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 제2 이식유전자의 삽입을 위한 유전체 좌위는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, AAVS1(PPP1R12C로도 알려짐) 좌위, ABO 좌위, CCR5 좌위, CLYBL 좌위, CXCR4 좌위, F3(CD142로도 알려짐) 좌위, FUT1 좌위, HMGB1 좌위, KDM5D 좌위, LRP1 (CD91로도 알려짐) 좌위, MICA 좌위, MICB 좌위, RHD 좌위, ROSA26 좌위, 또는 SHS231 좌위를 포함하는 특이적 좌위이다. 제2 이식유전자는, 유전자 코딩 영역(코딩 서열 또는 'CDS'로도 알려짐), 엑손, 인트론, 엑손의 일부 및 인접한 인트론의 일부에 걸쳐있는 서열, 또는 조절 영역(예를 들어, 프로모터, 인핸서)를 포함하는, 기재된 좌위의 임의의 적합한 영역 내에 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 삽입은 유전체 좌위의 하나의 대립유전자에서 일어난다. 일부 구현예에서, 삽입은 유전체 좌위의 대립유전자 둘 다에서 일어난다. 이들 구현예 중 하나에서, 유전체 좌위에 삽입된 이식유전자의 배향은 해당 좌위에서 유전자의 방향과 동일하거나 반대일 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 이식유전자는 제1 이식유전자와 같은 제1 이식유전자와 함께 삽입되고, 제2 이식유전자는 다중시스트론성 벡터에 의해 운반된다.

[1630] 5. 부위-유도 삽입을 위한 안내 RNA[gRNA]

[1631] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 다양한 구현예에 따라, 특히 CRISPR/Cas 시스템과 관련하여 이식유전자의 부위-유도 삽입에 사용하기 위한 gRNA가 제공된다. gRNA는 crRNA 서열을 포함하고, 이는 결국 관심의 상보적 표적 DNA를 인식하고 이에 결합하는 상보적 영역(스페이서로도 불림)을 포함한다. 스페이서 또는 상보적 영역의 길이는 일반적으로 15 내지 30개의 뉴클레오티드, 보통 약 20개의 뉴클레오티드 길이지만, 특정 CRISPR/Cas 시스템의 필요에 근거하여 다를 것이다. 특정 구현예에서, 스페이서 또는 상보적 영역은 표적 DNA 서열에 완전히 상보적이다. 다른 구현예에서, 스페이서는 표적 DNA 서열에 부분적으로 상보적, 예를 들어 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 상보적이다.

[1632] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 핵산분해효소에 대한 결합을 위한 뼈대 영역을 포함하는 tracrRNA 서열을 더 포함한다. tracrRNA의 길이 및/또는 서열은 편집을 위해 사용되는 특정 핵산분해효소에 따라 다를 수 있다. 특정 구현예에서, gRNA에 의한 핵산분해효소 결합은 tracrRNA 서열을 필요로 하지 않는다. gRNA가 tracrRNA를 포함하는 해당 구현예에서, crRNA 서열은 tracrRNA의 상보적 서열과 혼성화를 위한 반복부 영역을 더 포함할 수 있다.

[1633] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 gRNA는 둘 이상의 gRNA 분자, 예를 들어, 두 개의 별개의 분자로서 crRNA 및 tracrRNA를 포함한다. 다른 구현예에서, gRNA는 단일 RNA 분자상에 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 sgRNA를 포함하는, 단일 안내 RNA[sgRNA]이다. 이러한 특정 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA는 개재 테트라루프에 의해 연결된다.

[1634] 일부 구현예에서, 하나의 gRNA는 관심의 유전자좌의 표적화된 편집을 위해 부위-유도 핵산분해효소와 공동으로 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 관심의 동일한 유전자좌를 표적화하는 둘 이상의 gRNA는 부위-유도 핵산분해효소와 공동으로 사용될 수 있다.

[1635] 일부 구현예에서, Cas9 및 Cas12b(C2c1)을 비롯하여, crRNA와 tracrRNA를 둘 다 필요로 하는 다양한 통상적인 Cas 핵산분해효소와 함께 사용하기 위한 예시적인 gRNA(예를 들어, sgRNA)가 표 27에 제공된다. 예를 들어, 문헌[Jinek et al., *Science* (2012) 337 (6096):816-821; Dang et al., *Genome Biology* (2015) 16:280; Ran et al., *Nature* (2015) 520:186-191; Strecker et al., *Nature Comm.* (2019) 10:212] 참조. 각각의 예시적인 gRNA의 경우, 상보적 영역 또는 스페이서, crRNA 반복부 영역, 테트라루프 및 tracrRNA를 포함하는, gRNA의 상이한 부분에 대한 서열이 나타난다. 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 324, 서열 번호 325, 서열 번호 326, 서열 번호 327에 기재된 뉴클레오티드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 328, 서열 번호 329, 서열 번호 330, 서열 번호 331에 기재된 뉴클레오티드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 332, 서열 번호 333, 서열 번호 334, 서열 번호 335에 기재된 뉴클레오티드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 336, 서열 번호 337, 서열 번호 338, 서열 번호 339에 기재된 뉴클레오티드 서열의 모두 또는 일부를 포함한다.

[1636] 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 325, 서열 번호 329, 서열 번호 333, 또는 서열 번호 122A에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 crRNA 반복부 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 326 또는 서열 번호 337에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 테트라루프를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 서열 번호 327, 서열 번호 331, 서열 번호 335, 또는 서열 번호 336에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이들로 이루어지거나, 이들로 본질적으로 이루어진 tracrRNA를 포함한다.

[1637] [표 27] CRISPR/Cas에 대한 예시적인 gRNA 구조 및 서열

서열번호	서열 (5'→3')	설명
324	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	예시적인 spCas9 1 상보적 영역 (스페이서)
325	guuuuagagcua	예시적인 spCas9 1 crRNA 반복부 영역
326	gaaa	예시적인 spCas9 1 테트라루프
327	uagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaagug gcaccgagucggugcuuuuuu	예시적인 spCas9 1 tracrRNA
328	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	예시적인 spCas9 2 상보적 영역 (스페이서)
329	guuusagagcuaugcug	예시적인 spCas9 2 crRNA 반복부 영역
330	gaaa	예시적인 spCas9 2 테트라루프
331	cagcauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaa aguggcaccgagucggugcuuuuuu	예시적인 spCas9 2 tracrRNA
332	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	예시적인 saCas9 상보적 영역 (스페이서)
333	guuuuaguacucug	예시적인 saCas9 crRNA 반복부 영역
334	gaaa	예시적인 saCas9 테트라루프
335	cagaaucuacuaaaacaaggcaaaaugccguguuuaucucgucaac uuguuggcgagauuuuuu	예시적인 saCas9 tracRNA
336	gucgucuauaggacggcgaggacaacgggaagugccaaugugcuc uuuccaagagcaaacaccccguuggcuucaagaugaccgcucg	예시적인 AkCas12b tracRNA
337	aaaa	예시적인 AkCas12b 테트라루프
338	cgagcggucugagaaguggcacu	예시적인 AkCas12b crRNA 반복부 영역
339	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn	예시적인 AkCas12b 상보적 영역 (스페이서)

[1638]

[1639] s = c 또는 g; n = 임의의 염기

[1640] 일부 구현예에서, gRNA는 관심의 표적 유전자좌, 예를 들어, TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, 또는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, 및 SHS231 유전자좌로 이루어진 군에서 선택된 피난항 좌위에 특이적인 상보적 영역을 포함한다. 상보적 영역은, 예를 들어, CDS, 엑손, 인트론, 엑손의 일부 및 인접한 인트론의 일부에 걸쳐있는 서열, 또는 조절 영역(예를 들어, 프로모터, 인핸서)를 포함하는, 표적 유전자좌의 임의의 영역에서 서열에 결합할 수 있다. 표적 서열이 CDS, 엑손, 인트론, 또는 엑손 및 인트론의 일부에 걸쳐있는 서열인 경우, CDS, 엑손, 인트론 또는 엑손/인트론 경계는 표적 유전자의 임의의 스플라이스 변이체에 따라 정해질 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA에 의해 표적화된 유전체 좌위는 기재된 바와 같은 이의 임의의 좌위 또는 영역의 4000 bp 내에, 3500 bp 내에, 3000 bp 내에, 2500 bp 내에, 2000 bp 내에, 1500 bp 내에, 1000 bp 내에 또는 500 bp 내에 위치된다. 본원에 제공된 하나 이상의 gRNA 및 Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 조성물이 본원에서 추가로 제공된다. 이들 특정 구현예에서, 하나 이상의 gRNA 및 Cas 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터 내에 포함된다.

[1641] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 부위-유도 유전자 편집 접근에서 사용하기 위한 새로운 좌위 및/또는 gRNA 서열을 확인하는 방법이 제공된다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템의 경우, (예를 들어, 내인성 TCR 유

전자좌 내의) 특정 좌위에 대해 존재하는 gRNA를 알면, 보통 유전체에 걸쳐 100개의 염기쌍[bp]마다 발생하는 PAM 서열에 대한 좌위의 어느 하나의 측면상에서 측면 근접 영역을 스캐닝함으로써 이식유전자의 표적화된 삽입을 위한 추가적인 좌위를 확인하기 위해 '자벌레' 접근이 사용될 수 있다. PAM 서열은 사용되는 특정 Cas 핵산분해효소에 따라 달라질 것인데, 상이한 핵산분해효소는 대개 다른 상응 PAM 서열을 갖기 때문이다. 좌위의 어느 한 측면상에서의 측면 근접 영역은 약 500 내지 4000 bp 길이, 예를 들어, 약 500 bp, 약 1000 bp, 약 1500 bp, 약 2000 bp, 약 2500 bp, 약 3000 bp, 약 3500 bp 또는 약 4000 bp 길이일 수 있다. PAM 서열이 검색 범위 내에서 확인될 때, 이식유전자의 부위-유도 삽입에서 사용하기 위한 해당 좌위의 서열에 따라 새로운 안내가 설계될 수 있다. CRISPR/Cas 시스템이 예시로서 설명되지만, ZFN, TALEN, 메가핵산분해효소 및 전위효소를 이용하는 것을 비롯하여, 기재된 바와 같은 임의의 유전자 편집 접근이 새로운 좌위를 확인하는 방법에서 사용될 수 있다.

[1642] 일부 구현예에서, gRNA의 활성, 안정성 및/또는 다른 특징은 화학적 및/또는 서열 변형의 혼입을 통해 변경될 수 있다. 일례로서, 일시적으로 발현 또는 전달되는 핵산은, 예를 들어, 세포 핵산분해효소에 의해 분해되기 쉬울 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 gRNA는 핵산분해효소에 대해 안정성을 도입하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 특정 이론에 매이지 않고, 본원에 기재된 특정 변형된 gRNA는 세포, 특히 본 기술의 세포 집단에 도입될 때 감소된 선천성 면역 반응을 나타낼 수 있는 것으로 여겨진다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 '선천성 면역 반응'은 일반적으로 시토킨 발현 및 방출의 유도를 수반하는 바이러스 또는 박테리아 기원의 단일 가닥 핵산을 포함하는 외인성 핵산, 예를 들어 인터페론에 대한 세포 반응, 및 세포사를 포함한다. 안정성을 개선하고, 핵산분해효소 내성을 증가시키고/시키거나 면역 반응을 감소시키기 위한 gRNA의 다른 일반적인 화학적 변형에는 2'-O-메틸 변형, 2'-플루오로 변형, 2'-O-메틸 포스포로티오에이트 결합 변형 및 2'-O-메틸 3' 티오PACE 변형이 포함된다.

[1643] 하나의 공통 3' 단부 변형은 하나 이상의(전형적으로 5 내지 200개의) 아데닌(A) 잔기를 포함하는 폴리(A) 구역[tract]의 첨가이다. 폴리(A) 구역은 gRNA를 암호화하는 핵산 서열에 함유될 수 있거나 또는 화학적 합성 동안 또는 폴리아데노신 중합효소(예를 들어, 대장균 폴리(A) 중합효소)를 이용하는 시험관내 전사 후에 gRNA에 첨가될 수 있다. 생체내, 폴리(A) 구역은 폴리아데닐화 신호의 사용을 통해 DNA 벡터로부터 전사된 서열에 첨가될 수 있다. 이러한 신호의 예는 Maeder에 제공된다. 다른 적합한 gRNA 변형은 미국 특허 출원 공개 제US 2017/0073674 A1호 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2017/165862 A1호에 기재되어 있는 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않으며, 이들 각각의 전문은 본원에 참조로 포함된다.

[1644] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 gRNA를 설계하기 위한 도구는, Benchling, Broad Institute GPP, CasOFFinder, CHOCHOP, CRISPick, CRISPOR, Deskgen, E-CRISP, Geneious, Guides, Horizon Discovery, IDT, Off-Spotter, Synthgo, 또는 TrueDesign(ThermoFisher)을 포함한다. 당업자는 (예를 들어, 표적 이탈 변형을 제한하기 위해) 활성 및 특이성 둘 다를 예측하는 도구가 본원에 개시된 바와 같은 특정 경우에서 gRNA를 설계하는 데 유용할 것임을 이해할 것이다.

[1645] F. 숙주 세포 내로의 유전자 편집 시스템의 전달

[1646] 일부 구현예에서, 하나 이상의 gRNA, 부위-유도 핵산분해효소(예를 들어, Cas 핵산분해효소) 또는 부위-유도 핵산분해효소 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 및 표적화된 삽입을 위한 이식유전자를 포함하는, 본원에 기재된 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성성분을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 세포내로의 전달을 위해 제형화된다.

[1647] 일부 구현예에서, 하나 이상의 gRNA, 부위-유도 핵산분해효소(예를 들어, Cas 핵산분해효소) 또는 부위-유도 핵산분해효소 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 및 표적화된 삽입을 위한 이식유전자(예를 들어, 관용원성 인자를 암호화하는 제1 이식유전자 및/또는 CAR을 암호화하는 제2 이식유전자)를 포함하는, 본원에 제공된 유전자 편집 시스템의 구성성분은 전달 벡터의 형태로 세포에 전달될 수 있다. 전달 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스[AAV] 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 파지 및 HDR-기반 공여자 벡터를 포함하는, 세포 내로 뉴클레오티드 서열을 도입하는 데 적합한 임의의 유형의 벡터일 수 있다. 상이한 구성성분은 세포에 함께 또는 별개로 도입될 수 있고, 단일 벡터 또는 다중 벡터에 전달될 수 있다.

[1648] 일부 구현예에서, 전달 벡터는, 예를 들어, 바이러스 형질전환, 인산칼슘 형질감염, 지질-매개 형질감염, DEAE-덱스트란, 전기천공법, 미량주사법, 뉴클레오포레이션, 리포좀, 나노입자, 또는 다른 방법을 포함하는 당업계의 임의의 알려진 방법에 의해 세포에 도입될 수 있다.

[1649] 일부 구현예에서, 본 기술은 본원에 개시된 다양한 구현예에 따른 전달 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 보존제 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. '약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제'는 신체의 하나의 조직, 장기 또는 일부에서 신체의 다른 조직, 장기 또는 일부까지 관심 화합물을 운반 또는 수송하는데 관련되는 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭한다. 예를 들어, 담체 또는 부형제는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매, 또는 캡슐화 물질 또는 이의 일부 조합일 수 있다. 담체 또는 부형제의 각 구성성분은 '약학적으로 허용가능'해야 하며, 즉, 제형의 다른 성분과 양립 가능하여야 한다. 또한 접할 수 있는 신체의 임의의 조직, 장기 또는 일부와의 접촉에 적합하여야 하는데, 이는 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성 또는 치료적 이점을 과도하게 넘는 임의의 다른 합병증의 위험을 지니지 않아야 함을 의미한다. 적합한 부형제는 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤 등 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 세포를 포함하는 조성물은 적합한 주입 매질을 더 포함한다.

[1650] 일부 구현예에서, 하나 이상의 gRNA, 부위-유도 핵산분해효소(예를 들어, Cas 핵산분해효소) 또는 부위-유도 핵산분해효소 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 및 표적화된 삽입을 위한 이식유전자를 포함하는, 본원에 기재된 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성성분을 포함하는 세포 또는 이의 조성물이 제공된다.

[1651] **E. 조작된 세포의 예시적인 구현예**

[1652] 전술한 바와 같이, 본원에 개시된 공여자 능력에 대해 세포 집단을 프로파일링하는 방법은 유리하게는 세포 치료제를 제조하기 위한 전체 방법의 일부를 형성할 수 있다. 세포 치료제의 제조 공정에서, 예를 들어, 세포가 면역 인식을 회피하는 것을 돕기 위하여, 면역 세포 치료제에 바람직한 것으로 여겨지는 특정 변형이 세포에 도입될 수 있음이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 및 이의 집단은 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 및 이의 집단은 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 및 이의 집단은 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타낸다.

[1653] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 조작된 베타 섬 세포, 간세포, 또는 이식 동안 혈액과 접촉하게 되는 다른 세포 유형) 및 이의 집단은 CD47의 증가된 발현을 나타내고, 적어도 하나의 관용원성 인자의 발현은 증가하고, MHC 클래스 I 복합체의 하나 이상의 분자의 발현은 감소된다. 일부 구현예에서, 세포 및 그의 집단은 CD47의 증가된 발현, 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현, 및 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 복합체의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD46, CD59, DAF/CD55, 및 이들의 임의의 조합에서 선택된 하나 이상의 외인성 보체 억제제 폴리펩티드를 발현한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 관용원성 인자는 본원에 기재된 관용원성 인자 중 적어도 하나이다.

[1654] **F. 저면역원성 만능 세포에서 분화된 치료 세포**

[1655] 본원은 면역 인식을 회피하는 만능 줄기 세포에서 유래한 세포를 포함하는 저면역원성 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포는 환자 또는 대상(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 장애의 치료를 필요로 하는 수용자 대상에게 저면역원성 세포 집단의 반복 투약을 포함하는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[1656] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내도록 변형된다. 다른 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내도록 변형된다. 특정 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 TCR 복합체의 감소된 발현을 나타내도록 변형된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내도록 변형된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및 II 인간 백혈구 항원 및 TCR 복합체의 감소된 발현을 나타내도록 변형된다.

[1657] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및/또는 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내고 증가된 CD47 발현을 나타내도록 변형된다. 일부 경우에서, 세포는 하나 이상의 CD47 이식유전자를 보유함으로써 CD47을 과발현한다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내고

증가된 CD47 발현을 나타내도록 변형된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및 II 인간 백혈구 항원 및 TCR 복합체의 감소된 발현을 나타내고 증가된 CD47 발현을 나타내도록 변형된다.

[1658] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및/또는 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내고, 증가된 CD47 발현을 나타내고, 키메라 항원 수용체를 외인성으로 발현하도록 변형된다. 일부 경우에서, 세포는 하나 이상의 CD47 이식유전자를 보유함으로써 CD47 폴리펩티드를 과발현한다. 일부 경우에서, 세포는 하나 이상의 CAR 이식유전자를 보유함으로써 CAR 폴리펩티드를 과발현한다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현을 나타내고, 증가된 CD47 발현을 나타내고, 키메라 항원 수용체를 외인성으로 발현하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포는 MHC 클래스 I 및 II 인간 백혈구 항원 및 TCR 복합체의 감소된 발현을 나타내고, 증가된 CD47 발현을 나타내고, 키메라 항원 수용체를 외인성으로 발현하도록 변형된다.

[1659] 이러한 만능 줄기 세포는 저면역원성 줄기 세포이다. 이러한 분화된 세포는 저면역원성 세포이다.

[1660] 본원에 기재된 임의의 만능 줄기 세포는 생물 및 조직의 임의의 세포로 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 MHC 클래스 I 및/또는 II 인간 백혈구 항원의 감소된 발현 및 TCR 복합체의 감소된 발현을 나타낸다. 일부 경우에서, MHC 클래스 I 및/또는 II 인간 백혈구 항원의 발현은 동일한 세포 유형의 미변형된 세포 또는 야생형 세포와 비교하여 감소된다. 일부 경우에서, TCR 복합체의 발현은 동일한 세포 유형의 미변형된 세포 또는 야생형 세포와 비교하여 감소된다. 일부 구현예에서, 세포는 증가된 CD47 발현을 나타낸다. 일부 경우에서, CD47의 발현은 동일한 세포 유형의 미변형된 세포 또는 야생형 세포와 비교하여 본 개시에 포함된 세포에서 증가된다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 CAR 발현을 나타낸다. MHC 클래스 I 및/또는 II 인간 백혈구 항원 및 TCR 복합체의 수준을 감소시키고 CD47 및 CAR의 발현을 증가시키는 방법이 본원에 기재된다.

[1661] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 세포는, 환자(예컨대, 수용자 대상)에게 투여될 때 면역 인식 및 반응을 회피한다. 세포는 시험관 내 및 생체 내에서 면역 세포에 의한 사멸을 회피할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 대식세포, 및 NK 세포에 의한 사멸을 피한다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포 또는 대상의 면역계에 의해 무시된다. 즉, 본원에 기재된 방법에 따라 투여된 세포는 면역계의 면역 세포에 의해 탐지 가능하지 않다. 일부 구현예에서, 세포는 은폐되고 그에 따라서 면역 거부반응을 회피한다.

[1662] 만능 줄기 세포 및 이러한 만능 줄기 세포에서 분화된 임의의 세포가 면역 반응을 회피하는지의 여부를 결정하는 방법은, IFN-γ Elispot 분석, 미세아교세포 사멸 분석, 세포 생착 동물 모델, 시토킨 방출 분석, ELISA, 생물발광 영상화 또는 크롬 방출 분석, 또는 세포 분석을 위한 실시간, 정량 미세전자 바이오센서(biosensor) 분석(xCELLigence® RTCA 시스템, Agilent), 혼합-림프구 반응, 면역형광 분석, 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[1663] 본원에 약술된 치료성 세포는 장애, 예컨대 비제한적으로 암, 유전적 장애, 만성 감염성 질환, 자가면역 장애, 및 신경학적 장애 등을 치료하는 데 유용하다.

[1664] 1. 저면역원성 만능 세포에서 분화된 T 림프구

[1665] 본원에 제공된, T 림프구(일차 T 세포를 포함하는, T 세포)는 본원에 기재된 HIP 세포(예를 들어, 저면역원성 iPSC)에서 유래한다. 만능 줄기 세포(예컨대, iPSC)에서 CAR-T 세포를 포함하는 T 세포를 생성하는 방법은, 예를 들어, 문헌[Iriguchi et al., Nature Communications 12, 430 (2021); Themeli et al., Cell Stem Cell, 16(4):357-366 (2015); Themeli et al., Nature Biotechnology 31:928-933 (2013)]에 기재되어 있다.

[1666] T 림프구 유래 저면역원성 세포는 면역 인식을 회피하는 일차 T 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 일차 T 세포와 같은, T 세포에서부터 생산(예를 들어, 생성, 배양 또는 유래)된다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포는 대상 또는 개인에서 수득(예를 들어, 수확, 추출, 제거 또는 채취)된다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포는 T 세포가 하나 이상의 대상(예를 들어, 하나 이상의 건강한 인간을 비롯한, 하나 이상의 인간)에서 유래되도록 T 세포의 풀에서 생산된다. 일부 구현예에서, 일차 T 세포의 풀은 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 1 이상, 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 10 이상, 20 이상, 30 이상, 40 이상, 50 이상, 또는 100 이상의 대상에서 유래한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상은 환자(예를 들어, 치료성 세포가 투여된 수용자)와 상이하다. 일부 구현예에서, T 세포의 풀은 환자 유래의 세포를 포함하지 않는다. 일부 구현예

에서, T 세포의 풀이 수득되는 공여자 대상 중 하나 이상은 환자와 상이하다.

[1667] 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 환자(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 면역 반응을 활성화하지 않는다. 장애의 치료를 필요로 하는 대상(예컨대, 수용자) 또는 환자에 저면역원성 세포 집단을 투여함으로써 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 저면역원성 세포는 비제한적으로 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된(예컨대, 변형된) T 세포를 포함한다. 일부 경우에서, T 세포는 한 명 이상의 개인에서 유래한 일차 T 세포 집단 또는 하위집단이다. 일부 구현예에서, 조작된 또는 변형된 T 세포와 같은 본원에 기재된 T 세포는 내인성 T 세포 수용체의 감소된 발현을 포함한다.

[1668] 일부 구현예에서, HIP-유래 T 세포는 키메라 항원 수용체[CAR]을 포함한다. 임의의 적합한 CAR이 본원에 기재된 CAR을 포함하는 hyHIP-유래된 T 세포에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 유도 만능 줄기 세포-유래된 T 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피난항 좌위 또는 표적 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, TRAC, TRB, PD-1 또는 CTLA-4 유전자에 삽입된다. 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 저면역원성 세포의 유전체 좌위에 CAR을 삽입하기 위해 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다.

[1669] 본원에 제공된 HIP-유래된 T 세포는 B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B-ALL], 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 급성 골수성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위 선암종, 췌장 선암종, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 적합한 암의 치료에 유용하다.

[1670] 2. 저면역원성 만능 세포에서 유래한 NK 세포

[1671] 본원에 제공된, 자연 살해[NK] 세포는 본원에 기재된 HIP 세포(즉, 저면역원성 iPSC)에서 유래한다.

[1672] NK 세포('거대 과립 림프구'로도 정의됨)는 공통 림프구 전구체(이는 또한 B 림프구 및 T 림프구로도 발생됨)에서 분화된 세포 계통을 나타낸다. T-세포와 달리, NK 세포는 원형질막에서 CD3을 자연적으로 포함하지 않는다. 중요하게는, NK 세포는 TCR을 발현하지 않고, 또한 전형적으로 다른 항원-특이적 세포 표면 수용체(또한, TCR 및 CD3, 이들은 또한 면역글로불린 B-세포 수용체를 발현하지 않고, 대신에 전형적으로 CD16 및 CD56을 발현한다)를 결여한다. NK 세포의 세포독성 활성은 감작을 필요로 하지 않지만, IL-2를 포함하는 다양한 시토킨에 의한 활성화에 의해 향상된다. NK 세포는 일반적으로 항원-수용체-매개 신호전달에 필요한 적절한 또는 완전한 신호전달 경로를 결여하는 것으로 여겨지고, 따라서 항원 수용체-의존적 신호전달, 활성화 및 확장을 할 수 있는 것으로 여겨지지 않는다. NK 세포는 세포독성이고, 이들은 이들의 세포독성 활성을 조절하기 위해 활성화 및 억제 수용체 신호전달의 균형을 유지한다. 예를 들어, CD16을 발현하는 NK 세포는 감염된 세포에 결합된 항체의 Fc 도메인에 결합하여, NK 세포 활성화를 초래할 수 있다. 대조적으로, 높은 수준의 MHC 클래스 I 단백질을 발현하는 세포에 대해서는 활성이 감소한다. 표적 세포와 접촉하면, NK 세포는 단백질, 예컨대, 퍼포린, 및 효소, 예컨대, 단백질분해효소(그랜자임)을 방출한다. 퍼포린은 표적 세포의 세포막에서 기공을 형성하여, 세포자멸사 또는 세포 용해를 유도할 수 있다.

[1673] 만능 줄기 세포(예를 들어, iPSC)에서 CAR-NK-세포를 비롯한 NK 세포를 생성하는데 사용될 수 있는 다수의 기술이 존재하며, 예를 들어, 문헌[Zhu et al., Methods Mol Biol. 2019; 2048:107-119; Knorr et al., Stem Cells Transl Med. 2013 2(4):274-83. doi: 10.5966/sctm.2012-0084; Zeng et al., Stem Cell Reports. 2017 Dec 12;9(6):1796-1812; Ni et al., Methods Mol Biol. 2013;1029:33-41; Bernareggi et al., Exp Hematol. 2019 71:13-23; Shankar et al., Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):234]을 참조하며, 이들 모두는 그 전체가, 특히 분화를 위한 방법 및 시약에 대해 본원에 참조로 포함된다. 분화는 일반적으로 이에 제한되지 않지만, CD56, KIRs, CD16, NKp44, NKp46, NKG2D, TRAIL, CD122, CD27, CD244, NK1.1, NKG2A/C, NCR1, Ly49, CD49b, CD11b, KLRG1, CD43, CD62L 및/또는 CD226을 포함하는 NK 세포 연관된 및/또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 분석될 수 있다.

[1674] 일부 구현예에서, 저면역원성 만능 세포는 간세포 기능 상실 또는 간경화를 다루기 위해 간세포로 분화된다. HIP 세포를 간세포로 분화시키기 위해 사용될 수 있는 다수의 기술이 있으며, 예를 들어, 문헌[Pettinato et al., doi: 10.1038/spre32888, Snykers et al., Methods Mol Biol., 2011 698:305-314, Si- Tayeb et al., Hepatology, 2010, 51:297-305 and Asgari et al., Stem Cell Rev., 2013, 9(4):493- 504]을 참조하며, 이들 모두는 그 전체가, 그리고 특히 분화를 위한 방법론 및 시약에 대해 본원에 참조로 포함된다. 분화는 일반적으

로 이에 제한되지 않지만, 알부민, 알파 태아단백질 및 피브리노겐을 포함하는 간세포 연관된 및/또는 특이적 마커의 존재를 평가함으로써 당업계에 알려진 바와 같이 분석될 수 있다. 분화는 또한 암모니아의 대사, LDL 저장 및 흡수, ICG 흡수 및 방출, 글리코겐 저장과 같이 기능적으로 측정될 수 있다.

[1675] 일부 구현예에서, 세포는 환자 또는 대상(예를 들어, 투여 시 수용자)에서 선천성 및/또는 적응성 면역 반응을 활성화하지 않는다. 장애의 치료를 필요로 하는 대상(예를 들어, 수용자) 또는 환자에 NK 세포 집단을 투여함으로써 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 NK 세포는 이에 제한되지는 않지만, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체를 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 조작된(예를 들어, 변형된) NK 세포를 포함한다. 본원에 기재된 CAR을 포함하여 임의의 적합한 CAR이 NK 세포에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 폴리뉴클레오티드는 유전체 좌위에 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피난항 또는 유전체 좌위 내로 삽입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 B2M, CIITA, PD1 또는 CTLA4 유전자에 삽입된다. 본원에 기재된 유전자 편집 방법(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)을 포함하는 NK 세포의 유전체 좌위 내로 CAR을 삽입하기 위해 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다.

[1676] **G. 저면역원성 표현형 및 만능성 보유에 대한 분석**

[1677] 일단 저면역원성 세포가 생성되면, 이들은 제WO2016183041호 및 제WO2018132783호에 기재된 바와 같이 저면역원성 및/또는 만능성 보유에 대해 분석될 수 있다.

[1678] 일부 구현예에서, 저면역원성은 제WO2018132783호의 도 13 및 도 15에 예시된 바와 같이 다수의 기법을 이용하여 분석된다. 이러한 기술은 동종이계 숙주로의 이식 및 숙주 면역계를 피하는 저면역원성 만능 세포 성장(예를 들어, 기형종)에 대한 모니터링을 포함한다. 일부 경우에서, 저면역원성의 만능 세포 유도체는 발광효소를 발현하도록 형질도입되고, 이어서 생물발광 영상화를 이용하여 추적될 수 있다. 유사하게, 이러한 세포에 대한 숙주 동물의 T 세포 및/또는 B 세포 반응은 세포가 숙주 동물에서 면역 반응을 야기하지 않는다는 것을 확인하기 위해 시험된다. T 세포 기능은 Elispot, ELISA, FACS, PCR 또는 질량 세포 분석(CYTOF)에 의해 평가될 수 있다. B 세포 반응 또는 항체 반응은 FACS, 또는 Luminex를 사용하여 평가된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 일반적으로 제WO2018132783호의 도 14 및 도 15에 나타낸 바와 같이, 세포는 선천성 면역 반응, 예를 들어 NK 세포 사멸을 회피하는 이의 능력에 대해 분석될 수 있다.

[1679] 일부 구현예에서, 세포의 면역원성은 당업자에 의해 인식되는 T 세포 증식 분석, T 세포 활성화 분석, 및 T 세포 사멸 분석과 같은 T 세포 면역분석을 사용하여 평가된다. 일부 경우에서, T 세포 증식 분석은 세포를 인터페론-감마로 전처리하는 단계 및 세포를 표지된 T 세포와 공동배양하고, 미리 선택된 시간 후에 T 세포 집단(또는 증식하는 T 세포 집단)의 존재를 분석하는 단계를 포함한다. 일부 경우에서, T 세포 활성화 분석은 T 세포를 본원에 약술된 세포와 공동배양하고, T 세포에서 T 세포 활성화 마커의 발현 수준을 결정하는 것을 포함한다.

[1680] 생체내 분석은 본원에 약술된 세포의 면역원성을 평가하기 위해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 생존 및 면역원성은 동종이계 인간화 면역결핍 마우스 모델을 사용하여 결정된다. 일부 예에서, 저면역원성의 다능성 줄기 세포는 동종이계 인간화된 NSG-SGM3 마우스에 이식되고, 세포 거부, 세포 생존 및 기형종 형성에 대해 분석된다. 일부 경우에서, 생착된 저면역원성 만능 줄기 세포 또는 그의 분화된 세포는 마우스 모델에서 장기간 생존을 나타낸다.

[1681] 세포의 저면역원성을 비롯한 면역원성을 측정하기 위한 추가의 기술은 예를 들어 문헌[Deuse et al., Nature Biotechnology, 2019, 37, 252-258 and Han et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(21), 10441- 10446]에 기재되어 있으며, 도면, 도면 범례, 및 방법의 설명을 포함한 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1682] 유사하게, 만능성의 보유는 다양한 방식으로 시험된다. 일부 구현예에서, 만능성은 일반적으로 본원에 기재되고 제WO2018132783호의 도 29에 나타낸 바와 같은 특정 만능성-특이적 인자의 발현에 의해 분석된다. 추가적으로 또는 대안적으로, 만능 세포는 만능성의 표시로서 하나 이상의 세포 유형으로 분화된다.

[1683] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 만능 세포에서 MHC I 기능(세포가 인간 세포에서 유래한 경우 HLA I)의 성공적인 감소는 당업계에 알려지고 아래 기재된 바와 같은 기술, 예를 들어, 인간 주요 조직적합성 HLA 클래스 I 항원의 알파 사슬에 결합하는 시판되는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 항체를 사용하는, 예를 들어 HLA 복합체에 결합하는 표지된 항체를 사용한 FACS 기술을 사용하여 측정될 수 있다.

[1684] 추가로, HLA I 복합체가 세포 표면상에서 발현되지 않는다는 것을 확인하기 위해 세포를 시험할 수 있다. 이는

상기 논의된 바와 같은 하나 이상의 HLA 세포 표면 구성요소에 대한 항체를 사용하여 FASC 분석에 의해 분석될 수 있다.

[1685] 만능 세포 또는 이의 유도체에서 MHC II 기능(세포가 인간 세포에서 유래한 경우 HLA II)의 성공적인 감소는 단백질에 대한 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅, FACS 기술, RT- PCR 기술 등과 같이 당업계에 알려진 기술을 사용하여 측정될 수 있다.

[1686] 추가로, 세포는 HLA II 복합체가 세포 표면상에서 발현되지 않는다는 것을 확인하기 위해 시험될 수 있다. 또한, 이 분석은 당업계에 알려진 바와 같이 수행되며(예를 들어, 제WO2018132783호의 도 21 참조), 일반적으로 인간 HLA 클래스 II HLA-DR, DP 및 대부분의 DQ 항원에 결합하는 상용 항체에 기반하여 웨스턴 블롯 또는 FACS 분석 중 하나를 이용하여 수행된다.

[1687] HLA I 및 II(또는 MHC I 및 II)의 감소에 추가하여, 본 기술의 저면역원성 세포는 대식세포 식세포작용 및 NK 세포 사멸에 대한 감수성이 감소된다. 생성된 저면역원성 세포는 TCR 복합체의 감소 또는 결여 및 하나 이상의 CD47 이식유전자의 발현으로 인해 면역 대식세포 및 선천적 경로를 '탈출'한다.

[1688] 일부 양태에서, 본 기술은 본원에 개시된 다양한 구현예에 따른 방법에서 유래되거나 생성되는 T 세포, 예컨대 면역 회피 동종이계 T 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 생성된 T 세포는 이들이 (예를 들어, 내인성 TCR 유전자좌 내로 관용원성 인자를 삽입함으로써 및/또는 기재된 바와 같이 MHC I 및/또는 MHC II 유전자를 변형시킴으로써) 면역 회피성이 되고, 하나 이상의 CAR을 발현하도록 제조됨에 따라, 입양 세포 치료법에서의 사용에 적합하다.

[1689] 일부 구현예에서, T 세포는 미감작 T 세포, 헬퍼 T 세포(CD4+), 세포독성 T 세포(CD8+), 조절 T 세포(Treg), 중심 기억 T 세포(T_{CM}), 효과기 기억 T 세포 (T_{EM}), 줄기 세포 기억 T 세포 (T_{SCM}) 또는 이들의 임의의 조합이다. 더 구체적으로는, T 세포는 미감작(항원에 노출되지 않음; CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA의 증가된 발현, 및 T_{CM}과 비교할 때 CD45RO의 감소된 발현), 기억 T 세포(항원-경험이 있고, 오래 생존) 또는 효과기 세포(항원-경험이 있고, 세포독성)일 수 있다. 기억 T 세포는 T_{CM}(미감작 T 세포에 비해 CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO 및 CD95의 증가된 발현, 및 CD54RA의 감소된 발현) 및 T_{EM}(미감작 T 세포 또는 T_{CM}에 비해 CD62L, CCR7, CD28, CD45RA의 감소된 발현, 및 CD127의 증가된 발현)의 소집단으로 추가로 나누어질 수 있다. 효과기 T 세포는 T_{CM}과 비교할 때 CD62L, CCR7, CD28의 발현이 감소되고, 그랜자임 및 퍼포린에 대해 양성인 항원-경험이 있는 CD8+ 세포독성 T 세포를 지칭한다. 헬퍼 T 세포는 시토킨을 방출함으로써 다른 면역 세포의 활성에 영향을 미치는 CD4+ 세포이다. CD4+ T 세포는 적응성 면역 반응을 활성화시키거나 억제할 수 있고, 이들 두 기능 중 어느 것이 유도되는지는 다른 세포 및 신호의 존재에 따를 것이다. T 세포는 알려진 기법을 이용하여 수집될 수 있고, 다양한 하위집단 또는 이의 조합은 알려진 기술에 의해, 예컨대, 항체에 대한 친화도 결합, 유세포분석, 또는 면역자기 선발[immunomagnetic selection]에 의해 풍부화 또는 고갈될 수 있다.

[1690] 일부 구현예에서, T 세포는 자가 세포이며, 즉, 변형 후 T 세포를 수용할 대상에서 수득한다. 일부 구현예에서, T 세포는 동종이계 세포로, 즉, 변형 후 T 세포를 수용할 대상 외의 다른 이에서 수득한다. 이들 구현예 중 하나에서, T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위에서 유래한 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 비롯한 다수의 공급원에서 수득한 일차 T 세포일 수 있다. 다른 구현예에서, 특히 동종이계 T 세포의 경우에, T 세포는 배아 줄기 세포[ESC] 또는 유도만능세포[iPSC]로부터 유래 또는 분화될 수 있다.

[1691] 일부 양태에서, 본 기술은 본원에 개시된 다양한 구현예에 따라 T 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[1692] 일부 구현예에서, 조성물은 적합한 투여 경로에 따라서 다양한 제형, 예를 들어, 주사 가능한 제형, 동결건조 제형, 액체 제형, 경구 제형 등일 수 있다.

[1693] 일부 구현예에서, 조성물은 동일한 투약량 단위로 공동 제형화될 수 있거나, 별개의 투약량 단위로 개별적으로 제형화될 수 있다. 본원의 용어 '용량 단위' 및 '투약량 단위'는 치료 효과를 제공하기 위한 단일 투여에 적합한 치료제의 양을 함유하는 조성물의 일부를 지칭한다. 이러한 투약량 단위는 1일당 1회 내지 복수 회(즉, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 4, 또는 1 내지 2회), 또는 치료 반응을 유발하는 데 필요한만큼 다수 회 투여될 수 있다.

[1694] 일부 구현예에서, 단일 투약량 단위는 적어도 약 1×10^2, 5×10^2, 1×10^3, 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4, $1 \times$

10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10} 또는 5 x 10^{10} 개의 세포를 포함한다.

[1695] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 환자(예를 들어, 수용자 대상)에 투여될 때 면역 인식 및 반응을 회피할 수 있도록 변형된다. 세포는 시험관 내 및 생체 내에서 면역 세포에 의한 사멸을 회피할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 대식세포, 및 NK 세포에 의한 사멸을 회피한다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포 또는 대상의 면역계에 의해 무시된다. 즉, 본원에 기재된 방법에 따라 투여된 세포는 면역계의 면역 세포에 의해 탐지 가능하지 않다. 일부 구현예에서, 세포는 은폐되고, 따라서 면역 거부를 피한다.

[1696] 본원에 제공된 조작된 세포가 면역 인식을 회피하는지 여부를 결정하는 방법에는 IFN-γ Elispot 분석, 미세아교세포 사멸 분석, 세포 생착 동물 모델, 시토킨 방출 분석, ELISA, 생물발광 영상화를 사용한 사멸 분석 또는 크롬 방출 분석 또는 Xcelligence 분석, 혼합-림프구 반응, 면역형광 분석, 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[1697] 일부 구현예에서, 면역 반응은 세포의 보체-의존적 세포독성[CDC] 분석으로 평가된다. CDC는 보체를 함유하는 혈청 존재하에서 세포 표면상에 발현된 HLA-독립적인 항원을 표적화하는 IgG 또는 IgM 항체와 함께 세포를 인큐베이션하고, 세포 사멸을 분석함으로써 시험관 내 분석할 수 있다. 일부 구현예에서, CDC는 ABO 혈액 유형과 비상용성인 혈청을 갖는 세포를 인큐베이션하여 분석될 수 있고, 여기서 세포는 항원 A 또는 항원 B를 포함하고, 혈청은 세포의 항원 A 및/또는 항원 B에 대한 항체를 포함한다.

[1698] 일부 구현예에서, 조작된 세포가 일단 본원에 기재된 바와 같이 변형 또는 생성되면, 세포는 이의 저면역원성에 대해 분석될 수 있다. 세포가 저면역원성이거나 면역계를 회피할 수 있는지의 여부를 평가하기 위해 다양한 임의의 분석이 사용될 수 있다. 예시적인 분석은 제WO2016183041호 및 제WO2018132783호에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 세포는 1주 이상(예를 들어, 1주, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년, 3년, 4년, 5년 이상, 예를 들어, 세포 및/또는 이의 자손의 생애 동안) 숙주의 면역 반응을 자극하지 않고 숙주 내에서 살아남는다. 세포는 이식 유전자의 발현을 유지하고/하거나, 이들이 숙주 내에서 생존하는 한 표적 유전자의 발현이 없어지거나 감소된다. 일부 양태에서, 이식 유전자가 더이상 발현되지 않고/거나 표적 유전자가 조작된 세포를 발현하는 경우, 숙주의 면역계에 의해 제거될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 지속성 또는 생존은, 수용자에게 투여 이후 세포가 생체 내에서 검출되는 것을 가능하게 하는 단백질(예를 들어, 형광 단백질, 예컨대 GFP, 절두된 수용체 또는 기타 대용 마커 또는 기타 검출 가능한 마커)을 암호화하는 이식 유전자를 추가로 발현시킴으로써 모니터링될 수 있다.

[1699] 저면역원성 세포는, 세포가 의도된 조직 부위에 생착되고 기능적으로 결핍된 영역을 재구성하거나 재생하도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 생착(예를 들어, 성공적인 생착)에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 생착은 미리 선택된 분량의 시간 후에 평가된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 세포 생존에 대해 모니터링된다. 예를 들어, 세포 생존은 생물발광 영상화[BLI]를 통해 모니터링될 수 있으며, 여기서 세포는 세포 생존을 모니터링하기 위한 발광효소 발현 작제물로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 당업계에 알려진 면역염색 및 영상화 방법에 의해 시각화된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포는 성공적인 생착을 결정하도록 검출될 수 있는 알려진 바이오마커를 발현한다. 예를 들어, 특정 바이오마커의 표면 발현을 결정하기 위해 유세포 분석법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 예상대로 의도된 조직 부위에 생착된다(예를 들어, 저면역원성 세포의 성공적인 생착). 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 필요에 따라, 예컨대 세포 결함 부위에서 의도된 조직 부위에 생착된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 동일한 방식으로 의도된 조직 부위에 생착된다.

[1700] 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 기능에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 의도된 조직 부위에 대한 그의 생착 전에 기능에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포는 의도된 조직 부위에 대한 생착 후 기능에 대해 분석된다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 미리 선택된 분량 이후에 평가된다. 일부 구현예에서, 생착된 세포의 기능은 검출 가능한 표현형을 생성하는 세포의 능력에 의해 평가된다. 예를 들어, 생착된 베타 섬 세포 기능은 당뇨병으로 인해 손실된 글루코스 제어능의 회복을 기반으로 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 예상된 바와 같다(예를 들어, 항체-매개 거부를 피하면서 저면역원성 세포의 성공적인 기능). 일부 구현예에서, 저면역원성 세포의 기능은 항체-매개 거부를 피하면서 세포 결함 부위에서의 충분한 기능과 같이, 요구되는 바와 같다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 동일한 유형의 비-조작된 세포와 동일한 방식으로 기능한다.

[1701] HIP 세포에 관한 구현예는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 세포 유형뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 안전 스위치, CAR 변형 및 다른 변형/유전자 편집과 조합되어 용이하게 적용될 수 있음이 이해될 것이다.

[1702] **H. 안전 스위치**

[1703] 상기 개시된 바와 같이, 일부 구현예에서, 예를 들어 세포가 바람직하지 않은 방식으로 성장 및 분열하거나 숙주에 대한 과도한 독성을 야기하는 경우, 안전 스위치를 함유하는 조작된 세포의 사멸 또는 세포자멸사를 유도하는 능력을 제공하기 위해, 본원에 제공된 조작된 세포 내로 안전 스위치가 혼입, 예컨대 도입될 수 있다. 따라서, 안전 스위치의 사용은 생체내에서 비정상 세포를 조건적으로 제거할 수 있게 하고, 임상에서 세포 치료법의 적용에 중요한 단계일 수 있다. 본 개시의 맥락에서 지칭되는 바와 같은 안전 스위치에 대한 관련 정보는 제WO2021/146627호에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 본원에 참조로 포함된다. 안전 스위치에 관한 구현예는 본원에 기재된 바와 같은 임의의 세포 유형뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 HIP 세포, CAR 변형 및 다른 변형/유전자 편집에 관한 구현예와 조합되어 쉽게 적용될 수 있음이 이해될 것이다. 다음 정의가 본 개시 내용에 적용된다:

[1704] 본원에 사용된 용어 '안전 스위치'는 하향 조절 또는 상향 조절될 때, 예를 들어, 숙주의 면역계에 의한 인식을 통해, 세포의 제거 또는 사멸을 야기하는 관심의 유전자 또는 단백질의 발현을 제어하기 위한 시스템을 지칭한다. 안전 스위치는 유해한 임상 사건의 경우 외인성 분자에 의해 촉발되도록 설계될 수 있다. 안전 스위치는 DNA, RNA 및 단백질 수준의 발현을 조절함으로써 조작될 수 있다. 안전 스위치는 유해 사건에 반응하여 세포 활성의 제어를 허용하는 단백질 또는 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 비활성 상태로 발현되고, 선택적인 외부에서 제공되는 작용제에 의해 스위치의 활성화 시 안전 스위치를 발현하는 세포에 치명적인 '사멸 스위치'이다. 일부 구현예에서, 안전 스위치 유전자는 작제물에서 관심 유전자에 관해 시스-작용성[cis-acting]이다. 일부 구현예에서, 안전 스위치는 활성화 시 세포가 면역억제 인자의 발현을 하향 조절하고/하거나 면역 신호전달 분자의 발현을 상향 조절하여, 이에 의해 숙주 면역계에 의한 제거를 위해 세포를 표지하는 '은폐해제[uncloaking]' 시스템이다. 안전 스위치의 활성화는 세포가 세포자멸사 또는 괴사를 통해 자기만을 또는 자기와 이웃하는 세포를 사멸시키게 한다.

[1705] 'HLA' 또는 '인간 백혈구 항원' 복합체는 인간에서 주요 조직적합성 복합체[MHC] 단백질을 암호화하는 유전자 복합체이다. HLA 복합체를 구성하는 이러한 세포-표면 단백질은 항원에 대한 면역 반응의 조절을 담당한다. 인간에는, 두 개의 MHC, 즉 클래스 I 및 클래스 II, 'HLA-I' 및 'HLA-II'가 있다. HLA-I는 세포 내부로부터 펩티드를 제시하는 세 개의 단백질, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C를 포함하며, HLA-I 복합체에 의해 제시된 항원은 살해 T-세포(CD8+ T 세포 또는 세포독성 T 세포로도 알려져 있음)를 유인한다. HLA-I 단백질은 β-2 마이크로글로불린[B2M]과 연관된다. HLA-II는 세포 외부에서 T 림프구로 항원을 제시하는 다섯 개의 단백질, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR을 포함한다. 이는 CD4+ T 세포(헬퍼 T 세포로도 알려짐)를 자극한다. 'MHC' 또는 'HLA'의 사용은 유전자가 인간[HLA] 또는 쥐[MHC]에서 유래되는지 여부에 따라 달라지는 것으로, 제한하고자 하는 의미가 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 포유동물 세포와 관련하여, 이들 용어는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.

[1706] 1. 면역 신호전달 유전자좌

[1707] 본원에는 기재된 작제물을 포함하는 단리된 세포 또는 이의 집단이 제공된다. 일부 구현예에서, 작제물은 표적 유전자좌 내에 도입되었다. 일부 구현예에서, 유전자좌는 AAVS1 좌위, CLBYL 좌위, CXCR4 좌위, Rosa26 좌위, 및 CCR5 좌위로 이루어진 군에서 선택된 피난항 좌위, 또는 B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, CIITA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, 및 NKG2D의 기타 리간드로 이루어진 군에서 선택된 면역 신호전달 유전자좌이다. 일부 구현예에서, 단리된 세포는 미변형된 인간 세포와 비교하여 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원의 결실 또는 감소된 발현 및/또는 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원의 결실 또는 감소된 발현을 더 포함하는 단리된 조작된 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 단리된 세포는 CIITA, B2M, 및/또는 NLRC5의 결실 또는 감소된 발현을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 단리된 세포는 저면역원성이고 줄기 세포이다.

[1708] 일부 구현예에서, 면역 신호전달 유전자좌는 B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, RFXANK, CIITA, CTLA-4, PD-1, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, RAET1N/ULBP3, 및 NKG2D의 기타 리간드로 이루어진 군에서 선택된다.

[1709] 일부 구현예에서, 면역 신호전달 유전자좌는 B2M, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, 및 HLA-E로 이루어진 군에서

선택된다.

[1710] 일부 양태에서, CIITA의 감소된 또는 제거된 발현은 다음의 MHC 클래스 II, 즉, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR 중 하나 이상의 발현을 감소 또는 제거한다.

[1711] 2. 조건부 HIP 세포 및 면역억제 인자의 조건부 하향 조절 방법

[1712] 안전 스위치의 도입은 저면역원성 세포(HIP 세포)를 사용하여 개발된 세포 치료법의 안전성을 개선한다. 본원에 기재된 HIP 세포의 특징은 하나 이상의 면역 조절(면역억제) 인자의 유도성 발현이다. 일부 구현예에서, 면역억제 인자(본원에서 '저면역원성 인자' 또는 '관용원성 인자'로도 지칭됨)는 CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, HLA-E 중쇄, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, 및 Mfge8을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 면역억제 인자는 CD47이다. 면역억제 인자의 조절가능한 또는 유도성 발현은 생착된 저면역원성 세포에 대한 수용 대상에 의한 면역 반응을 제어하는 기능을 한다.

[1713] 본원에는 제어된 방식으로 면역 조절 단백질의 발현을 '끄는' 메커니즘을 필요로 하는 면역억제 인자의 발현을 위한 방법이 기재된다. 또한 하나 이상의 면역억제 인자의 제어가능한 발현을 보유하는 HIP 세포가 기재된다. 일부 경우에서, 세포는 하나 이상의 면역억제 인자를 과발현하고 하나 이상의 면역억제 인자의 발현을 하향 조절하도록 유도될 수 있다. 그와같이 됨에 따라, 세포는 더이상 저면역원성이 아니며, 세포 사멸을 위해 수용자의 면역 세포에 의해 인식된다. 일부 구현예에서, 수용자 대상에 도입된 세포의 저면역성은, HLA-I 및 HLA-II 좌위의 억제 또는 유전자 파괴를 수반하는 보체 억제제 및 저면역성 인자를 포함하는 면역억제 분자의 과발현을 통해 달성된다. 이들 변형은 감염, 악성 또는 비-자기 세포의 제거를 담당하는, T 세포, B 세포, NK 세포 및 대식세포와 같은 수용자 면역계 효과기 세포에 대해, 세포를 은폐한다. 면역계에 대해 세포를 '은폐'하는 것은 신체 내의 동종이계 세포의 존재 및 지속을 가능하게 한다. 신체에서 조작된 세포의 제어된 제거는 환자 안전성에 중요하고, 면역계에 대해 세포의 은폐를 해제함으로써 달성될 수 있다. 은폐의 해제는 안전 스위치로서 작용하며, 면역억제 분자의 하향 조절 또는 면역 신호전달 분자의 상향 조절을 통해 달성될 수 있다. 기재된 임의의 면역억제 분자의 발현 수준은 세포 내 단백질 수준, mRNA 수준, 또는 DNA 수준에서 제어될 수 있다. 유사하게, 기재된 임의의 면역 신호전달 분자의 발현 수준은 세포 내 단백질 수준, mRNA 수준, 또는 DNA 수준에서 제어될 수 있다.

[1714] 일부 구현예에서, 기재된 임의의 안전 스위치 방법(예를 들어, 단백질 수준, RNA 수준 및 DNA 수준 안전 스위치)를 사용하여, 면역억제 인자의 더욱 낮은 수준이 임계 수준 미만이도록 세포 내 면역억제 인자의 수준을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 세포 내 면역억제 인자의 수준은 발현의 임계 수준의 약 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배, 1배 또는 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 구현예에서, 세포 내 면역억제 인자의 수준은 발현의 임계 수준의 약 10배 내지 5배, 10배 내지 3배, 9배 내지 1배, 8배 내지 1배, 7배 내지 0.5배, 6배, 내지 1배, 5배 내지 0.5배, 4배 내지 0.5배, 3배 내지 0.5배, 2배 내지 0.5배, 또는 1배 내지 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 구현예에서, 면역억제 인자 발현의 임계 수준은 유도 만능 줄기 세포에서 이러한 인자의 발현에 기반하여 확립된다. 일부 구현예에서, 면역억제 인자 발현의 임계 수준은 MHC I 및 MHC II 녹아웃 세포 또는 MHC I/MHC II/TCR 녹아웃 세포와 같은 상응하는 저면역 세포에서 면역억제 인자의 발현 수준에 기반하여 확립된다.

[1715] 3. 단백질 수준 제어

[1716] 일부 구현예에서, 면역억제 단백질의 조절된 분해는 내인성 단백질 전환 기구로의 유인을 허용하는 면역억제 인자의 아미노산 서열 내에 데그론을 혼입함으로써 확립된다. 표적화된 단백질 분해에 대한 메커니즘은 유비퀴틴화[ubiquitination] 및 후속 프로테아좀 분해를 위한 E3 리가제에 대한 유인, 프로테아좀에 대한 직접 유인, 및 리소좀에 대한 유인을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1717] 면역억제 분자에 대한 유도성 데그론 모티프의 융합은, 데그론을 안정화 또는 불안정화하는 작은 분자, 및 이에 따른 면역억제 분자의 첨가 또는 제거를 통해 분자의 안정성에 대한 외인성 제어를 가능하게 한다.

[1718] 일부 구현예에서, 데그론에 의한 유도성 단백질 분해 방법은, SMASH 태그를 사용한 리간드 유도 분해[ligand induced degradation, LID], Shield-1을 사용한 리간드 유도 분해, 옥신을 사용한 리간드 유도 분해, 라파마이신을 사용한 리간드 유도 분해, 펩티드형 데그론(예를 들어, IKZF3 기반 데그론), 및 단백질분해 표적화 키메라[proteolysis targeting chimera, PROTAC]를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 리간드 유도 분해 방법의 일부 구현예에서, 비활성 형태로 유지되지만 형태를 채택하도록 유도된 데그론 태그는 Shield-1 분자와 같은, 이에 제한되지 않는 특정 분자의 결합 시 프로테아좀에 의해 인식이 가능하다. 예를 들어, 문헌[Roth et al.,

Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761- 2777]을 참조하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. SMASH 데그론 기술의 상세한 설명은 문헌[Hannah and Zhou, Nat Chem Biol, 2015, 11:637-638 및 Chung et al., Nat Chem Biol, 2015, 11:713-720]에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. LID 데그론 기술의 상세한 설명은 문헌[Bonger et al., Nat Chem Biol, 2011, 7(8):531-7에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1719] 일부 양태에서, 단리된 세포를 수득하고, 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 유도성 데그론 요소에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 함유하는 작제물을 도입함으로써 포유동물 세포(예를 들어, 인간 세포)의 면역원성을 제어하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 작제물은 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 가요성 링커를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 유도성 데그론 요소에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 유도성 데그론 요소에 작동 가능한 상태로 연결된 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함하는 작제물. 일부 구현예에서, 작제물은 유도성 데그론 요소에 작동 가능한 상태로 연결된 가요성 링커를 암호화하는 서열에 연결된 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함한다. 이와 같이, 데그론은 세포를 데그론 리간드 또는 분자와 접촉시킬 때 분해를 위한 면역억제 인자를 표적한다.

[1720] 일부 구현예에서, 유도성 데그론 요소는 소분자-보조 차단[small molecule-assisted shutoff, SMASH] 데그론 요소, Shield-1 반응성 데그론 요소, 옥신 반응성 데그론 요소, 및 라파마이신 반응성 데그론 요소와 같은 리간드 유도성 데그론 요소, 펩티드형 데그론 요소, 및 펩티드형 단백질분해 표적화 키메라[PROTAC] 요소로 이루어진 군에서 선택된다. 유용한 구현예에서, 리간드 유도성 데그론 요소는 소분자-보조 차단[SMASH] 데그론 요소이고, 면역원성을 제어하기 위한 외인성 인자는 아수나프레비르(asunaprevir)이다. 일부 구현예에서, 면역억제 인자 유전자는 CD47, CD24, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, HLA-E 중쇄, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CC121, 및 Mfge8로 이루어진 군에서 선택된다. 많은 구현예에서, 면역억제 인자 유전자는 CD47이다. 일부 경우에서, 작제물의 항구적 프로모터는 EF1A 프로모터, EFS 프로모터, CMV 프로모터, CAGGS 프로모터, SV40 프로모터, COPIA 프로모터, ACT5C 프로모터, TRE 프로모터, CBh 프로모터, PGK 프로모터, 및 UBC 프로모터로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 경우에서, 임의적 가요성 링커는 (GSG)n(서열 번호:3), (GGGS)n(서열 번호:1), 및 (GGGSGGGS)n(서열 번호:2)로 이루어진 군에서 선택되며, 여기서 n은 1 내지 10이다. 일부 구현예에서, 작제물은 세포 내에 도입되어 AAVS1 좌위, CLBYL 좌위, CXCR4 좌위, Rosa26 좌위, 및 CCR5 좌위와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 피난항 좌위 내에 통합된다. 일부 구현예에서, 작제물은 상동성 유도 재조합을 위한 방식에 의해 세포 내 AAVS 좌위 내에 도입된다. 이와 같이, 작제물은 표적화된 피난항 좌위에 특이적인 5' 및 3' 상동성 팔을 포함한다. 일부 구현예에서, 작제물은 5' 단부에서 3' 단부 방향으로, AAVS1 좌위에 대한 5' 상동성 팔, 외인성 항구적 프로모터, 유도성 데그론 요소, 면역억제 인자를 암호화하는 유전자, 및 AAVS1 좌위에 대한 3' 상동성 팔을 포함한다. 다른 구현예에서, 작제물은 5' 단부에서 3' 단부 방향으로, AAVS1 좌위에 대한 5' 상동성 팔, 외인성 항구적 프로모터, 유도성 데그론 요소, 가요성 링커를 암호화하는 서열, 면역억제 인자를 암호화하는 유전자, 및 AAVS1 좌위에 대한 3' 상동성 팔을 포함한다. 유용한 구현예에서, 조작된 세포는 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 가요성 링커를 암호화하는 임의적 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 유도성 데그론 요소에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함하는 외인성 핵산 서열을 포함한다. 조작된 세포는 면역억제 인자에 융합되거나 또는 연결된 유도성 데그론 요소를 발현한다. 일부 구현예에서, 세포는 면역억제 인자를 분해하기 위해 데그론 요소를 활성화시키는 리간드, 분자, 펩티드 또는 소분자와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 인자 또는 작용제에 의해 접촉된다.

[1721] 펩티드 데그론의 일부 구현예에서, E3 리가제에 소분자-매개 유인을 부여하는 펩티드 태그가 사용된다. 일부 구현예에서, 펩티드 태그는 면역조절 약물[IMiD] 의존적 방식으로 E3 리가제 수용체[CRBN]에 유인되는 림프구-제한 전사 인자 IKZF3을 포함하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌[Koduri et al., Proc Natl Acad Sci, 2019, 116(7), 2539-2544]에 기재된 바와 같다. 특정 구현예에서, 데그론은 분해(예를 들어, 유비퀴틴화 경로를 통해)를 위한 면역억제 인자를 표적화하거나, 단백질 분해를 유도하거나, 또는 단백질을 분해할 수 있다.

[1722] 일부 양태에서, 단리된 세포를 수득하고, 항구적 프로모터, 유도성 펩티드형 데그론 요소, 및 면역 억제인자를 암호화하는 유전자를 포함하는 작제물을 도입함으로써, 포유동물(예를 들어, 인간)의 면역원성을 제어하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 작제물은 항구적 프로모터, 유도성 펩티드형 데그론 요소, 가요성 링커를 암호화하는 핵산 서열, 및 면역억제 인자를 암호화하는 유전자를 포함한다. 항구적 프로모터, 면역억제 인자, 가요

성 링커, 및 본원에 기재된 세포 중 임의의 것이 방법에 적용 가능하다.

[1723] PROTAC의 일부 구현예에서, 이작용성 분자를 사용하여 세포의 단백질 분해 기구에 면역억제 인자를 유인한다. 일부 구현예에서, 이작용성 분자는 면역억제 단백질의 천연 또는 야생형 서열에 또는 고친화도로 이작용성 분자에 결합하는 도메인을 발현하는 면역억제 단백질의 조작된 버전에 결합한다. 일부 구현예에서, 이작용성 분자는 소분자 또는 생물학적 제제(예를 들어, 항체 또는 이의 단편)를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Burslem et al., Cell Chemical Biology, 2018, 25, 67-77 및 Roth et al., Cellular Molecular Life Sciences, 2019, 76(14), 2761-2777]을 참조하며, 상기 문헌은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1724] 이작용성 항체의 일부 구현예에서, 항체는 면역억제 인자 및 내재화[internalization] 및 분해를 초래하는 제2의 내인성 수용체를 표적화한다. 하나 이상의 면역억제 인자의 제어가능한 발현은 이작용성 항체(예를 들어, 화학적으로 재프로그래밍된 이작용성 항체), 데그론에 의한 유도성 단백질 분해, 유도성 RNA 조절, 유도성 DNA 조절, 및 유도성 발현 방법으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Natsume and Kanemaki, Annu Rev Genet, 2017, 51, 82-102; Burslem and Crews, Chem Rev, 2017, 117, 11269-11301; Banik et al., ChemRxiv, 2019]를 참조하며; 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, 면역억제 인자를 발현하는 세포는 분해를 위해 세포에 결합하는 항체에 의해 접촉된다.

[1725] 일부 경우에서, 저면역 세포는 세포의 세포외 표면상에서 에피토프에 결합하는 항체의 추가를 통해 면역계에 의해 이용 및 제거된다. 에피토프는 과발현된 면역억제 인자에 고유할 수 있거나, 또는 면역억제 인자 내에 위치하거나 또는 세포외 표면에 명확히 위치한 또 다른 에피토프일 수 있다. 표면에 대한 항체의 결합은 세포를 은폐 해제시키고, 항체-의존적 세포독성[ADCC] 또는 보체-의존적 세포독성[CDC]을 야기한다.

[1726] 일부 구현예에서, ADCC/CDC 안전 스위치 에피토프는 EGFR, CD20, CD19, CCR4, HER2, MUC1, GD2, PSMA, CD30, CD16, 및 이의 단편, 유도체, 및 변이체로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 경우에서, 본원에 기재된 임의의 세포는 EGFR 에피토프, CD20 에피토프, CD19 에피토프, CCR4 에피토프, HER2 에피토프, MUC1 에피토프, GD2 에피토프, PSMA 에피토프, CD30 에피토프, 또는 CD16 에피토프에서 선택된 에피토프를 발현한다. 일부 구현예에서, 세포는 EGFR, CD20, CD19, CCR4, HER2, MUC1, GD2, PSMA, CD30, 또는 CD16에 특이적인 항체에 결합하여, ADCC/CDC를 야기한다.

[1727] 본원에 기재된 바와 같은 단백질 수준 안전 스위치에 대해 지시된 방법은 본원에 기재된 조작된 세포(예를 들어, 저면역 세포)에서 조절가능한 방식으로 면역억제 인자(예를 들어, CD47)의 수준을 감소시키는 방식을 제공한다. 본원에 기재된 임의의 안전 스위치 방법을 사용하여 세포에서 CD47과 같은 면역억제 인자의 수준을 임계 수준 미만으로 저하시킴으로써, 수용 대상의 면역계는 이러한 세포에 대한 면역 반응을 개시할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 CD47의 수준은 안전 스위치에 의해 발현의 임계 수준의 약 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배, 1배 또는 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 CD47의 수준은 발현의 임계 수준의 약 10배 내지 약5배, 10배 내지 3배, 9배 내지 1배, 8배 내지 1배, 7배 내지 0.5배, 6배, 내지 1 배, 5배 내지 0.5배, 4배 내지 0.5배, 3배 내지 0.5배, 2배 내지 0.5배, 또는 1배 내지 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 경우에서, CD47 발현의 임계 수준은 유도 만능 줄기 세포에서 CD47의 외인성 발현에 기반하여 확립된다. 다른 경우에, CD47 발현의 임계 수준은 MHC I 및 MHC II 녹아웃 세포 또는 MHC I/MHC II/TCR 녹아웃 세포와 같은 상응하는 저면역 세포에서 CD47의 발현 수준에 기반하여 확립된다. 일부 경우에서, CD47의 수준은 SMASH 데그론 또는 LID 데그론과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 데그론-기반 안전 스위치를 사용하여 감소된다. 일부 구현예에서, 외인성 CD47 이식유전자에 연결된 SMASH 데그론을 발현하는 세포는 소분자 아수나프레비르(데그론 유도제)에 노출되어, 세포에 의한 외인성 CD47의 발현 감소를 유도한다.

[1728] 4. RNA 수준 제어

[1729] 면역억제 인자는 siRNA 또는 miRNA에 의해 표적화되어, 인자를 암호화하는 전사체의 분해를 야기할 수 있다. siRNA는 외인성으로 제공되거나 또는 유전적으로 암호화되어 억제 RNA의 전사에 대한 제어를 제공할 수 있다. siRNA 또는 miRNA는 면역억제 인자의 전사체에 어닐링되어, RISC 복합체에 의한 분해를 초래할 수 있다.

[1730] 일부 구현예에서, 면역억제 인자의 발현을 하향 조절하기 위한 유도성 RNA 조절 방법은, 소분자 또는 생물학적 작용제에 의해 유도된 shRNA, 유도성 siRNA, 유도성 miRNA, 유도성 CRISPR 간섭[CRISPRi], 및 유도성 RNA 표적화 핵산분해효소를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1731] 일부 구현예에서, 방법은 면역억제 인자의 RNA를 표적화하는 shRNA 또는 siRNA를 포함한다. 일부 경우에서, shRNA 또는 siRNA의 발현은 소분자 또는 생물학적 작용제에 의해 유도된다.

[1732] 일부 양태에서, 단리된 세포를 수득하고, 유도성 RNA 중합효소 프로모터를 제어할 수 있는 전사활성자 요소에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결된 면역억제 인자를 표적화하는 shRNA 서열에 작동적으로 연결된 유도성 RNA 중합효소 프로모터를 함유하는 작제물을 도입함으로서, 포유동물 세포(예를 들어, 인간 세포)의 면역원성을 제어하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 작제물은 U6Tet 프로모터, 면역억제 인자를 표적화하는 shRNA, 항구적 프로모터, 및 테트라사이클린 또는 이의 유도체(예를 들어, 독시사이클린)에 반응성인 Tet 억제인자 요소를 포함한다. 다른 경우에, shRNA는 면역억제 인자의 발현을 제거한다. 다른 경우에, shRNA는 면역억제 인자의 발현을 약 99% 이하, 예를 들어, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 90%, 85% 이하까지 감소시킨다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 테트라사이클린 반응성 프로모터이다. 항구적 프로모터, 면역억제 인자, 및 본원에 기재된 세포 중 임의의 것이 방법에 적용 가능하다.

[1733] 많은 구현예에서, 조작된 세포는 면역억제 인자를 표적화하는 유도성 shRNA를 발현한다. 일부 구현예에서, 세포는 또한 세포의 저면역원성을 매개하는 외인성 면역억제 인자를 발현한다. 일부 구현예에서, 세포는 shRNA의 발현을 활성화시켜 면역억제 인자를 분해하는 인자, 예컨대 이에 제한되지는 않지만, 리간드, 분자, 펩티드 또는 소분자에 의해 접촉된다.

[1734] 일부 구현예에서, 방법은 이의 전사를 하향 조절하기 위해 면역억제 인자의 프로모터를 표적화하기 위한 CRISPR 간섭 시스템[CRISPRi]을 포함한다. 일부 경우에서, 면역억제 인자를 표적화하는 CRISPRi 및/또는 gRNA의 발현은 소분자 또는 생물학적 작용제에 의해 유도된다. CRISPRi 방법의 상세한 설명은 예를 들어, 문헌[Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386]에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 일부 구현예에서, CRISPRi 시스템은 항구적 프로모터에 의해 제어되는 dCas9-억제인자 융합 단백질 및 유도성 프로모터의 제어하에 면역억제 인자에 특이적인 gRNA를 사용한다.

[1735] 일부 양태에서, 단리된 세포를 수득하고, 세포 내에 (i) 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함하는 제1 작제물, (ii) Cas9 핵산분해효소를 암호화하는 유전자 또는 이의 변이체, 예컨대 dCas9-억제인자 융합 단백질에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 함유하는 제2 작제물, 및 (iii) gRNA 서열이 유도성 RNA 중합효소 프로모터에 상응하는 전사활성자 요소에 작동 가능한 상태로 연결되도록, 면역억제 인자를 암호화하는 서열을 표적화하는 gRNA 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 유도성 RNA 중합효소 프로모터를 포함하는 제3 작제물을 도입함으로써 포유동물 세포(예를 들어, 인간 세포)의 면역원성을 제어하는 방법이 제공된다. 일부 경우에서, 제1 작제물, 제2 작제물, 및 제3 작제물은 단일 벡터에서 발견된다. 일부 경우에서, 제1 작제물, 제2 작제물, 및 제3 작제물은 두 개의 벡터에서 발견된다.

[1736] 일부 구현예에서, CRISPR 기반 방법은 Cas13, Cas7, 또는 Csx1과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 면역억제 인자에 상응하는 mRNA 서열을 표적화하기 위한 핵산분해효소를 포함한다. 일부 경우에서, 핵산분해효소 및/또는 면역억제 인자를 표적화하는 gRNA의 발현은 소분자 또는 생물학적 작용제에 의해 유도된다.

[1737] 일부 양태에서, 단리된 세포를 수득하고, 세포 내에 (i) 면역억제 인자를 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함하는 제1 작제물, (ii) Cas13a 핵산분해효소를 암호화하는 유전자 또는 이의 변이체, 또는 이의 융합 단백질을 암호화하는 유전자에 작동 가능한 상태로 연결된 항구적 프로모터를 포함하는 제2 작제물, 및 (iii) gRNA 서열이 유도성 RNA 중합효소 프로모터에 상응하는 전사활성자 요소에 작동 가능한 상태로 연결되도록, 면역억제 인자를 암호화하는 서열을 표적화하는 gRNA 서열에 작동 가능한 상태로 연결된 유도성 RNA 중합효소 프로모터를 포함하는 제3 작제물을 도입함으로써 포유동물 세포(예를 들어, 인간 세포)의 면역원성을 제어하는 방법이 제공된다.

[1738] 일부 구현예에서, 면역억제 인자의 RNA 수준 제어에 유용한 유도 발현 시스템은 리간드 유도성 전사 인자 시스템, 수용체 매개 발현 제어 시스템, 및 리간드 조절된 리보스위치(riboswitch)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 유도 발현 시스템은 테트라사이클린-제어된 작동자 시스템, 합성 노치-기반(SynNotch) 시스템(예를 들어, 문헌[Morsut et al., Cell, 2016, 164:780-791 및 Yang et al., Commun Biol, 2020, 3:116] 참조), 및 생성된 예비-mRNA의 리간드(예를 들어, 압타머, 펩티드 또는 소분자) 매개 선택적 스플라이싱에 의한 면역억제 인자 유전자의 발현을 조절하는 리보스위치를 포함한다. 유용한 리보스위치는 리간드의 존재를 감지하고 표적 면역억제 인자 유전자의 스플라이스를 변경하는 센서 영역 및 효과기 영역을 포함한다. 리보스위치 gRNA의 상세한 설명 및 예는 예를 들어, 제US 9,228,207호, 제US 9,993,491호, 및 제US 10,421,989호, 및 문헌[Seeliger et al., PLoS One, 2012, 7(1):e29266]에서 발견되며, 이들의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1739] 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 CD47과 같은 면역억제 인자의 수준은 RNA 수준 안전 스위치에 의해 발현의

임계 수준의 약 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배, 1배 또는 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 CD47의 수준은 발현의 임계 수준의 약 10배 내지 5배, 10배 내지 3배, 9배 내지 1배, 8배 내지 1배, 7배 내지 0.5배, 6배, 내지 1배, 5배 내지 0.5배, 4배 내지 0.5배, 3배 내지 0.5배, 2배 내지 0.5배, 또는 1배 내지 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 경우에서, CD47 발현의 임계 수준은 유도 만능 줄기 세포에서 CD47의 외인성 발현에 기반하여 확립된다. 다른 경우에, CD47 발현의 임계 수준은 MHC I 및 MHC II 녹아웃 세포 또는 MHC I/MHC II/TCR 녹아웃 세포와 같은 상응하는 저면역 세포에서 CD47의 발현 수준에 기반하여 확립된다.

[1740] 5. DNA 수준 제어

[1741] 유도성 프로모터의 이용을 통한 면역억제 인자의 전사 조절은 이에 제한되지는 않지만, 독시사이클린과 같은 소분자의 추가 또는 제거를 통해 마음대로 스위치의 발현을 켜거나 끄는 능력을 제공한다. 표적화된 핵산분해효소 활성을 통한 유전적 파괴는 면역억제 인자의 발현을 제거하여 세포를 또한 은폐 해제할 수 있다.

[1742] 일부 구현예에서, 유도성 DNA 조절 방법은, 조직-특이적 프로모터, 유도성 프로모터, 제어가능한 리보스위치, 및 하나 이상의 면역억제 인자의 DNA 서열을 표적하기 위해 유도성 핵산분해효소(예를 들어, 유도성 CRISPR, 유도성 TALEN, 유도성 아연 집게 핵산분해효소, 유도성 귀소 핵산내부분해효소, 유도성 메가핵산분해효소, 등)을 사용하는 녹아웃을 사용하는 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 유도성 핵산분해효소는 그의 발현이 소분자의 존재에 의해 제어되도록 핵산분해효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 유도성 핵산분해효소는 세포에 핵산분해효소 RNA 또는 단백질의 전달이 소분자의 존재에 의해 제어되도록 핵산분해효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산분해효소의 발현은 소분자 또는 생물학적 작용제에 의해 유도된다. 일부 구현예에서, Cas 핵산분해효소 및/또는 안내 RNA[gRNA]의 발현은 소분자 또는 생물학적 작용제에 의해 유도된다.

[1743] 일부 구현예에서, 유도성 발현을 위한 방법은 리간드 유도성 전사 인자 시스템(예를 들어, 테트라사이클린-제어된 작동자 시스템), 발현 시스템(예를 들어, SynNotch 시스템)의 수용체 매개 제어, 및 mRNA 또는 gRNA 활성의 제어를 위한 리간드 조절된 리보스위치 시스템을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 유도성 발현 방법의 상세한 설명은 예를 들어, 문헌[Kallunki et al., Cells, 2019, 796 (doi:10.3390/cells8080796)]에서 발견되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1744] 일부 구현예에서, 면역억제 인자는 유도성 발현 벡터를 사용하여 세포에서 발현된다. 발현 벡터는 렌티바이러스 벡터와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 유도성 면역억제 인자는 렌티바이러스 형질도입에 의해 세포 내에 도입된다.

[1745] 일부 구현예에서, 면역억제 인자를 암호화하는 작제물의 사일런싱은 수용 대상의 면역계에 의한 조작된 세포의 제거를 초래한다. 또한, 유전자의 사일런싱은 조작된 세포를 제거할 것이기 때문에, 면역억제 인자 및 유도 발현 시스템을 함유하는 작제물은 내인성 유전자좌 내에 통합되어 카세트의 발현을 보호할 수 있다. 일부 구현예에서, 통합에 유용한 내인성 유전자좌는 코어 필수 유전자좌 또는 면역 신호전달 인자 유전자좌이다. 이러한 통합을 위한 코어 필수 유전자좌의 비제한적인 예는 RpS2, RpS9, RpS11, RpS13, RpS18, RpL8, RpL11, RpL32, RpL36, Rpnll, Psmd14, 및 PSMA3을 포함한다. 이러한 통합을 위한 면역 신호전달 인자 유전자좌의 비제한적인 예는 B2M, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA4, PD1, 및 NKG2D의 리간드(예를 들어, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, 및 RAET1N/ULBP3)을 포함한다.

[1746] 일부 구현예에서, 면역억제 인자의 조건부 발현은 면역 조절 인자 CD47의 발현을 조절하는데 기반한다. CD47은 대식세포에 의한 식세포 작용을 차단하기 위한 선천적 면역계의 부분으로서 "나를 먹지 말라"는 신호로 기능하는 선천적 면역계의 구성성분이다. 제어된 발현을 위해 조작될 수 있는 유용한 면역억제 인자는 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, 및 Mfge8을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1747] 일부 구현예에서, 본 개시는 CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, 및 Mfge8로 이루어진 군에서 선택된 면역억제 인자 중 임의의 하나를 조건부로 발현하도록 변형된 줄기 세포(예를 들어, 저면역원성 만능 줄기 세포 또는 저면역원성 유도 만능 줄기 세포) 또는 이의 분화된 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 면역억제 인자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFX-ANK, CIITA, NFY-A, NLRC5, B2M, RFX5, RFX-AP, HLA-G, HLA-E, NFY-B, PD-L1, NFY-C, IRF1, TAP1, GITR, 4-1BB, CD28, B7-1, CD47, B7-2, OX40, CD27, HVEM, SLAM, CD226, ICOS, LAG3, TIGIT, TIM3, CD160, BTLA, CD244, LFA-1, ST2, HLA-F, CD30, B7-H3, VISTA, TLT, PD-L2, CD58, CD2, 및 HELIOS로 이

루어진 군에서 선택된다.

[1748] 일부 구현예에서, 세포는 면역억제 인자 중 하나 이상을 조건부로 발현하여, 외인성 제어 신호 부재하에, 세포가 저면역원성이거나 또는 감소된 저면역원성을 갖도록 한다. 외인성 제어 신호의 존재하에, 세포는 면역 세포에 의해 인식되고 세포 사멸 또는 제거에 의해 표적화된다. 일부 경우에서, HIP 세포는 HIP 세포가 수용 대상의 면역 반응을 회피하도록 기능하는 면역억제 인자를 발현한다. HIP 세포를 외인성 제어 신호에 노출시킬 때, 면역억제 인자의 발현(예를 들어, DNA 수준 발현, RNA 수준 발현, 또는 단백질 수준 발현)은 하향 조절되고, 따라서 HIP 세포는 수용 대상에서 선천적 면역계에 의해 인식된다. 이와 같이, HIP 세포는 수용자에서 세포 사멸 및/또는 세포 제거된다.

[1749] 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 CD47과 같은 면역억제 인자의 수준은 DNA 수준 안전 스위치에 의해, 발현의 임계 수준의 약 10배, 9배, 8배, 7배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배, 1배 또는 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 CD47의 수준은 발현의 임계 수준의 약 10배 내지 5배, 10배 내지 3배, 9배 내지 1배, 8배 내지 1배, 7배 내지 0.5배, 6배, 내지 1배, 5배 내지 0.5배, 4배 내지 0.5배, 3배 내지 0.5배, 2배 내지 0.5배, 또는 1배 내지 0.5배 미만까지 감소된다. 일부 경우에서, CD47 발현의 임계 수준은, 유도 만능 줄기 세포에서 CD47의 외인성 발현에 기반하여 확립된다. 다른 경우에, CD47 발현의 임계 수준은 MHC I 및 MHC II 녹아웃 세포 또는 MHC I/MHC II/TCR 녹아웃 세포와 같은 상응하는 저면역 세포에서 CD47의 발현에 기반하여 확립된다.

[1750] 6. 조건부 HIP 세포 및 면역 신호전달 인자의 조건부 상향 조절 방법

[1751] 본원에는 세포의 저면역원성을 변경하기 위해 인자의 발현을 증가시키는 것과 같은 제어가능한 방식으로 면역 신호전달 인자의 발현을 위한 방법이 기재된다. 또한 하나 이상의 면역 신호전달 인자의 제어가능한 발현을 보유하는 HIP 세포가 기재된다. 일부 양태에서, 면역 신호전달 인자는 B2M, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, 및 NKG2D의 리간드(예를 들어, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, 및 RAET1N/ULBP3)로 이루어진 군에서 선택된다.

[1752] 하나 이상의 면역 신호 인자의 제어가능한 발현은 데그론을 사용한 유도성 리간드 안정화 시스템, 유도성 RNA 상향 조절 시스템(예를 들어, 유도성 CRISPR 활성화), 및 유도성 DNA 상향 조절 시스템을 통해 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 유도성 DNA 상향 조절 시스템은 유도성 CRISPR 활성화(CRISPRa), 조직-특이적 프로모터, 유도성 프로모터, 및 리보스위치를 포함한다.

[1753] CRISPRa 방법의 상세한 설명은 예를 들어, 문헌[Engreitz et al., Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11:a035386]에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 유도성 리보스위치의 상세한 설명 및 예는, 예를 들어, 제US 9,228,207호, 제US 9,993,491호, 및 제US 10,421,989호, 및 문헌[Seeliger et al., PLoS One, 2012, 7(1):e29266]에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[1754] 유전학적, 전사 후, 및 번역 후 조절을 통한 저면역 세포의 은폐 해제의 예에서, 저면역은 HLA-I 및 HLA-II 좌위의 억제 또는 유전적 파괴를 동반하는 보체 억제제인 CD47과 같은 저면역 분자의 과발현을 통해 달성된다. 이들 변형은 감염된, 악성 또는 비-자기 세포의 제거를 담당하는 T-세포, B-세포, NK 세포 및 대식세포와 같은 면역계의 효과기 세포에 대해 세포를 은폐한다. 면역계에 대해 세포를 은폐하는 것은 동종이계 세포의 신체 내에서의 존재 및 지속을 허용한다. 조작된 세포를 신체에서 제거하는 것은 환자 안전에 중요하며, 세포를 면역계에 대해 은폐 해제함으로써 달성될 수 있다. 은폐의 해제는 안전 스위치로서 작용하고, 저면역 분자(예를 들어, CD47, CD27, CD200, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-G, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, C1-억제제, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, 또는 Mfge8)의 하향 조절, 또는 면역 신호전달 분자(예를 들어, B2M, MIC-A/B, HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFXANK, CTLA-4, PD-1, 및 NKG2D의 리간드(예를 들어, MICA, MICB, RAET1E/ULBP4, RAET1G/ULBP5, RAET1H/ULBP2, RAET1/ULBP1, RAET1L/ULBP6, 또는 RAET1N/ULBP3)의 상향 조절에 의해 달성될 수 있다. 이들 활성 중 어느 하나는 세포를 천연 효과기 세포로 이용하여, 동종이계 세포의 제거를 초래할 것이다.

[1755] **X. 조작된 세포 집단 및 약학 조성물**

[1756] 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 세포 치료제를 제조하는 과정에서, 특정 변형이 세포에 도입될 수 있다. 복수의 제공된 조작된 세포를 함유하는 세포 집단이 본원에 제공된다. 복수의 조작된 세포를 함유하는 세포 집단이 본원에 제공된다.

[1757] 세포의 '최종' 집단, 즉 세포 치료제(약학 조성물)에 사용되는 세포 집단에서, 편집되지 않거나 부분적으로 편집된 세포는 세포 치료제의 기능에 악영향을 미칠 가능성이 있는 오염물질로 볼 수 있다. 일부 상황에서, 편집

된 세포의 백분율은 집단에서 편집된 세포 대 편집되지 않거나 부분적으로 편집된 세포의 비에 대한 순도의 척도로서 보여질 수 있다. 이는 특히 저면역 유전자 변형을 갖지 않는 세포의 존재가 세포 치료제의 생체내 효능에 악영향을 미칠 것으로 예상될 수 있는 경우인, 면역 회피를 가능하게 하는 저면역 유전자 변형과 관련된다. 놀랍게도, 본 발명자들에 의해 입증된 바와 같이, 세포 집단 내의 조작된 세포들은, 세포 집단이 편집되지 않거나 부분적으로 편집된 세포들을 함유하더라도 기능적일 수 있다. 따라서, 세포 집단을 포함하는 신규한 세포 치료제가 본원에 제공되며, 여기서 세포 집단은 일부 편집되지 않거나 부분적으로 편집된 세포를 함유한다.

[1758] 일부 구현예에서, 집단에서 세포의 20% 이하, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하, 60% 이하, 또는 65% 이하는 HIP 변형된 세포가 아니다(예를 들어, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 감소된 발현을 나타내지 않고, 임의로 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내지 않는다).

[1759] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 20% 이하, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하, 60% 이하, 또는 65% 이하는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 20% 이하, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하, 60% 이하, 또는 65% 이하는 (i) MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, (ii) 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내지 않는다. 이들 구현예 중 어느 하나에서, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 70%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 70%는 (i) MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, (ii) 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내지 않는다. 이들 구현예에서, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위일 수 있다.

[1760] 일부 구현예에서, 집단에서 적어도 세포의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 본원에 기재된 변형 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형 세트는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 발현을 감소시키고, 적어도 하나의 관용원성 인자, 예컨대 본원에 기재된 관용원성 인자의 발현을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 변형 세트는 하나 이상의 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 적어도 하나의 관용원성 인자, 예컨대 본원에 기재된 관용원성 인자의 발현을 증가시키고, CAR 이식유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형 세트는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 발현을 감소시키고, CAR 이식유전자를 포함한다.

[1761] 일부 구현예에서, 집단에서 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 또는 99.99%는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 변형 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, Serpinb9 또는 이의 임의의 조합 중 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47이다. 일부 구현예에서, 집단에서 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[1762] 일부 구현예에서, 집단에서 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 *B2M* 유전자의 양쪽 대립유전자 모두를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단에서 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 또는 99.99%는 *CIITA* 유전자의 양쪽 대립유전자 모두를 불활성화하는 하나 이상의 변형을 포함한다.

[1763] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 40% 이하는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위이다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 50% 이하는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위이다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 60% 이하는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위이다.

[1764] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 적어도 40%는 (i) MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나

이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, (ii) 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내지 않고, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위이다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 적어도 50%는 (i) MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, (ii) 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내지 않고, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위이다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 적어도 60%는 (i) MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내지 않고, (ii) 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내지 않고, 세포 치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%의 범위이다.

[1765] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형 세트를 포함하는 집단 내 세포의 비는 30-90%, 30-80%, 30-70%, 30-60%, 30-50% 또는 40-50%이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형 세트를 포함하는 집단 내 세포의 비는 40-90%, 40-80%, 40-70%, 40-60% 또는 40-50%이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 변형 세트를 포함하는 집단 내 세포의 비는 50-90%, 50-80%, 50-70% 또는 50-60%이다.

[1766] 일부 구현예에서, 세포치료제에서 세포의 30-90%, 30-80%, 30-70%, 30-60%, 30-50% 또는 40-50%는 HIP 변형된 세포이다(예를 들어, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 임의로 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄). 일부 구현예에서, 세포치료제에서 세포의 40-90%, 40-80%, 40-70%, 40-60% 또는 40-50%는 HIP 변형된 세포이다(예를 들어, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 임의로 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄). 일부 구현예에서, 세포치료제에서 세포의 50-90%, 50-80%, 50-70% 또는 50-60%는 HIP 변형된 세포이다(예를 들어, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 임의로 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타냄). 이들 임의의 구현예에서, 세포치료제에서 CAR을 발현하는 세포의 비는 70-100%, 80-100%, 90-100%일 수 있다.

[1767] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-80%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-70%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-60%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-50%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다.

[1768] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-80%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-70%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-60%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-50%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다.

[1769] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-80%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-70%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-60%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-50%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 80-100%는 CAR을 발현한다.

[1770] 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-80%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의

분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-70%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-60%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 세포 치료제에서 세포의 30-50%는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 하나 이상의 분자의 감소된 발현 및 적어도 하나의 관용원성 인자의 증가된 발현을 나타내는 HIP 변형된 세포이고, 세포의 90-100%는 CAR을 발현한다.

[1771] 또한, 본원에는 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 약학 조성물이다.

[1772] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 완충액, 예컨대, 인산염, 구연산염, 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 염화 헥사메토늄; 염화 벤잘코늄, 염화 벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이팅제, 예컨대, EDTA; 당류, 예컨대, 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대, 나트륨; 금속 복합체(예컨대, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리소르베이트(TWEEN™), 폴록사머(PLURONICS™) 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 완충액(예컨대, 중성의 완충 식염수 또는 인산염 완충 식염수)를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 예를 들어, pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 멸균, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 조성물의 흡수 또는 침투를 변형시키거나, 유지하거나 또는 보존하기 위한 하나 이상의 부형제를 함유할 수 있다. 일부 양태에서, 당업자는 세포를 함유하는 약학 조성물이 단백질을 함유하는 약학 조성물과 상이할 수 있음을 이해할 것이다.

[1773] 용어 '약학 제형'은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 형태이고, 제형이 투여되는 대상에 허용 불가능하게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[1774] '약학적으로 허용되는 담체'는 활성 성분을 제외하고, 대상에 비독성인 약학 제형 내의 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[1775] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는데 효과적인 양, 예컨대 치료 유효량 또는 예방 유효량으로 본원에 기재된 바와 같은 조작된 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는데 효과적인 양, 예컨대 치료 유효량 또는 예방 유효량으로 본원에 기재된 바와 같은 조작된 세포를 함유한다. 일부 구현예에서 치료 또는 예방 효능은 치료된 대상의 주기적 평가에 의해 모니터링된다. 병태에 따라, 며칠 또는 더 장기간에 걸쳐 반복된 투여의 경우, 치료는 질환 증상의 바람직한 억제가 발생할 때까지 지속된다. 그러나, 다른 용량 요법이 유용할 수 있고, 결정될 수 있다. 원하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여에 의해, 조성물의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[1776] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 세포는 표준 투여 기술, 제형 및/또는 장치를 사용하여 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 조작된 세포는 표준 투여 기술, 제형, 및/또는 장치를 사용하여 투여된다. 조성물의 저장 및 투여를 위한 제형 및 장치, 예컨대 주사기 및 바이알이 제공된다. 조작된 세포는 카테터 투여를 통한 국소 주사, 전신 주사, 국소 주사, 정맥내 주사, 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물(예를 들어, 조작된 세포를 함유하는 약학 조성물)을 투여하는 경우, 이는 일반적으로 주사가능한 단위 제형(용액, 현탁액, 에멀젼)으로 제형화될 것이다.

[1777] 제형은 정맥내, 복강내 또는 피하 투여를 위한 제형을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 비경구적으로 투여된다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 '비경구'는 정맥내, 관절내, 복강내, 근육내, 피하, 직장 또는 질내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상에게 투여된다.

[1778] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀젼, 분산액으로서 제공되며, 이는 일부 양태에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조성물은, 특히 주사로 투여하기에 다소 더 편리하다. 액체 조성물은 담체를 포함할 수 있으며, 이는 예를 들어 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하는 용매 또는 분산 매질 및 이의 적합한 혼합물일 수 있다. 멸균 주사용액은 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 덱스트로스 등과 같은 적합한 담체, 희석제 또는 부형제와 혼합된 것과 같은 용매에 세포를 혼입함으로써 제조될 수 있다.

[1779] 일부 구현예에서, 약학적으로 허용되는 담체는 약학적 투여와 상용성인, 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 포함할 수 있다(문헌[Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]). 이러한 담체 또는 희석제의 예는, 물, 식염수, 링거 용액, 덱스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 리포좀 및 비-수성 비히클, 예컨대 고정유가 또한 사용될 수 있다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 혼입될 수 있다. 약학적 담체는 식염수 용액, 덱스트로스 용액 또는 인간 혈청 알부민을 포함하는 용액과 같은 조작된 세포에 적합한 것이어야 한다. 일부 구현예에서, 이러한 조성물을 위한 약학적으로 허용되는 담체 또는 비히클은 조작된 세포가 살아있는 세포의 투여를 허용하기에 충분한 시간 동안 유지되거나 생존가능하게 유지될 수 있는 임의의 비-독성 수용액이다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 담체 또는 비히클은 식염수 또는 완충 식염수일 수 있다.

[1780] 일부 구현예에서, 약학 조성물을 비롯하여, 조성물은 멸균이다. 일부 구현예에서, 세포의 단리, 농축, 또는 배양은 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 예를 들어, 폐쇄된 또는 멸균 환경, 및 예를 들어, 멸균 배양 백 내에서 수행된다. 일부 구현예에서, 멸균은 예를 들면, 멸균된 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양은 가스 투과성 배양 용기를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 배양은 생물반응기를 사용하여 수행된다.

[1781] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1-72시간 동안 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1-7일 동안 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1-5주 동안 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1-12달 동안 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1-30년 동안 저장될 수 있다.

[1782] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 이들이 공여자 또는 공여자의 풀로부터 수집된 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 제조 전에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 제조를 시작한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 제조 공정의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 단계를 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 제조 공정의 한 개 이상의 단계를 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 제조 공정을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 변형 전에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 변형 시작 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 변형을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 한 개 이상의 변형을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 변형을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 유전자 편집 전에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 유전자 편집 시작 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 유전자 편집을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1개 이상의 유전자 편집을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 유전자 편집을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 바이러스 형질도입 전에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 바이러스 형질 도입 시작 전에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 바이러스 형질 도입을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 한 개 이상의 바이러스 형질도입을 완료한 후에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 세포 및 조성물은 바이러스 형질도입을 완료한 후에 저장될 수 있다.

[1783] 일부 구현예에서, 세포 및 조성물은 액체 질소에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 및 조성물은 -80℃의

냉동고에서 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 및 조성물은 -20℃의 냉동고에서 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 및 조성물은 얼음상에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 및 조성물은 드라이아이스상에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 및 조성물은 4℃의 냉장고에서 저장될 수 있다.

[1784] 또한, 제공된 조작된 세포를 동결보존하기에 적합한 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 동결보존 배지에서 동결보존된다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 무혈청 동결보존 배지이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 동결보호제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 동결보호제는 DMSO 및/또는 글리세롤이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 5% 내지 10% DMSO (v/v) 또는 약 이 범위이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 5% 또는 약 5% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 6% 또는 약 6% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 7% 또는 약 7% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 7.5% 또는 약 7.5% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 8% 또는 약 8% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 9% 또는 약 9% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 10% 또는 약 10% DMSO (v/v)이다. 일부 구현예에서, 동결보존 배지는 시판되는 동결보존 용액(CryoStor™ CS10)을 함유한다. CryoStor™ CS10은 10% 디메틸 설폭시드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 함유하는 동결보존 매질이다. 일부 구현예에서, 동결보존을 위해 제형화된 조성물은 저온, 예컨대 초저온, 예를 들어 -40℃ 내지 -150℃의 온도 범위, 예컨대 또는 약 80℃ ± 6.0℃ 에서 저장될 수 있다.

[1785] 동결보존 후, 집단에서 세포 일부, 예컨대 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0.1% 이하가 사멸될 수 있음이 이해될 것이다. 그렇지 않으면, 동결보존 후 세포 회복은 20% 이하 내지 10% 이하일 수 있다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기재된 조작된 세포, 및 31.25%(v/v)의 Plasma-Lyte A, 31.25%(v/v)의 5% 덱스트로스/0.45% 염화나트륨, 10%의 덱스트란 40(LMD)/5% 덱스트로스, 20%(v/v)의 25% 인간 혈청 알부민 [human serum albumin, HSA] 및 7.5%(v/v)의 디메틸설폭사이드(DMSO)를 포함하는 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[1786] 일부 구현예에서, 동결보존된 조작된 세포는 해동함으로써 투여를 위해 제조된다. 일부 경우에서, 조작된 세포는 해동 직후에 대상에게 투여될 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 조성물은 임의의 추가 가공 없이 바로 사용할 수 있다. 다른 경우에, 조작된 세포는 해동 후에, 예컨대 약학적으로 허용되는 담체로의 재현탁에 의해, 활성화 또는 자극제와의 인큐베이션에 의해 추가 가공되거나, 대상으로의 투여 전에 약학적으로 허용되는 완충제 중에서 활성화 세척 및 재현탁된다.

[1787] **XI. 키트, 구성 성분, 및 제조 물품**

[1788] 일부 양태에서, 본원에 기재된 방법, 장치 및 시스템의 키트, 구성 성분 및 조성물(예컨대, 소모품)이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 키트는 본원의 개시내용에 따라 사용하기 위한 설명서를 포함한다.

[1789] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조작된 세포 집단을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원은 (a) 복수의 조작된 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하고,, (ii) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들면, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현을 감소시키는 키트를 제공하고, 여기서 (i)의 증가된 발현 및 (ii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 대해 비교한 것이다. 일부 구현예에서, 복수의 조작된 세포를 포함하는 세포 집단을 포함하고, (ii) CD47의 발현을 증가시키고, 및 (iii) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자(예를 들어, 하나 이상의 MHC 클래스 I 인간 백혈구 항원 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 인간 백혈구 항원)의 발현을 감소시키는 키트 또는 조합을 제공하고, 여기서 (i) 및 (ii)의 증가된 발현 및 (iii)의 감소된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 대해 비교한 것이다.

[1790] 일부 구현예에서, 세포 치료법을 비롯한, 임상 이식 요법에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 일부 구현예에서, 제조 물품은 이에 제한되지는 않지만, 당뇨병(예를 들어, I형 당뇨병), 혈관성 병태 또는 질환, 자가면역 갑상선염, 살아있는 질환(예를 들어, 간 경변), 각막 질환(예를 들어, 푹스 이상증[Fuchs dystrophy] 또는 선천적 유전성 내피 이상증), 신장 질환 및 암(예를 들어, B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B-ALL], 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 급성 골수성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위 선암종, 췌장 선암종, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암)과 같은 세포 결함의 치료에 유용한 재료를 함유한다. 제조 물품은 용기 및 용기상에 또는 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사, 등(예를 들어, 유리 또는 플라스틱 용기)를 포함한다. 일반적으로, 용기는 동종 세포 치료법에 효과적인 조성물을 담

고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면, 용기는 피하 주사 바늘로 뚫릴 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음).

[1791] 일부 양태에서, 본원에 제공된 제조 키트 또는 물품은 본원에 제공된 임의의 조작된 세포와 같은, 조작된 세포 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 키트 또는 물품은 조작된 세포 집단을 포함하는 조성물을 포함하고, 여기서 조작된 세포는, (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자, (ii) a, 및 (iii) *B2M* 유전자의 양쪽 대립유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 베타 세포는 *CIITA* 유전자의 양쪽 대립유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 더 포함한다.

[1792] 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 특정 병태를 치료하는데 이용된다는 것을 표시한다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물을 환자에게 투여하기 위한 사용설명서를 더 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 제조 물품은 조합 병용 치료를 포함한다.

[1793] 제조 물품 및/또는 키트는 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다. 포장 삽입물은 증상, 용도, 투여량, 투여, 금기사항 및/또는 상기 치료적 생성물의 용도에 관한 경고에 대한 정보를 함유한 치료제품의 상업적 포장에 통상적으로 포함되는 설명서를 지칭한다.

[1794] **XII. 치료 방법**

[1795] 대상에서 질환 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위한, 본원에 기재된 조작된 세포 집단을 포함하는 제공된 세포 조성물과 관련된 조성물 및 방법이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 조작된 세포 집단을 투여함으로써 환자를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 투여를 위해 본원에 기재된 임의의 것과 같은 약학 조성물로 제형화된다. 이러한 방법 및 용도는 예를 들어, 질환, 상태 또는 장애가 있는 대상에게, 조작된 세포 집단 또는 이를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법 및 용도를 포함한다. 특정 질환의 증상에 대해, 본원에 제공된 바와 같은 적절한 조작된 세포를 선택하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 일부 구현예에서, 세포 또는 이의 약학 조성물은 질환 또는 장애의 치료에 효과적인 유효량으로 투여된다. 용도는 이러한 방법 및 치료에서, 및 이러한 치료 방법을 수행하기 위한 의약의 제조에서, 조작된 세포 또는 이의 약학 조성물의 용도를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 이에 의해 대상에서 질환 또는 병태 또는 장애를 치료한다.

[1796] 본원에 제공된 조작된 세포는, 예를 들어 질환 또는 장애의 치료를 위한 세포 치료법을 위한 후보를 포함하는 임의의 적합한 환자에게 투여될 수 있다. 세포 치료법을 위한 후보는 본원에 제공된 대상의 조작된 세포의 치료 효과에서 잠재적으로 이익을 얻을 수 있는 질환 또는 병태가 있는 임의의 환자를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 투여된 세포의 동종성 수용자이다. 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포는 동종 세포 치료법에서의 사용에 효과적이다. 본원에 제공된 대상의 조작된 세포의 치료 효과로부터 이익을 얻는 후보는 질병 또는 병태의 제거, 감소 또는 개선을 나타낸다.

[1797] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 임의의 방법에 의해 생산된 것을 포함하는, 본원에 제공된 조작된 세포가 세포 치료법에 사용될 수 있다. 본원에 약술된 치료적 세포는, 이에 제한되지 않지만, 암, 유전적 장애, 만성 감염성 질환, 자가면역 장애, 및 신경학적 장애 등과 같은 장애를 치료하는 데 유용하다.

[1798] 일부 구현예에서, 환자는 세포 결함을 가질 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, '세포 결함'은 환자에서 세포 집단의 기능 장애 또는 손실을 야기하는 임의의 질환 또는 병태를 지칭하며, 여기서 환자는 세포 집단을 자연적으로 대체하거나 재생할 수 없다. 예시적인 세포 결함은 자가면역 질환(예를 들어, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 류마티스성 관절염, 당뇨병, 전신성 루푸스 및 홍반성 낭창), 신경퇴행성 질환(예를 들어, 헌팅턴병 및 파킨슨병), 심혈관 병태 및 질환, 혈관성 병태 및 질환, 각막 병태 및 질환, 간 병태 및 질환, 갑상선 병태 및 질환, 및 신장 병태 및 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 세포가 투여된 환자는 암을 갖는다. 본원에 제공된 조작된 세포로 치료될 수 있는 예시적인 암은, B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B-ALL], 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 급성 골수성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위 선암종, 췌장 선암종, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 암 환자는 본원에 제공된 조작된 CAR T-세포의 투여에 의해 치료된다.

[1799] 일부 구현예에서, 본원은 조작된 세포 집단을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 방법을 제공하며, 여기서 조작된 세포는 투여 동안 또는 투여 후에 혈액과 접촉하게 되고, 조작된 세포는 조작된 세포가 혈액과 접촉하게 될 때 IBMIR을 방지하거나 약화시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 정맥내 또는 근육내

주사를 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 관용원성 인자(예를 들어, CD47)을 과발현하고, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현이 감소되거나 결여된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 베타 섬 세포 또는 간세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 보체 억제제의 과발현을 추가로 포함한다.

[1800] 일부 구현예에서, 세포 결함은 당뇨병과 연관되거나, 세포 치료법은 당뇨병의 치료를 위한 것이고, 임의로 당뇨병은 I형 당뇨병이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단은 베타 섬 세포를 포함하는 섬 세포 집단이다. 일부 구현예에서, 섬 세포는 섬 전구세포, 미성숙 섬 세포, 및 성숙 섬 세포로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 베타 섬 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하되, 여기서 조작된 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 멀티시스트론성 벡터, 및 (ii) *B2M* 유전자의 양쪽 대립유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 베타 섬 세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하되, 여기서 조작된 베타 섬 세포는 (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 베타 세포는 *CIITA* 유전자의 양쪽 대립 유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자는 멀티시스트론성 벡터이다.

[1801] 일부 구현예에서, 세포 결함은 간 질환과 연관되거나, 세포 치료법은 간 질환의 치료를 위한 것이다. 일부 구현예에서, 간 질환은 간 경변증이다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 간세포 또는 간 전구세포 집단이다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 간세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하되, 여기서 조작된 간세포는, (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자를 포함하고, (iii) *B2M* 유전자의 양쪽 대립 유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 간세포 집단을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하되, 여기서 조작된 간세포는, (i) CD47을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자를 포함하고, 및 (ii) *B2M* 유전자의 양쪽 대립 유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 간세포는 *CIITA* 유전자의 양쪽 대립 유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함한다. 일부 구현예에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 이식유전자는, 이식유전자가 멀티시스트론성 벡터인 것이다.

[1802] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은, 예를 들어 세포 이식물, 수혈, 조직 이식물, 또는 장기 이식물과 같은 이전의 이식물에 존재하는 하나 이상의 항원으로 감작된 환자의 치료에 유용하다. 특정 구현예에서, 이전의 이식물은 동종이계 이식이고, 환자는 동종이계 이식물 유래의 하나 이상의 동종 항원에 대해 감작된다. 동종이계 이식물은 동종이계 세포 이식물, 동종이계 수혈, 동종이계 조직 이식물, 또는 동종이계 장기 이식물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 환자는 임신 중이거나 임신 중이었던(예를 들어, 임신 중 동종면역화를 갖거나 가졌던) 감작된 환자이다. 특정 구현예에서, 환자는 이전 이식물에 포함된 하나 이상의 항원으로 감작되며, 여기서 이전 이식물은 변형된 인간 세포, 조직 또는 장기이다. 일부 구현예에서, 변형된 인간 세포, 조직 또는 장기는 변형된 자가 인간 세포, 조직 또는 장기이다. 일부 구현예에서, 이전 이식물은 비-인간 세포, 조직 또는 장기이다. 예시적인 구현예에서, 이전 이식물은 변형된 비-인간 세포, 조직, 또는 장기이다. 특정 구현예에서, 이전 이식물은 인간 성분을 포함하는 키메라이다. 특정 구현예에서, 이전 이식물은 CAR T-세포이다. 특정 구현예에서, 이전 이식물은 자가 이식물이고, 환자는 자가 이식물 유래의 하나 이상의 자가 항원에 대해 감작된다. 특정 구현예에서, 이전 이식물은 자가 세포, 조직 또는 장기이다. 특정 구현예에서, 감작된 환자는 알레르기를 갖고, 하나 이상의 알레르기 유발 항원에 감작된다. 예시적인 구현예에서, 환자는 건초열, 음식 알레르기, 곤충 알레르기, 약물 알레르기 또는 아토피 피부염을 갖는다.

[1803] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물을 사용하여 치료를 받고 있는 환자는, 이전에 치료를 받았다. 일부 구현예에서, 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 처리와 동일한 병태를 치료하는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 처리와 상이한 병태를 치료하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 환자에게 투여된 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은 이전 치료에 의해 치료된 동일한 병태 또는 질환의 위한 치료에 대해 향상된 치료 효과를 나타낸다. 특정 구현예에서, 투여된 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은, 이전의 치료와 비교하여 환자에서 병태 또는 질환의 치료에 대해 더욱 긴 치료 효과를 나타낸다. 예시적인 구현예에서, 투여된 세포는 이전 치료와 비교하여 암 세포에 대해 향상된 효력, 효능 및/또는 특이성을 나타낸다. 구현예에서, 조작된 세포는 암의 치료를 위한 CAR T-세포이다.

[1804] 본원에 제공된 방법은 실패한 제1선 치료 후에 특정 상태 또는 질병에 대한 제2선 치료로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 이전 치료는 치료적으로 비효과적인 치료이다. 본원에 사용된 바와 같이, '치료적으로 비효과적인' 치료는 환자에서 원하는 것보다 적은 임상 결과를 생성하는 치료를 지칭한다. 예를 들어, 세포 결함에 대한

치료와 관련하여, 치료적으로 비효과적인 치료는 환자에서 결함있는 세포를 대체하기 위해 원하는 수준의 기능적 세포 및/또는 세포 활성을 달성하지 못하고/못하거나 치료적 내구성이 결여된 치료를 지칭할 수 있다. 암 치료와 관련하여, 치료적으로 비효과적인 치료는 원하는 수준의 효력, 효능 및/또는 특이성을 달성하지 않는 치료를 지칭한다. 치료 효과는 당업계에 알려진 임의의 적합한 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 이전 치료에 대해 면역 반응을 생산한다. 일부 구현예에서, 이전 치료는 환자에 의해 거부된 세포, 조직 또는 장기 이식편이다. 일부 구현예에서, 이전 치료는 기계적으로 보조된 치료를 포함하였다. 일부 구현예에서, 기계적으로 보조된 치료는 혈액투석 또는 심실 보조 장치를 포함하였다. 일부 구현예에서, 환자는 기계적으로 보조된 치료에 대해 면역 반응을 생산하였다. 일부 구현예에서, 이전의 치료는, 바람직하지 않은 방식으로 성장 및 분열되는 경우에 치료 세포의 사멸을 야기할 수 있는 안전 스위치를 포함하는 치료 세포 집단을 포함하였다. 특정 구현예에서, 환자는 안전 스위치가 치료 세포의 사멸을 유도한 결과로서 면역 반응을 생성한다. 특정 구현예에서, 환자는 이전의 치료에서 감작된다. 예시적인 구현예에서, 환자는 본원에 제공된 바와 같은 투여된 조작된 세포에 의해 감작되지 않는다.

[1805] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물은, 조직, 장기 또는 부분 장기 이식을 필요로 하는 환자에게 이를 제공하기 전에, 투여된다. 구현예에서, 환자는 조작된 세포에 대해 면역 반응을 나타내지 않는다. 특정 구현예에서, 조작된 세포는 특정 조직 또는 장기에서 세포 결함의 치료를 위해 환자에게 투여되고, 환자는 이어서 동일한 특정 조직 또는 장기에 대한 조직 또는 장기 이식을 받는다. 이러한 구현예에서, 조작된 세포 치료는 궁극적인 조직 또는 장기 대체에 대한 다리[bridge] 요법으로서 기능한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 간 장애를 갖고, 간 이식을 받기 전에, 본원에 제공된 바와 같은 조작된 간세포 치료를 받는다. 특정 구현예에서, 조작된 세포는 특정 조직 또는 장기의 세포 결함의 치료를 위해 환자에게 투여되고, 환자는 이어서 상이한 조직 또는 장기에 대한 조직 또는 장기 이식을 받는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 환자는 신장 이식을 받기 전에 본원에 제공된 바와 같은 조작된 췌장 베타 세포로 치료되는 당뇨병 환자이다. 일부 구현예에서, 본 방법은 세포 결함의 치료를 위한 것이다. 예시적인 구현예에서, 조직 또는 장기 이식은 심장 이식, 폐 이식, 신장 이식, 간 이식, 췌장 이식, 장 이식, 위 이식, 각막 이식, 골수 이식, 혈관 이식, 심장 판막 이식, 또는 뼈 이식이다.

[1806] 환자를 치료하는 방법은 일반적으로 본원에 제공된 바와 같이, 조작된 세포, 또는 이를 함유하는 조성물의 투여를 통해 이루어진다. 이해되는 바와 같이, 세포 및/또는 치료 시기와 관련된 본원에 기재된 모든 다수의 구현예에 대해, 세포의 투여는 원하는 부위에서 도입된 세포의 적어도 부분적 국재화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해 달성된다. 세포는 원하는 부위에 직접 삽입이식될 수 있거나, 대안적으로, 삽입이식된 세포 또는 세포의 성분의 적어도 일부가 생존 가능한 상태로 유지되는 대상의 원하는 위치로 전달되는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 세포 치료법에 의해 완화될 수 있는 질환 또는 장애, 예컨대 임의의 질환, 장애, 상태 또는 그의 증상을 치료하기 위해 투여된다.

[1807] 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은, 환자가 감작된 후, 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 1주, 또는 적어도 1개월 이상에 투여된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은, 환자가 감작되거나 감작의 특징 또는 특성을 나타낸 후, 적어도 1주 이상(예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주 이상)에 투여된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은, 환자가 이식(예를 들어, 동종이계 이식)을 받았거나, 임신했거나(예를 들어, 임신에서 동종면역화를 갖거나 가졌음), 감작되거나 감작의 특징 또는 특성을 나타낸 후, 적어도 1개월 이상(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월 이상)에 투여된다.

[1808] 일부 구현예에서, 이식을 받은 환자, 임신한 환자(예를 들어, 임신에서 동종면역화를 가졌거나 가졌음), 및/또는 항원(예를 들어, 동종항원)에 대해 감작된 환자는 본원에 기재된 조작된 세포 집단의 제1 용량 투여, 제1 용량 후 회복 기간, 및 기재된 조작된 세포 집단의 제2 용량 투여를 포함하는 투여 요법을 투여받는다. 일부 구현예에서, 제1 세포 집단 및 제2 세포 집단에 존재하는 세포 유형의 복합체는 상이하다. 특정 구현예에서, 제1의 조작된 세포 집단 및 제2의 조작된 세포 집단에 존재하는 세포 유형의 복합체는 동일하거나 실질적으로 동등하다. 많은 구현예에서, 제1의 조작된 세포 집단 및 제2의 조작된 세포 집단은 동일한 세포 유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1의 조작된 세포 집단 및 제2의 조작된 세포 집단은 상이한 세포 유형을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1의 조작된 세포 집단 및 제2의 조작된 세포 집단은 동일한 백분율의 세포 유형을 포함한다. 다른 구현예에서, 제1의 조작된 세포 집단 및 제2의 조작된 세포 집단은 상이한 백분율의 세포 유형을 포함한다.

[1809] 일부 구현예에서, 회복 기간은 조작된 세포 집단 또는 이를 함유하는 조성물의 제1 투여 후에 시작되고, 이러한 세포가 환자에서 더 이상 존재하지 않거나 검출 가능하지 않을 때 종료된다. 일부 구현예에서, 회복 기간의 지속기간은 세포의 최초 투여 후, 적어도 1주(예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주 이상)이상이다. 일부 구현예에서, 회복 기간의 지속 기간은 세포의 최초 투여 후, 적어도 1개월(예를 들어, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월 이상) 이상을 포함한다.

[1810] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 대상에게 투여될 때 저면역원성이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 저면역이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에 대한 면역 반응은, 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생산된 면역 반응의 수준에 비교하여, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 감소되거나 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 조작된 세포에 대한 면역 반응을 유도하지 못한다.

[1811] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 감소된 수준 또는 더 낮은 수준의 전신 TH1 활성화를 유도한다. 일부 경우에서, 세포에 의해 유도된 전신 TH1 활성화 수준은, 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생산된 전신 TH1 활성화의 수준에 비교하여, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 전신 TH1 활성화를 유도하지 못한다.

[1812] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 감소된 수준 또는 더 낮은 수준의 말초 혈액 단핵 세포[PBMC]의 면역 활성화를 유도한다. 일부 경우에서, 세포에 의해 유도된 PBMC의 면역 활성화 수준은, 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생산된 PBMC의 면역 활성화 수준에 비교하여, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 PBMC의 면역 활성화를 유도하지 못한다.

[1813] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 감소된 수준 또는 더 낮은 수준의 공여체-특이적 IgG 항체를 유도한다. 일부 경우에서, 세포에 의해 유도된 공여자 특이적 IgG 항체의 수준은 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생산된 공여자 특이적 IgG 항체의 면역 활성화 수준에 비교하여, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단은 환자에서 공여자 특이적 IgG 항체를 유도하지 못한다.

[1814] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 감소된 수준 또는 더 낮은 수준의 IgM 및 IgG 항체 생산을 유도한다. 일부 경우에서, 세포에 의해 유도된 IgM 및 IgG 항체의 수준은 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생산된 IgM 및 IgG 항체 생산의 수준에 비교하여, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 IgM 및 IgG 항체 생산을 유도하지 못한다.

[1815] 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함유하는 조성물은 환자에서 감소된 수준 또는 더 낮은 수준의 세포독성 T 세포 사멸을 유도한다. 일부 경우에서, 세포에 의해 유도된 세포독성 T 세포 사멸의 수준은 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않는 세포 집단)의 투여에 의해 생산된 세포독성 T 세포 사멸의 수준에 비교하여, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 더 낮다. 일부 구현예에서, 투여된 조작된 세포 집단, 또는 이를 함

유하는 조성물은 환자에서 세포독성 T 세포 사멸을 유도하지 못한다.

[1816] 상기 논의된 바와 같이, 특정 구현예에서 인간 백혈구 항원과 같은 동종항원에 대해 감작된 환자에게 투여될 수 있는 세포가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 환자는, 예를 들어 임신 중 동종면역화(예를 들어, 태아 및 신생아의 용혈성 질환[hemolytic disease of the fetus and newborn, HDFN], 신생아 동종면역 호중구 감소증[neonatal alloimmune neutropenia, NAN] 또는 태아 및 신생아 동종면역 혈소판감소증[fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia, FNAIT])를 가진 채, 임신 중이거나 임신 중이었다. 즉, 환자는 이에 제한되지는 않지만, 태아 및 신생아의 용혈성 질환[HDFN], 신생아 동종면역 호중구 감소증[NAN] 및 태아 및 신생아 동종면역 혈소판감소증[FNAIT]과 같은 임신 중 동종면역화와 연관된 장애 또는 병태를 갖거나 가졌었다. 일부 구현예에서, 환자는 이에 제한되지 않지만, 동종 세포 이식, 동종 수혈, 동종 조직 이식 및 동종 장기 이식과 같은 동종이계 이식을 받았었다. 일부 구현예에서, 환자는 동종항원에 대한 기억 B 세포를 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 동종항원에 대한 기억 T 세포를 나타낸다. 이러한 환자는 동종항원에 대한 기억 B 및 기억 T 세포를 모두 나타낼 수 있다.

[1817] 기재된 세포의 투여 시, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응에 비교하여, 전신 면역 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 전신 면역 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응에 비교하여, 적응성 면역 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 적응성 면역 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응에 비교하여, 선천성 면역 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 선천성 면역 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응에 비교하여, T 세포 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 T 세포 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 환자는 저면역원성이 아닌 세포에 대한 반응에 비교하여, B 세포 반응을 나타내지 않거나 감소된 수준의 B 세포 반응을 나타낸다.

[1818] **A. 용량 및 용량 용법**

[1819] 본원에 기재된 임의의 치료 유효량의 세포는, 치료되는 증상에 따라, 약학 조성물에 포함될 수 있다. 세포의 비제한적 예는, 일차 세포(예를 들어, 일차 베타 섬 세포) 및 기재된 바와 같은 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 세포(예를 들어, iPSC에서 분화된 베타 섬 세포 또는 간세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 적어도 약 1×10^2, 5×10^2, 1×10^3, 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 또는 5×10^{10}개의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 1×10^2, 5×10^2, 1×10^3, 5×10^3, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 또는 5×10^{10}개 이하의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 6.0×10^8 개 이하의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 8.0×10^8 개 이하의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 적어도 약 1×10^2-5×10^2, 5×10^2-1×10^3, 1×10^3-5×10^3, 5×10^3-1×10^4, 1×10^4-5×10^4, 5×10^4-1×10^5, 1×10^5-5×10^5, 5×10^5-1×10^6, 1×10^6-5×10^6, 5×10^6-1×10^7, 1×10^7-5×10^7, 5×10^7-1×10^8, 1×10^8-5×10^8, 5×10^8-1×10^9, 1×10^9-5×10^9, 5×10^9-1×10^{10}, 또는 1×10^{10} - 5×10^{10}개의 세포를 포함한다. 예시적인 구현예에서, 약학 조성물은 약 1.0×10^6 내지 약 2.5×10^8개의 세포를 포함한다.

[1820] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 적어도 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400 또는 500 ml의 부피를 갖는다. 예시적인 구현예에서, 약학 조성물은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 500 ml 이하의 부피를 갖는다. 예시적인 구현예에서, 약학 조성물은 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 또는 500 ml 이하의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 1-50 ml, 50-100 ml, 100-150 ml, 150- 200 ml, 200-250 ml, 250-300 ml, 300-350 ml, 350-400 ml, 400-450 ml, 또는 450-500 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 1-50 ml, 50-100 ml, 100-150 ml, 150-200 ml, 200-250 ml, 250-300 ml, 300-350 ml, 350-400 ml, 400-450 ml, 또는 450-500 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 1-10 ml, 10-20 ml, 20-30 ml, 30-40 ml, 40-50 ml, 50-60 ml, 60-70 ml, 70-80 ml, 70-80 ml, 80-90 ml, 또는 90-100 ml의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 약 5 ml 내지 약 80

ml 범위의 부피를 갖는다. 예시적인 구현예에서, 약학 조성물은 약 10 ml 내지 약 70 ml 범위의 부피를 갖는다. 많은 구현예에서, 약학 조성물은 약 10 ml 내지 약 50 ml 범위의 부피를 갖는다.

[1821] 구체적인 양/용량 용법은 개인의 체중, 성별, 연령 및 건강, 제형, 생화학적 성질, 생체활성, 생체 이용률 및 세포의 부작용, 및 완전한 치료 요법에서 세포의 수 및 정체성에 따라 달라질 것이다.

[1822] 일부 구현예에서, 약학 조성물의 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피에서 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8개의 세포를 포함하고, 약학 조성물은 단일 용량으로서 투여된다.

[1823] 많은 구현예에서, 세포는 T 세포이고, 약학 조성물은 약 2.0×10^6 내지 약 2.0×10^8개의 세포, 예컨대, 이에 제한되지는 않지만, 일차 T 세포, 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 T 세포를 포함한다. 일부 경우에서, 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피에서 본원에 기재된 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8개의 일차 T 세포를 포함한다. 몇몇 경우에서, 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피에서 위에 기재된 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8 개의 일차 T 세포를 포함한다. 각종 경우에서, 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피에서 본원에 기재된 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8개의 T 세포를 포함한다. 다른 경우에서, 용량은 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8개보다 더 낮은 범위에 있는, 일차 T 세포 또는 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 T 세포를 비롯한 T 세포이다. 또 다른 경우에서, 용량은 약 1.0×10^5 내지 약 2.5×10^8개보다 더 높은 범위에 있는, 일차 T 세포 또는 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 T 세포를 비롯한 T 세포이다.

[1824] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 50 kg 이하의 대상에 대해 체중 kg당, 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^7개의 조작된 세포(예컨대, 일차 세포 또는 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 세포)의 단일 용량으로서 투여된다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 50kg 이하의 대상에 대해 체중 kg 당, 약 0.5×10^5 내지 약 1.0×10^7, 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^7, 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^7, 약 5.0×10^5 내지 약 1×10^7, 약 1.0×10^6 내지 약 1×10^7, 약 5.0×10^6 내지 약 1.0×10^7, 약 1.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 1.0×10^5 내지 약 1.0×10^6, 약 1.0×10^5 내지 약 5.0×10^5, 약 1.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 2.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 3.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 4.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 5.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 6.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 7.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 약 8.0×10^5 내지 약 5.0×10^6, 또는 약 9.0×10^5 내지 약 5.0×10^6개의 세포의 단일 용량으로서 투여된다. 일부 구현예에서, 용량은 50 kg 이하의 대상에 대해 체중 kg 당, 약 0.2×10^6 내지 약 5.0×10^6개의 세포이다. 많은 구현예에서, 용량은 50 kg 이하의 대상에 대해 체중 kg당 약 0.2×10^6 내지 약 5.0×10^6개의 세포보다 더 적은 범위이다. 많은 구현예에서, 용량은 50 kg 이하의 대상에 대해 체중 kg당 약 0.2×10^6 내지 약 5.0×10^6 개 세포보다 더 높은 범위이다. 예시적인 구현예에서, 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피이다. 일부 구현예에서, 용량은 정맥내로 투여된다.

[1825] 예시적인 구현예에서, 세포는 50 kg 초과의 대상에 대해 약 1.0×10^6 내지 약 5.0×10^8개의 세포(예컨대, 일차 세포 및 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 세포)의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 50 kg 이하의 대상에 대해 체중 kg 당 약 0.5×10^6 내지 약 1.0×10^9, 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^9, 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^9, 약 5.0×10^6 내지 약 1.0×10^9, 약 1.0×10^7 내지 약 1.0×10^9, 약 5.0×10^7 내지 약 1.0×10^9, 약 1.0×10^6 내지 약 5.0×10^7, 약 1.0×10^6 내지 약 1.0×10^7, 약 1.0×10^6 내지 약 5.0×10^7, 약 1.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 약 2.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 약 3.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 약 4.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 약 5.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 약 6.0×10^7 내지 약 $5.0x\ 10^8$, 약 7.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 약 8.0×10^7 내지 약 5.0×10^8, 또는 약 9.0×10^7 내지 약 5.0×10^8개의 세포의 단일용량으로서 투여된다. 많은 구현예에서, 세포는 50 kg 초과의 대상에 대해 약 1.0×10^7 내지 약 2.5×10^8개의 세포의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 50 kg 초과의 대상에 대해 약 1.0×10^7개 미만 내지 약 2.5×10^8개 세포 범위의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 50 kg 초과의

대상에 대해 약 1.0 x 10^7개 초과 내지 약 2.5 x 10^8개 세포 범위의 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 용량은 정맥내로 투여된다. 예시적인 구현예에서, 단일 용량은 약 10 ml 내지 50 ml의 부피이다. 일부 구현예에서, 용량은 정맥내 투여된다.

[1826] 예시적인 구현예에서, 용량은 약 1 내지 50 ml/분, 1 내지 40 ml/분, 1 내지 30 ml/분, 1 내지 20 ml/분, 10 내지 20 ml/분, 10 내지 30 ml/분, 10 내지 40 ml/분, 10 내지 50 ml/분, 20 내지 50 ml/분, 30 내지 50 ml/분, 40 내지 50 ml/분의 속도로 정맥내 투여된다. 다수의 구현예에서, 약학 조성물은 정맥내 투여를 위해 하나 이상의 주입 백에 저장된다. 일부 구현예에서, 용량은 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 60분, 70분, 80분, 90분, 120분, 150분, 180분, 240분 또는 300분 이하에 완전히 투여된다.

[1827] 일부 구현예에서, 약학 조성물의 단일 용량은 단일 주입 백에 존재한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물의 단일 용량은 2, 3, 4 또는 5개의 개별 주입 백으로 분할된다.

[1828] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포는 2, 3, 4, 5 또는 6회 이상의 용량과 같이, 복수의 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 1 내지 24시간 간격 범위로 대상에 투여된다. 일부 경우에서, 후속 용량은 최초 또는 선행 용량 이후 약 1 내지 약 24시간(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 약 24시간)에 투여된다. 일부 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 약 1 내지 28시간 간격 범위로 대상에 투여된다. 일부 경우에서, 후속 용량은 최초 또는 선행 용량 이후 약 1 내지 약 28일(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 또는 약 28일)에 투여된다. 많은 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 약 1 내지 약 6주 간격 범위로 대상에 투여된다. 특정 경우에서, 후속 용량은 초기 또는 선행 용량 이후 약 1 내지 약 6주(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6주)에 투여된다. 몇몇 구현예에서, 복수의 용량 중 각각의 용량은 약 1 내지 약 12개월 간격 범위로 대상에게 투여된다. 일부 경우에서, 후속 용량은 최초 또는 선행 용량 이후 약 1 내지 약 12개월(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월)에 투여된다.

[1829] 일부 구현예에서, 대상은 제1 시점에서 제1 용량 용법이 투여되고, 이어서 제2 시점에서 제2 용량 용법이 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 용량 용법은 제2 용량 용법과 동일하다. 다른 구현예에서, 제1 용량 용법은 제2 용량 용법과 상이하다. 일부 경우에서, 제1 용량 용법 및 제2 용량 용법에서 세포의 수는 동일하다. 일부 경우에서, 제1 용량 용법 및 제2 용량 용법에서 세포의 수는 상이하다. 일부 경우에서, 제1 용량 용법 및 제2 용량 용법에서의 투약 횟수는 동일하다. 일부 경우에서, 제1 용량 용법 및 제2 용량 용법에서의 투약 횟수는 상이하다.

[1830] 일부 구현예에서, 세포는 조작된 T 세포(예를 들어, T 세포 또는 조작된 유도 만능 줄기 세포에서 분화된 T 세포)이며, 제1 용량 용법은 제1 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하고, 제2 용량 용법은 제1 CAR 및 제2 CAR이 상이하도록 제2 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함한다. 예를 들어, 제1 CAR 및 제2 CAR은 상이한 표적 항원에 결합한다. 일부 경우에서, 제1 CAR은 항원에 결합하는 scFv를 포함하고, 제2 CAR은 상이한 항원에 결합하는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 용량 용법은 제1 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하고, 제2 용량 용법은 제1 CAR 및 제2 CAR이 동일하도록 제2 CAR을 발현하는 조작된 T 세포 또는 일차 T 세포를 포함한다. 제1 용량 용법은 제2 용량 용법과 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 1-3개월, 1-6개월, 4-6개월, 3-9개월, 3-12개월 이상의 간격으로 대상에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상은 질환(예를 들어, 암)의 과정 동안 복수의 용량 용법을 투여받고, 용량 용법 중 적어도 두 번은 여기 기재된 동일 유형의 조작된 T 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 복수의 용량 용법 중 적어도 두 번은 여기 기재된 상이한 유형의 조작된 T 세포를 포함한다.

[1831] **B. 면역억제제**

[1832] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포 집단 또는 이를 함유하는 조성물의 제1 투여 전에, 환자에게 투여되지 않는다.

[1833] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포의 투여를 받은 환자에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포 집단의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포의 제1 투여 및/또는 제2 투여 전에 투여된다.

[1834] 면역억제제 및/또는 면역조절제의 비제한적인 예는 시클로스포린, 아자티오프린, 미코페놀산, 미코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니손, 메토트렉세이트, 금염, 설파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노미드, 미조리빈, 15-데옥시스퍼구알린, 6-메르캅토푸린, 시클로포스파미드, 라파마이신, 타크롤리

무스(FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로불린, 티모펜틴, 티모신-α, 및 유사 작용제를 포함한다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 IL-2 수용체의 p75에 결합하는 항체, 예를 들어, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-감마, TNF-알파., IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, 또는 CD58에 결합하는 항체, 및 이들의 리간드 중 어느 하나에 결합하는 항체로 이루어진 면역억제 항체의 군에서 선택된다. 이러한 면역억제제 및/또는 면역조절제가 세포의 제1 투여 전 또는 후에 환자에게 투여되는 일부 구현예에서, 투여는, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II는 발현하고, CD47의 외인성 발현은 없는 세포에 요구될 수 있는 것보다 더욱 낮은 투약량으로 수행된다.

[1835] 일부 구현예에서, 그러한 면역억제제 및/또는 면역조절제는 가용성 IL-15R, IL-10, B7 분자(예를 들어, B7-1, B7-2, 이들의 변이체 및 이들의 단편), ICOS 및 OX40, 즉 T 세포 조절제의 억제제(예컨대 CTLA-4에 대한 항체로서) 및 유사 작용제에서 선택될 수 있다.

[1836] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포 집단의 제1 투여 전에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 제1 투여의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 제1 투여의 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 전에 투여된다.

[1837] 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 제1 투여 후 환자에게 투여되지 않거나, 또는 세포의 제1 투여의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 제1 투여 후 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주 또는 10주 이상에 투여된다.

[1838] 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포 집단의 투여 전에 환자에게 투여되지 않는다. 많은 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 조작된 세포 집단의 제1 및/또는 제2 투여 전에 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 투여 전 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 제1 및/또는 제2 투여 전 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 전에 투여된다. 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 투여 후 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 이상 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 면역억제제 및/또는 면역조절제는 세포의 제1 및/또는 제2 투여의 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 후에 투여된다.

[1839] 면역억제제 및/또는 면역조절제가 세포의 투여 전 또는 후에 환자에게 투여되는 일부 구현예에서, 투여는 면역원성 세포(예를 들어, 동일한 또는 유사한 세포 유형 또는 표현형이지만, 조작된 세포의 변형, 예를 들어, 유전자 변형을 함유하지 않고, 예를 들어 내인성 수준의 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 발현 및 증가된 (예를 들어, 외인성) 발현의 CD47을 갖는 세포 집단)에서 요구될 수 있는 것보다 낮은 투여량으로 수행된다.

[1840] **XIII. 결론**

[1841] 위에 상술된 기술의 구현예의 설명은 배타적이거나 또는 위에 개시된 정확한 형태로 기술을 제한하려는 의도는 아니다. 기술에 대한 구체적 구현예 및 실시예를 예시의 목적을 위해 본원에 개시하였지만, 관련 분야의 당업자가 인식하는 바와 같이 기술 범주 내에서 다양한 균등한 변형이 가능하다. 예를 들어, 단계들이 제공된 순서로 제시되지만, 대안의 구현예는 단계들을 상이한 순서로 수행할 수 있다. 본원에 기재한 다양한 구현예는 또한 조합되어 추가 구현예를 제공할 수 있다.

[1842] 앞서 언급한 것으로부터, 기술의 구체적인 구현예를 예시의 목적을 위해 본원에 개시하였지만, 기술의 구현예의 설명을 불필요하게 모호하게 하는 것을 피하기 위해 공지된 구성성분 및 기능을 상세하게 나타내거나 개시하지 않았다. 문맥상 허용되는 경우, 단일 또는 복수의 용어는 또한 각각 복수 또는 단일 형태를 포함할 수 있다. 추가로, 기술의 일부 구현예와 관련된 이점이 해당 구현예와 관련하여 기재되었지만, 다른 구현예가 또한 이러한 이점을 나타낼 수 있고, 모든 구현예가 기술 범주 내에 속하는 이러한 이점을 반드시 나타낼 필요는 없다.

[1843] 따라서, 개시내용 및 관련 기술은, 명시적으로 나타내거나 본원에 개시되지 않은 다른 구현예를 포괄할 수 있다.

[1844] **실시예**

[1845] 본 개시는 다음의 비제한적인 예들에 의해 추가로 설명될 수 있으며, 여기서 당업자들에게 공지된 표준 기술들 및 이들 예들에 설명된 기술들과 유사한 기술들이 적절한 경우 사용될 수 있다. 당업자는 본원에 제공된 개시와

일치하는 추가 실시예를 구상할 것으로 이해된다.

[1846] **실시예 1. RNA-seq를 사용한 CD47 동형체 발현의 측정**

[1847] 각각의 CD47 동형체의 발현은 두 개의 인간 줄기 세포 시료, Gibco WT 및 RUES2 WT에서, RNA-seq에 의해 측정하였다. 구체적으로, Qiagen AllPrep DNA/RNA 단리 키트를 이용하여, 시료당 1 x 10^6개의 세포에서 RNA를 추출하였다. Qiashredder를 사용하여 추출 과정동안 용해물을 균질화하였다. Bioanalyzer를 사용하여 RNA를 정량하고, RNA 품질을 평가하였다. RUES2 WT 시료 유래의 RNA 500ng 및 Gibco WT 시료 유래의 RNA 100ng을 라이브러리 생성에 사용하였다(500ng 미만의 RNA가 Gibco WT 시료에서 추출되었기 때문임). Illumina TruSeq Stranded mRNA 키트를 사용하여 라이브러리를 생성하였다. 제조업체의 프로토콜을 사용하였다. Illumina Truseq Indices(96개 시료, 96개 인덱스) 플레이트에 대한 IDT를 어댑터(adapter)로 사용하였다. 라이브러리를 Bioanalyzer에서 실행하여 품질을 검사하고 qPCR(카파 정량화 키트)을 사용하여 정량하였다.

[1848] RNA-seq 결과는 표 28에 요약하였다. RNA-seq 결과에 따르면, CD47-202와 CD47-201은 Gibco 및 Rues2 인간 줄기 세포주에서 상대적으로 동등한 수준으로 발현되었다. CD47-206, 205, 204는 또한 이들 줄기 세포주에서 고도로 발현되는 것으로 나타났다. 이러한 줄기 세포주에서는 CD47-203 발현의 증거는 검출되지 않았다.

[1849] **[표 28] RNA-seq 결과**

전사체 이름	전사체 ID (bp 길이)	Gibco WT의 TPM* (SSAM000366)	RUE2 WT의 TPM (SSAM000361)
CD47-202	ENST00000361309 (5292)	0.21	1.07
CD47-201	ENST00000355354 (5228)	1.90	0.84
CD47-206	ENST00000644850 (766)	3.38	5.96
CD47-205	ENST00000517766 (538)	4.68	2.81
CD47-204	ENST00000471694 (6796)	0.90	2.46

* TPM은 백만 당 전사체를 지칭함
** CD47-203은 판독값이 뒷받침되지 않음

[1850]

[1851] **실시예 2. CD47KO 세포에서 절두된 CD47 변이체 발현**

[1852] 이들 실험의 전체 목표는 표적 세포에 전달될 수 있는 CD47의 절두 변이체를 설계하고 SIRPα 기능적 상호작용을 달성하는 것이었다. 하기 표 29는 본 연구의 일부로서 설계된 절두된 CD47 변이체를 나타낸다.

[1853] [표 29] 절두된 CD47 변이체

설계된 절두된 CD47 변이체	핵산 서열번호	아미노산 서열번호
야생형 hCD47	19	N/A
CD47-202	14	2
CD47-201	13	1
CD47-206 (N-말단 없음)	133	80
CD47-206 (복구된 N-말단이 있음)	134	81
결실된 TMD3	135	82
결실된 EC + TMD3	136	83
결실된 TMD2 + EC + TMD3	137	84
결실된 최종IC	138	85
결실된 TMD5 +최종IC	139	86
결실된 EC + TMD5 + 최종 IC	140	87
결실된TMD4	141	88
CD47 ECD (DAF/CD55 GPI 닻이 있음)	142	89
CD47 ECD (긴 TRAILR3-GPI 닻이 있음)	143	90
CD47 ECD (짧은 TRAILR3-GPI 닻이 있음)	144	91
CD47 ECD (CD8a TMD 및 짧은 ICD (9aa)가 있음)	145	92
CD47 ECD (CD28 TMD 및 짧은 ICD (9aa)가 있음)	146	93
CD47 ECD (PDGFR TMD 및 짧은 ICD (9aa)가 있음)	147	94
CD47 IgV, (힌지 영역에서 3aa, PDGFR 힌지, TMD 및 짧은 ICD (9aa)가 있음)	148	95
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, IgG4 힌지 - CD28 TM	149	96
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, IgG4 힌지 - CD8a TM	150	97
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD28 힌지 - CD28 TM	151	98
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD28 힌지 - CD8a TM	152	99
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD8a 힌지 - CD8a TM	153	100
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD8a 힌지 - CD8a TM	154	101
Cod Opt CD47(CDA 이시스트론성에서 유래)	200	199
hCD47 N361 돌연변이체	171	118
hCD47 N362 돌연변이체	172	119
hCD47 N363 돌연변이체	173	120
hCD47 N364 돌연변이체	174	121
hCD47 N366 돌연변이체	175	122
hCD47 N368 돌연변이체	176	123
hCD47 N369 돌연변이체	177	124
hCD47 N3610 돌연변이체	178	125
hCD47 N3612 돌연변이체	179	126
hCD47 N3614 돌연변이체	180	127
hCD47 N3617 돌연변이체	181	128
hCD47 N3618 돌연변이체	182	129
hCD47 N3621 돌연변이체	183	130
hCD47 N3623 돌연변이체	184	131
hCD47 N3624 돌연변이체	185	132

[1854]

[1855]

[1856] 하기 실험을 수행하여, 절두된 CD47 변이체 각각에 대한 LVV를 생성하고(상기 표 5에 기재됨), 항-CD47 항체 염

색 및 SIRPα-Fc 염색에 의해 측정된 바와 같은 CD47 세포외 도메인[extra cellular domain, ECD] 발현에 차이가 있는지를 결정하였다.

[1857] **방법**

[1858] 렌티바이러스 벡터(LVV) 생산

[1859] 본 실시예에서는, 3세대 렌티바이러스 생산 방법을 이용하여 렌티바이러스 벡터[lentiviral vector, LVV]를 제조하였다. 당업자는 LVV를 제조하기 위한 당업계에 알려진 다른 방법이 본원에 기재된 방법과 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예시적인 방법들이 월드 와이드 웹을 통해 addgene.org/guides/lentivirus 웹페이지에서 이용 가능하다. 간략히 설명하면, 1일에 293T를 조직 배양 플레이트에 플레이팅하였다. 다음 날, 세포를 표 5(상기 참조)에 기재된 CD47 변이체 중 하나를 암호화하는 렌티바이러스 전달 벡터, 렌티바이러스 외피 플라스미드, 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드로 형질감염시켰다. 2일 후, LVV를 함유하는 세포 배양 배지를 수확하고, 나중에 사용하기 위해 동결시켰다.

[1860] p24 ELISA를 통한 LVV 역가

[1861] 본 실시예에서, LVV 역가는 Ella 자동화 면역분석 시스템상에서 p24 ELISA를 통해 평가하였다. 당업자는 LVV 역가를 평가하기 위한 당업계에 알려진 다른 기술이 본원에 기재된 기술과 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 간략히 설명하면, LVV 샘플을 해동하고 각각의 분취액을 96-웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 다음으로, 동일한 부피의 용해 완충액(RIPA 완충액에 희석된 단백질분해효소 억제제)을 각 웰에 첨가하고 혼합물을 4℃에서 30분 동안 진탕기에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 혼합물을 희석하고 p24 Ella 카트리지에 첨가하고 Ella 자동 면역분석 시스템에서 실행하였다.

[1862] 절두된 CD47 LVV를 이용한 CD47KO HEK293T의 감염

[1863] CD47을 더 이상 발현하지 않도록 변형된 HEK293T 세포(CD47KO HEK293T)를 조직 배양 플레이트에 플레이팅하고 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이션하였다. 다음으로, LVV 샘플을 해동시키고, 온건하게 피펫팅하여 혼합하고, CD47KO HEK293T 세포 및 회전접종[spinoculate] 플레이트를 함유하는 웰에 실온에서 30분 동안 1000xg로 적용하였다. 다음으로, 모든 수용 세포 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2의 세포 배양 인큐베이터 내에 넣어 3일 동안 성장시켰다.

[1864] 항-CD47를 이용한 CD47KO HEK293T의 염색

[1865] 절두된 CD47 LVV로 처리된 CD47KO HEK293T 세포를 수확하고, 세포 염색 완충제(BioLegend 카탈로그 번호 420201)에 재현탁하였다. 이어서, 세포를 원심분리하고, 세포 생존도 염료(eBiosciences 카탈로그 번호 65-0865-14)가 있는 세포 염색 완충액에 재현탁하고, 얼음상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 세포 염색 완충액에 재현탁하였다. 그 다음, 세포를 원심분리하고, PE 항-인간 CD47 항체 클론 CC2C6(BioLegend 카탈로그 번호 323108) 또는 FITC 항-인간 CD47 항체 클론 CC2C6 (BioLegend 카탈로그 번호 323106) 중 하나가 있는 세포 염색 완충액에 재현탁하여, 얼음상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 세포 염색 완충액에 재현탁하였다. 마지막으로, CD47 발현을 유세포 분석을 통해 평가하였다.

[1866] SIRPα-FC를 이용한 CD47KO HEK293T의 염색

[1867] 절두된 CD47 LVV로 처리된 CD47KO HEK293T 세포를 수확하고, 세포 염색 완충액(BioLegend 카탈로그 번호 420201)에 재현탁하였다. 이어서, 세포를 원심분리하고, 세포 생존도 염료(eBiosciences 카탈로그 번호 65-0865-14)가 있는 세포 염색 완충액에 재현탁하고, 얼음상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 세포 염색 완충액에 재현탁하였다. 그 다음, 세포를 원심분리하고, PE SIRPα-Fc-PE(AcroBiosystems 카탈로그 번호 SIA-HP252)가 있는 세포 염색 완충액에 재현탁하여, 얼음상에서 30분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 세포 염색 완충액에 재현탁하였다. 마지막으로, CD47 발현을 유세포 분석을 통해 평가하였다.

[1868] **결과**

[1869] **도 6**은 예시적인 CD47 절두된 변이체를 포함하는 LVV의 바이러스 역가를 Ella 자동화 면역분석 시스템을 통해 평가한 것으로서 보여준다.

[1870] **도 7** 내지 **도 14** 및 **도 18a**는 (항-CD47 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터는 많은 절두된 CD47 변이체(예를 들어,

CAG-CD47 ECD-CD59 GPI 및 CAG-CD47 ECD-DAF/CD55 GPI)가 과발현된 WT CD47과 유사한 수준으로 발현된다는 것을 입증한다.

[1871] **도 15** 내지 **도 17** 및 **도 18b**는 (SIRPα-FC 유세포 분석법에 의해 평가된 바와 같이) 절두된 CD47 LVV로 처리한 후 CD47을 발현하는 CD47KO HEK293T 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터는 많은 절두된 CD47 변이체(예를 들어, CAG-CD47 ECD-CD59 GPI 및 CAG-CD47 ECD-DAF/CD55 GPI)가 과발현된 WT CD47과 유사한 수준으로 발현된다는 것을 입증한다.

[1872] **실시예 3. 절두된 CD47 변이체의 발현 수준 결정**

[1873] 하기 실험을 수행하여, 각각의 절두된 CD47 변이체에 대한 LVV(상기 표 5에 기재됨)을 생성하고, 항-CD47 항체 염색 및 SIRPα-Fc 염색에 의한 측정으로서, 상이한 세포 유형에서의 외인성 야생형 CD47 발현과 비교하여 CD47 변이체의 상대적인 외인성 발현 수준을 결정한다.

[1874] 이들 실험은 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 및/또는 혈액 세포를 비롯한 (그러나 이에 제한되지 않는) 본원에 개시된 임의의 세포 유형을 포함할 수 있다.

[1875] 예시적인 방법은 표 5(상기 참조)에 기재된 CD47 변이체 중 하나를 암호화하는 렌티바이러스 전달 벡터, 렌티바이러스 외피 플라스미드, 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드로 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 실시예 2에 기재된 것을 포함한다.

[1876] 예시적인 결과는 절두된 CD47 변이체의 0.25배, 0.5배, 0.75배, 1배, 1.25배, 1.5배, 1.75배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 용량(예를 들어, 렌티바이러스 역가)로 세포를 전달(예를 들어, 형질감염)한 후, 세포에서 야생형 CD47로 달성된 외인성 발현 수준 이상으로 외인성 발현 수준을 달성하는 것을 포함한다.

[1877] **실시예 4. 저면역성을 달성하기 위한 절두된 CD47 변이체의 발현 수준 결정**

[1878] 저면역성을 달성하는 데 필요한 절두된 CD47 변이체(상기 표 5에 기재됨) 발현의 수준을 결정하기 위해 하기 실험을 수행한다.

[1879] 이들 실험은 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 및/또는 혈액 세포를 비롯한 (그러나 이에 제한되지 않는) 본원에 개시된 임의의 세포 유형을 포함할 수 있다.

[1880] NK 세포 사멸 분석 및 대식세포 사멸 분석은 XCELLIGENCE SP 플랫폼 및 MP 플랫폼(ACEA BioSciences, 캘리포니아 샌디에고 소재)에서 수행한다. 96-웰 E-플레이트(ACEA BioSciences)를 콜라겐(Sigma-Aldrich)으로 코팅하고, 외인성 야생형 CD47 또는 절두된 CD47을 발현하는 MHC-I 녹아웃, MHC-II 녹아웃, 또는 MHC-I 및 MHC-II 녹아웃 세포 4×10^5개를 100 μL의 세포 특이적 배지에 플레이팅한다. 세포 지수값이 0.7에 도달된 후에, 인간 NK 세포 또는 인간 대식세포를 1 ng/ml 인간 IL-2 또는 인간 IL-15(둘 모두 PeproTech) 유무와 상관없이 0.5:1, 0.8:1 또는 1:1의 효과기 세포 대 표적 세포(E:T) 비로 첨가한다. 음성 대조군으로서, 세포를 2% TRITON™ X-100으로 처리한다. 데이터는 RTCA 소프트웨어(ACEA)로 표준화하고 분석한다. NK 세포 및 대식세포 둘 모두를 사용하여, 외인성으로 발현된 CD47이 없는 MHC-I 녹아웃, MHC-II 녹아웃, 또는 MHC-I 및 MHC-II 녹아웃 세포가 신속하게 사멸된다. 성공하면, 절두된 CD47의 외인성 발현은 사멸 효과를 역전시킨다. 예시적인 결과는 야생형의 외인성 발현으로 달성되는 수준의 0.5배, 0.75배, 1배, 1.25배, 1.5배, 1.75배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배로 저면역 수준을 달성하는 것을 포함한다.

[1881] NK 세포 및 대식세포에 의한 세포의 생체내 사멸은 입양 전달에 의해 측정한다. 5×10^6개의 야생형 세포를 5×10^6개의 절두된 CD47 발현 세포와 혼합하고, 혼합물을 5 μM CFSE(ThermoFisher)로 염색한다. 인간 IL-2 (1

ng/mL, Peprotech) 및 2.5 × 10^6개의 인간 일차 NK 세포(StemCell Technologies) 또는 2.5 × 10^6개의 인간 대식세포(PBMC에서 분화됨)이 있는 염수 중의 세포를 면역결핍 NSG-SGM3 마우스(013062, 잭슨 연구소[Jackson Laboratory])에 복강내 주사한다. 인간 일차 NK 세포는 주사 전에 시험관내에서 인간 IL-2로 12시간 동안 전처리한다. 48시간 후, 복부에서 세포를 수집하고, 4℃에서 45분 동안 APC-접합된 항-HLA-A,B,C 항체(클론 G46_2.6,BD Biosciences)로 염색하였다. CFSE-양성 및 HLA-A,B,C-음성 집단을 유세포분석법(FACS Calibur, BD Bioscience)로 분석하고, 야생형 세포와 외인성 절두된 CD47을 발현하는 세포 사이에서 비교한다. 성공하면, 절두된 CD47 세포에 대해 CSFE+/HLA- 집단의 감소가 나타나지 않는다.

[1882] 대식세포 식세포 작용은 또한 BLI에 의해 측정된다. 외인성 절두된 CD47 세포 또는 야생형 세포를 발현하는 발광효소-발현 세포를 계수하고, 24-웰 당 1 × 10^5개의 세포 농도로 플레이팅한다. 16시간 후, 인간 대식세포를 1:1의 E:T 비로 첨가한다. 120분 후, D-루시페린(Promega, 위스콘신 매디슨 소재)을 첨가하여 발광효소 발현을 확인한다. 대조군으로서, 표적 세포를 미처리하거나 2% TRITON X100으로 처리한다. 신호는 Ami HT(Spectral Instruments Imaging, 애리조나 투손 소재)를 사용하여 스테리디안(steridian) 당 제곱센티미터 당 초 당 최대 광자(p/s/cm^2/sr) 단위로 정량된다. 성공하면, 식세포 작용 수준은 야생형 세포 및 외인성 절두된 CD47을 발현하는 세포와 유사할 것이다.

[1883] NK 세포-특이적 Elispot 분석을 위해, 인간 일차 NK 세포를 야생형 세포 및 외인성 절두된 CD47을 발현하는 세포와 공동 배양하고, 이들의 IFN-γ 방출을 측정한다. 양성 대조군으로 K562 세포(Sigma-Aldrich)를 사용한다. 미토마이신-처리된(30분 동안 50 μg/ml) 자극제 세포를 NK 세포(1 ng/mL 인간 IL-2로 자극됨)과 1:1의 E:T 비로 24시간 동안 인큐베이션하고, IFN-γ 스폿 빈도를 Elispot 플레이트 판독기를 사용하여 계산한다. 성공하면, NK 세포 활성화 수준은 야생형 세포 및 외인성 절두된 CD47 발현 세포와 유사하다.

[1884] 이식 연구는 시험 세포에 대해 동종이계인 인간화 CD34+ 조혈 줄기 세포-생착된 NSG-SGM3 마우스에서 수행한다(문헌[Wunderlich et al., 2010, Leukemia 24:1785-88]). 이러한 인간화된 마우스 모델에서 동계[syngeneic] 이식 대조군은 이용 가능하지 않기 때문에, 배경 측정은 미감작 마우스에서 수집한다. 성공하면, 5일 후, 야생형 세포의 수용체는 높은 비장세포 IFN-γ 스팟 빈도 및 상승된 IgM 수준을 나타내는 반면, 외인성 절두된 CD47을 발현하는 세포의 수용체는 검출 가능한 세포성 IFN-γ 반응 또는 항체 반응을 나타내지 않거나, 유의하게 더 적은 세포성 IFN-γ 반응 또는 항체 반응을 나타낸다.

[1885] **예시적인 서열**

[1886] [표 30] CD47 단백질에 대한 예시적인 아미노산 서열

설명	서열 번호	아미노산 서열
CD47-201	서열 번호 1	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPM HGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN
CD47-202	서열 번호 2	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPM HGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFKESKGMMNDE
CD47-202 (신호 펩티드 없음)	서열 번호 3	QLLFNKTKSV EFTFCNDTVV IPCFVTNMEA QNTTEVYVKW KFKGRDIYTF DGALNKSTVP TDFSSAKIEV SQLLKGDASL KMDKSDAVSH TGNYTCEVTE LTREGETIIE LKYRVVSWFS PNENILIVIF PIFAILLFWG QFGIKTLKYR SGGMDEKTIA LLVAGLVITV IVIVGAILFV PGEYSLKNAT GLGLIVTSTG ILILLHYYVF STAIGLTSFV IAILVIQVIA YILAVVGLSL CIAACIPMHG PLLISGLSIL ALAQLLGLVY MKFVASNQKT IQPPRKAVEE PLNAFKESKG MMNDE
CD47-203	서열 번호 4	XWTESLYCGV YTNAWPSSDF RFEYLSSSTI TWTSLYEICG VQRDTYSQLK GKKRQASNQK TIQPPRKAVE EPLNAFKESK GMMNDE
CD47-205	서열 번호 5	XKNATGLGLI VTSTGILILL HYYVFSTAIG LTSFVIAILV IQVIAYILAV VGLSLCIAAC IPMHGPLLIS GLSILALAQL LGLVYMKFVA SNQKTIQPPR KAVEEPLNE
CD47-206	서열 번호 6	MEAQNTTEVY VKWKFKGRDI YTFDGALNKS TVPTDFSSAK IEVSQLLKGD ASLKMDKSDA VSHTGNYTCE VTELTREGET IIELKYRVVS WFSPNENILI VIFPIFAILL FWGQFGIKTL KYRSGGMDEK TIALLVAGLV ITVIVIVGAI LFVPGEYSLK NATGLGLIVT STGILILLHY YVF
CD47t-1	서열 번호 7	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT REGETIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTL
CD47t-2	서열 번호 8	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT

[1887]

		REGETIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVITVIV IVGAILFVPG
CD47t-3	서열 번호 9	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT REGETIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVFST A
CD47t-4	서열 번호 10	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT REGETIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVFST AIGLTSFVIA ILVIQVIAYI LAVVGLSLC
CD47t-5	서열 번호 11	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT REGETIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVFST AIGLTSFVIA ILVIQVIAYI LAVVGLSLCI AACIPMHGPL LISGLSILAL AQLLGLVYMK FV
CD47t-6	서열 번호 12	MWPLVAALLL GSACCGSAQL LFNKTKSVEF TFCNDTVVIP CFVTNMEAQN TTEVYVKWKF KGRDIYTFDG ALNKSTVPTD FSSAKIEVSQ LLKGDASLKM DKSDAVSHTG NYTCEVTELT REGETIIELK YRVVSWFSPN ENILIVIFPI FAILLFWGQF GIKTLKYRSG GMDEKTIALL VAGLVITVIV IVGAILFVPG EYSLKNATGL GLIVTSTGIL ILLHYYVF
CD47-206 (N-말단 없음)	서열 번호 80	MEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIE VSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELK YRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEK TIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILI LLHYYVF
CD47-206 (복구된 N-말단 있음)	서열 번호 81	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVF
결실된 TMD3	서열 번호 82	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNA

[1888]

결실된 EC + TMD3	서열 번호 83	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILF
결실된 TMD2 + EC + TMD3	서열 번호 84	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KT
결실된 최종 IC	서열 번호 85	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPM HGPLLISGLSILALAQLLGLVYM
결실된 TMD5 + 최종 IC	서열 번호 86	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPM HG
결실된 EC + TMD5 + 최종 IC	서열 번호 87	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGL
결실된 TMD4	서열 번호 88	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLT
CD47 ECD (DAF/CD55 GPI 닻 있음)	서열 번호 89	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEPNKGSGTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLV TMGLLT
CD47 ECD (긴 TRAILR3-GPI 닻 있음)	서열 번호 90	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEATVETPAAEETMNTSPGTPAPAAEETMNTSP

[1889]

		GTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMITS PGTPASSHYLSCTIVGIIVLIVLLIVFV
CD47 ECD (짧은 TRAILR3-GPI 닻 있음)	서열 번호 91	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEMITSPGTPASSHYLSCTIVGIIVLIVLLIVFV
CD47 ECD (CD8a TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 92	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRR
CD47 ECD (CD28 TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 93	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLLH
CD47 ECD (PDGFR TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 94	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPRY
CD47 IgV, (힌지 영역에서 3aa, PDGFR 힌지, TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 95	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLW QKKPRY
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, IgG4 힌지–CD28 TM	서열 번호 96	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KESKYGPPCPPCPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLLH
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, IgG4 힌지–CD8a TM	서열 번호 97	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KESKYGPPCPPCPIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRR
CD47 IgV,	서열 번호 98	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK

[1890]

힌지 영역에서 3aa, CD28 힌지–CD28 TM		IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD28 힌지–CD8a TM	서열번호 99	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRR
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD8a 힌지–CD28 TM	서열번호 100	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD8a 힌지–CD8a TM	서열번호 101	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRR
WT, C15G	서열번호 102	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFGNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPM HGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFKESKGMMNDE
N361, C15G	서열번호 103	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGWANKSTVPTD FSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREG ETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRS GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI VTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCI AACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRK AVEEPLNAFKESKGMMNDE
N362, C15G	서열번호 104	MWPLVAALLLGSACCGSAWAPPLRFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGYTNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA

[1891]

		ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N363, C15G	서열 번호 105	MWPLVAALLLGSACCGSAWQLPLLFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGDKNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N364, C15G	서열 번호 106	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLAFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAMNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N366, C15G	서열 번호 107	MWPLVAALLLGSACCGSAWQTPLKFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N368, C15G	서열 번호 108	MWPLVAALLLGSACCGSAWQFPLRFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAENKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N369, C15G	서열 번호 109	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLNFNKTKSVEFTFGNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAWNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N3610, C15G	서열 번호 110	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLLFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGASNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG

[1892]

		GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N3612, C15G	서열 번호 111	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPPLLFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQANKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N3614, C15G	서열 번호 112	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLKFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N3617, C15G	서열 번호 113	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N3618, C15G	서열 번호 114	MWPLVAALLLGSACCGSAWQLPLLFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAINKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
N3621, C15G	서열 번호 115	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLEFNKTKSVEFTFGNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
N3623, C15G	서열 번호 116	MWPLVAALLLGSACCGSAWQMPLVFNKTKSVEFTFGNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGVTNKSTVPTDF

[1893]

		SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
N3624, C15G	서열 번호 117	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLRFNKTKSVEFTFGNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQVNKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N361 돌연변이체	서열 번호 118	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGWANKSTVPTD FSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREG ETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRS GGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLI VTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCI AACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRK AVEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N362 돌연변이체	서열 번호 119	MWPLVAALLLGSACCGSAWAPPLRFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGYTNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N363 돌연변이체	서열 번호 120	MWPLVAALLLGSACCGSAWQLPLLFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGDKNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N364 돌연변이체	서열 번호 121	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLAFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAMNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE

[1894]

hCD47 N366 돌연변이체	서열 번호 122	MWPLVAALLLGSACCGSAWQTPLKFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N368 돌연변이체	서열 번호 123	MWPLVAALLLGSACCGSAWQFPLRFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAENKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N369 돌연변이체	서열 번호 124	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLNFNKTKSVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAWNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3610 돌연변이체	서열 번호 125	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLLFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGASNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3612 돌연변이체	서열 번호 126	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPPLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQANKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3614 돌연변이체	서열 번호 127	MWPLVAALLLGSACCGSAWQPLLKFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGAANKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA

[1895]

		ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3617 돌연변이체	서열 번호 128	MWPLVAALLLGSACCGSAWQRPLRFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3618 돌연변이체	서열 번호 129	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLEFNKTKSVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3621 돌연변이체	서열 번호 130	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLEFNKTKSVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3623 돌연변이체	서열 번호 131	MWPLVAALLLGSACCGSAWQMPLVFNKTKSVEFTFCNDTVVI PCFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGVTNKSTVPTDF SSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGE TIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSG GMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIV TSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIA ACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA VEEPLNAFKESKGMMNDE
hCD47 N3624 돌연변이체	서열 번호 132	MWPLVAALLLGSACCGSAWQIPLRFNKTKSVEFTFCNDTVVIP CFVTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGQVNKSTVPTDFS SAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGET IIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGG MDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTS TGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAAC IPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVE EPLNAFKESKGMMNDE
CAG-CD47 (202) – CodOpt	서열 번호 199	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDE

[1896]

		KTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGIL ILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPM HGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPL NAFKESKGMMNDE
CD47 ECD-CD59 GPI	서열 번호 340	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFV TNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAK IEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIEL KYRVVSWFSPNEQLENGGTSLSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP*

[1897]

[1898] [표 31] CD47 단백질에 대한 예시적인 뉴클레오티드 서열

설명	서열 번호	뉴클레오티드 서열
CD47-201 CDS	서열 번호 13	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATC TTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTT GTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAATAA CTGA
CD47-202 CDS	서열 번호 14	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT

[1899]

		TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATC TTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTT GTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGC TGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA
CD47-203 CDS	서열 번호 15	TGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATG GCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCAC AATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTTGTGGGGTTCAGA GGGACACCTACAGTCAGTTGAAAGGCAAGAAGAGACAAGC TTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGCTGTAG AGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAATGATG AATGATGAATAA
CD47-204 CDS	서열 번호 16	AGATATTTTCTTGTTCAATTTAAGGAGAGGTAAATTTGGTAT CAATAGAAAAAATGTTTCTGAAAAATTTAAACCCTGGAAAT GTATTTATGGCATGGAGTCAGATGTTTCAGGGAGAGAAGAA CAAATCAAGAAGCATTGCAAGTATGCTCATATGGAATGCTT AAGGCTTGTGGTTAAAAAATATATATATATGGCTGTCAATG TCTTAGGCTCATGGTAGCAGCAGAAATCGTAATAATTCTTTT GTCACATGGGTTATATCCATATTGGAGAGAATTAACTCAGG TGAAATTAACTTGTACACTGTTTGGTTTTATAATATTTAGAG GGATCACAACTGACTGATGTCCCTTTGAAGTACCATTCTTCA TAAATCTTTTTTTTTCAGAATGGGCCAGCCAACTGTGACATC CCTTGGATCGGAGATTTAGAACTAGAAAGTATTCTTTCTAC ATTATTAGGGAAGAAAAGGAGTTACTTGGCGGTTAGCAATA TTCTATTTTGTTTTGTTTTGTTTTTAGAGACAGGGTCTCATTA TGTTGACCAGGCTGGCCTCGAGCTCCTGGGCTCAAGCAATG CTCCCACCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCATG TGCCACTACACCTGGCAGTGTTTATTCTGATAAATACATTTA TGAGCTCAAAAATGTAACTCTAAAACCTTATCTCTGAACTTC CATATTACCATCAGAAATTTAGATAGTTGTTTAGTTCTCTTT TTCTTTGTAGAACATAGATATAAGGCATGGTTTCATTGAAGT CAGTTGTATATACATGTAACTATCCTGATGTTCCCAAATAAA GCTCTGTATTTCTGCTTAGTTTATTGGGGAGGCTGCTAAATG TAGTGCATCCCAACCCATTTTACCCTGTTCTACTTTAAAAAG AGGTTGGCTTCTTGTTTGGATACAAGGACCAAGTCACTCCC CCAGGTTCCTCCACAGTAAGGGAGGCCTATTTAAAGCCGCC CATGGCACTAACAGAAACTGGACTCCTATGAGCTCAGATAC

[1900]

		ATAACTGGGCCTCACAGGGGTGGGACAGTATGTAGTCTAGG AATTGGAAGGATCCATTCCATATCAAAGAACTGAAGCATCG TGTTGCCCTCTCAGCAGCAAGAGTAAGGTGATGCCCCTGTC AGTTATAGTTCCTGAGTTCCTCTGTCTTTGATTCTTTGCCTAT TAGCCAGCTAGCTCACCCTCTTGTTTATGCCACTGTTTTTTA TCCTATTCATGCCTTCTCACAGACAACTTTTCTTACCTACAG CTTTGGACTCATCCTTGTCTCCTTTCTGTTTCTTTTTCACTTT CCCTTCCCATCACCAACTTTCTGGGTTTTTTTCTGTTTCTTCT TAGAGTCCAGTGGCAGGGAGAAACTTGTCAGTCCAGTCTGT TGCCATTTTTCCTGTTTGAGAAAGACTCACCAGCTTTTGGCT GGCTCACAGATTGGCTTTCCTTGGGTCAGGACCCACCCTTTT CCCTGCCAGCTTTGGAAGCTTGACAGAATTCGAGTGTGCAG TGGTGGTAAATAAATAGTAAGGAACACAGAGCAGTCCTGG AGGCGTGCCTCCATCTGCTGATGAGAAAATCCAGTGCTGTC ATCCAGCCCAGGTCCCAGCGGAATGGGCCTCTCTGTTCAGT AGGATCCCCCTCCTGCTGAGTGGTTCATGGCATGTTTCTGTT CAACGCTTTTCCATCTGTAGGATTCTTATTCTGTATTTATTTG TTTTTTTGGGTTTTTTTATTTTTTGAGATGGAGTCTCGCTCTG TCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGACCCCAGCTCGCTG CAGCCTCTGCCTCCCAGGACGAGGGAGATCCTCCCACCTCA GCCTTCCACGTAGCTGGGACTACAGGCATGCACCACAGGCA TGCACCACCACGCCAGCTAATTTTTGTATTTTTGGTAGAGAC AGGGTTGCATCATGTTGCCCAGGCTGGTCTTGAATGCCTGA GCTCAAGCAATCTATTTGCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGG ATTACAGGCATGAGCCACCACGGCCAGCCTTCTCATTTGTTT TTTTTATAAGGAAGCTATCTCTTCTTCCCTCCCCAACTAGGG TATTCTTTTTCCCTTTCGTCACTTTGCTCATGTACTGTATTCC TTCAACTTCATTAATGAATCCATTTGGAAGCAGTGAAAAAG GCAACTCAGAAAGCTAAGAAGAAATAGATAGAGGAATACT CAGAGCTATCTGAGTATTTTCTTTAGTTTGTTAGCTCTTTGG AGCTTTGAAACTGGAAAGACCCAGGGAGTGATGTGGAGAA AGAGACTGAGCTTGTAAGACACAGGAGCAGTGAGCTAAGG GAGATGGAGTAGTGGGGACAAATTCTGGCACATTCTGTCTA CACTCTGGGTAGATAGAGGAGGGAGGATGGAGCACCCATG GTGGGGGTATGTTGGTGACAGCATTTTCCCACCAGCCAGTG TAACAAGTGGCTGATTTGGGGGAAAGATGGCATAAACAAA TGAGAGAATGTGTTTACTATTTGATGTAGATGGGTTATTTGC TTCATTTTTCAAATCAGTGTATATAATCAAGAATATTCAGCA TGTTTGAATAGACTGTCAGAGCTGGAACTCTTTCATTAACAT CTCTGGCACCTTTAGTTTTAGCCCTGAACATTTTATCTTAAA ATTAAACATTACCAAATGCCTTAGTTTATTTCATTTATTAAA TTTATATTCTTATTTGTTATTTATATCAGCTTCCAATCAGAA GACTATACAACCTCCTAGGAATAACTGAAGTGAAGTGATGG ACTCCGATTTGGAGAGTAGTAAGACGTGAAAGGAATACACT TGTGTTTAAGCACCATGGCCTTGATGATTCACTGTTGGGGA GAAGAAACAAGAAAAGTAACTGGTTGTCACCTATGAGACC

[1901]

		CTTACGTGATTGTTAGTTAAGTTTTTATTCAAAGCAGCTGTA ATTTAGTTAATAAAATAATTATGATCTATGTTGTTTGCCCAA TTGAGATCCAGTTTTTTGTTGTTATTTTTAATCAATTAGGGG CAATAGTAGAATGGACAATTTCCAAGAATGATGCCTTTCAG GTCCTAGGGCCTCTGGCCTCTAGGTAACCAGTTTAAATTGGT TCAGGGTGATAACTACTTAGCACTGCCCTGGTGATTACCCA GAGATATCTATGAAAACCAGTGGCTTCCATCAAACCTTTGC CAACTCAGGTTCACAGCAGCTTTGGGCAGTTATGGCAGTAT GGCATTAGCTGAGAGGTGTCTGCCACTTCTGGGTCAATGGA ATAATAAATTAAGTACAGGCAGGAATTTGGTTGGGAGCATC TTGTATGATCTCCGTATGATGTGATATTGATGGAGATAGTG GTCCTCATTCTTGGGGGTTGCCATTCCCACATTCCCCCTTCA ACAAACAGTGTAACAGGTCCTTCCCAGATTTAGGGTACTTT TATTGATGGATATGTTTTCCTTTTATTCACATAACCCCTTGA AACCCTGTCTTGTCCTCCTGTTACTTGCTTCTGCTGTACAAG ATGTAGCACCTTTTCTCCTCTTTGAACATGGTCTAGTGACAC GGTAGCACCAGTTGCAGGAAGGAGCCAGACTTGTTCTCAGA GCACTGTGTTCACACTTTTCAGCAAAAATAGCTATGGTTGTA ACATATGTATTCCCTTCCTCTGATTTGAAGGCAAAAATCTAC AGTGTTTCTTCACTTCTTTTCTGATCTGGGGCATGAAAAAAG CAAGATTGAAATTTGAACTATGAGTCTCCTGCATGGCAACA AAATGTGTGTCACCATCAGGCCAACAGGCCAGCCCTTGAAT GGGGATTTATTACTGTTGTATCTATGTTGCATGATAAACATT CATCACCTTCCTCCTGTAGTCCTGCCTCGTACTCCCCTTCCC CTATGATTGAAAAGTAAACAAAACCCACATTTCCTATCCTG GTTAGAAGAAAATTAATGTTCTGACAGTTGTGATCGCCTGG AGTACTTTTAGACTTTTAGCATTCGTTTTTTACCTGTTTGTGG ATGTGTGTTTGTATGTGCATACGTATGAGATAGGCACATGC ATCTTCTGTATGGACAAAGGTGGGGTACCTACAGGAGAGCA AAGGTTAATTTTGTGCTTTTAGTAAAAACATTTAAATACAA AGTTCTTTATTGGGTGGAATTATATTTGATGCAAATATTTGA TCACTTAAAACTTTTAAAACTTCTAGGTAATTTGCCACGCTT TTTGACTGCTCACCAATACCCTGTAAAAATACGTAATTCTTC CTGTTTGTGTAATAAGATATTCATATTTGTAGTTGCATTAAT AATAGTTATTTCTTAGTCCATCAGATGTTCCCGTGTGCCTCT TTTATGCCAAATTGATTGTCATATTTCATGTTGGGACCAAGT AGTTTGCCCATGGCAAACCTAAATTTATGACCTGCTGAGGC CTCTCAGAAAACTGAGCATACTAGCAAGACAGCTCTTCTTG AAAAAAAAAATATGTATACACAAATATATACGTATATCTAT ATATACGTATGTATATACACACATGTATATTCTTCCTTGATT GTGTAGCTGTCCAAAATAATAACATATATAGAGGGAGCTGT ATTCCTTTATACAAATCTGATGGCTCCTGCAGCACTTTTTCC TTCTGAAAATATTTACATTTTGCTAACCTAGTTTGTTACTTT AAAAATCAGTTTTGATGAAAGGAGGGAAAAGCAGATGGAC TTGAAAAAGATCCAAGCTCCTATTAGAAAAGGTATGAAAAT CTTTATAGTAAAATTTTTTATAAACTAAAGTTGTACCTTTTA

[1902]

		ATATGTAGTAAACTCTCATTTATTTGGGGTTCGCTCTTGGAT CTCATCCATCCATTGTGTTCTCTTTAATGCTGCCTGCCTTTTG AGGCATTCACTGCCCTAGACAATGCCACCAGAGATAGTGGG GGAAATGCCAGATGAAACCAACTCTTGCTCTCACTAGTTGT CAGCTTCTCTGGATAAGTGACCACAGAAGCAGGAGTCCTCC TGCTTGGGCATCATTGGGCCAGTTCCTTCTCTTTAAATCAGA TTTGTAATGGCTCCCAAATTCCATCACATCACATTTAAATTG CAGACAGTGTTTTGCACATCATGTATCTGTTTTGTCCCATAA TATGCTTTTTACTCCCTGATCCCAGTTTCTGCTGTTGACTCTT CCATTCAGTTTTATTTATTGTGTGTTCTCACAGTGACACCAT TTGTCCTTTTCTGCAACAACCTTTCCAGCTACTTTTGCCAAA TTCTATTTGTCTTCTCCTTCAAAACATTCTCCTTTGCAGTTCC TCTTCATCTGTGTAGCTGCTCTTTTGTCTCTTAACTTACCATT CCTATAGTACTTTATGCATCTCTGCTTAGTTCTATTAGTTTTT TGGCCTTGCTCTTCTCCTTGATTTTAAAATTCCTTCTATAGCT AGAGCTTTTCTTTCTTTCATTCTCTCTTCCTGCAGTGTTTTGC ATACATCAGAAGCTAGGTACATAAGTTAAATGATTGAGAGT TGGCTGTATTTAGATTTATCACTTTTTAATAGGGTGAGCTTG AGAGTTTTCTTTCTTTCTGTTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACTAATTTCACATGCTCTAAAAA CCTTCAAAGGTGATTATTTTTCTCCTGGAAACTCCAGGTCCA TTCTGTTTAAATCCCTAAGAATGTCAGAATTAAAATAACAG GGCTATCCCGTAATTGGAAATATTTCTTTTTTCAGGATGCTA TAGTCAATTTAGTAAGTGACCACCAAATTGTTATTTGCACTA ACAAAGCTCAAAACACGATAAGTTTACTCCTCCATCTCAGT AATAAAAATTAAGCTGTAATCAACCTTCTAGGTTTCTCTTGT CTTAAAATGGGTATTCAAAAATGGGGATCTGTGGTGTATGT ATGGAAACACATACTCCTTAATTTACCTGTTGTTGGAAACTG GAGAAATGATTGTCGGGCAACCGTTTATTTTTTATTGTATTT TATTTGGTTGAGGGATTTTTTTATAAACAGTTTTACTTGTGT CATATTTTAAAATTACTAACTGCCATCACCTGCTGGGGTCCT TTGTTAGGTCATTTTCAGTGACTAATAGGGATAATCCAGGT AACTTTGAAGAGATGAGCAGTGAGTGACCAGGCAGTTTTTC TGCCTTTAGCTTTGACAGTTCTTAATTAAGATCATTGAAGAC CAGCTTTCTCATAAATTTCTCTTTTTGAAAAAAAGAAAGCAT TTGTACTAAGCTCCTCTGTAAGACAACATCTTAAATCTTAAA AGTGTTGTTATCATGACTGGTGAGAGAAGAAAACATTTTGT TTTTATTAAATGGAGCATTATTTACAAAAAGCCATTGTTGAG AATTAGATCCCACATCGTATAAATATCTATTAACCATTCTAA ATAAAGAGAACTCCAGTGTTGCTATGTGCAAGATCCTCTCT TGGAGCTTTTTTGCATAGCAATTAAAGGTGTGCTATTTGTCA GTAGCCATTTTTTTTGCAGTGATTTGAAGACCAAAGTTGTTTT ACAGCTGTGTTACCGTTAAAGGTTTTTTTTTTTATATGTATT AAATCAATTTATCACTGTTTAAAGCTTTGAATATCTGCAATC TTTGCCAAGGTACTTTTTTATTTAAAAAAAAACATAACTTTG

[1903]

		TAAATATTACCCTGTAATATTATATATACTTAATAAAACATT TTAAGCTAT
CD47-205 CDS	서열 번호 17	AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGAATAA
CD47-206 CDS	서열 번호 18	ATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGA AATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTA AACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAAT TGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCA TCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATG AAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCT GTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGAT CCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCT GGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTT TTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCTACTGGCCTT GGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTT

[1904]

[1905]

인간 CD47 유전자	서열 번호 19	CTCATTCTATTTATTCTTTTAACAACGATTTGTTGAGTACAT ACTATGTGTCAGGCAAAGGGGCTAGCAGTAAAGAAGACTC ATATGGTCCCTCCCCTCATTGAGCTTACAGTATAGGAAACA GTTATTACTGAACACGAAGACAGCTATATAAACATAATTTC AATAAAAGATGGTAACTGATATGCACCAAAGTAAGACTAA AACACAGAGAAGTGCACTTAACTTATACTGGCATTATCATG GGCCTTGATTTACTGTGGGATCCTTTGCTGTTATGTTCCCTT ACGTTGAAAGATGCATCTGGCCCTACACAAAGCACAGACTA TGAGTAGGTAGGCACATACAGTTCTAAGCCAACCCCTTGGG GCACCAGGAGACAGCACTGTCTCATGTCGTTGCATGACACA CCACCATGGGGCAAAACATTTGCTGAATGAAGTTACAATAA GGATACAATTGTATCTACATAAACATTTAAAGATACTATCA TATCAATACCTACTATGTGGCAGGATCTTGATGTTGTGTGGG GAGGAAGATAAAAGTAGATGTATCGTTGAGACAGAAATGA GGGCAAGGGAAATTTTTTATGCATTGAGAGAGGAAGTTTGT GAATTTTTTCGCTGGCCATGGAGTCAGGGAGACTTCAGTCC AACCACCGTCCCTCCCTGAGCTTGTGACCAAGCCTCACTTTC CTTATCTATAAAGGTGACAAGAGTGATTTTTTTAAGTTTATT TATCTGTAAAGGGGAAACTGTAGCAACTTTGCTATTATAGG GTAAAAAGAAAAAAGGATGAAAACCAGAACAAGGGAGAG AGACAAGAGAGAGAGCAGTGTCACTTATAACTGTGGGCAA AGTGCTCACCATTCCTCTTTCCCTTTGTTTCCTCATCTCAAAA AGGGAGATCATAACATTTATCCTTTCTGAGGTTGTTATGAA GATTAACTTAGGTGATATAGCTAATGTGTACTTCCTGTGTTC AAAACATTCTAATATGTATTATCCCCTCCCTCTCTACCCAAG AAACTCCTTACATACAGATAAGATGAGCTCAACATCCAAAT TAAAATGCTTTGAAAAGTTAAAAGGCAAACCTTTAAAATGA TTAAATACTGAAAAGAGCTTAAGGTTATCTCAGAGAGAGGA TAATCAAACCTAGGCAGGCTGCTTTGGACTGTCTCTCCTGG GATATGCCTGCTTTTGCCCCACCACCAAAACATACCCCAGC TAGATTCCCAAGAGCAGCAGTGGTCACCCAGGTGGCCTCTC ATTCCATTTTCTGCACAAAAAGACGTTAAGCATATAGCTCA GTAGCTCCCAGTGTAAAACAGAACATCACCCGATCTCCACC TCTGAAGGTTGGGGACAGTCCTTTCTAGTCACTCTTCAGCTT TAGGGGGGTTGGTTGGTATCAGGGACAGCTGACAGCCTTAT TTAGCCAACCAGCTGCTCTGTGATACACAATGTCCCTAATG CTCAAAGTCTGGTGGATGATTCTTTTGTATCCACATAAGCAG CAGTTGGAGGAGAATCGATGAGTCCCTTTGGTTGCCTCGGG GTGTCAAGGCTGCCATTCAAATCATTACCACCATAATTATTA ACCATTGTTTTAGTGAGATGTCTGCCAGGCAATTGTTTTTAT TTTTCAATCATTAAAAAAGCAATCAAATTTCACTAGAGCAA TGCCTGCCTCACGCCGCATCAACACATTTATTAAACCCCTTC TGTTTGCCGAGCTCAATGGAAAGTCTTGGAGGAGGGAATAC TTAAAATGCTCTCGGATTTAAAAGAATTGATAATGCTGTGG GGAAGAGGTTCACACAAAAAAGCAATTACAGGAAGAAGCT CGATAGTATACAATACACTGGTACAGAGTGTCATAGACAGT

		GCCACTTTCATACGCTGGATTTTATTTCTGTGGCAATGGGAT GCTTGGGAGGAGCCGCACTGTGTAGAGGATTTGGAGAAGTG GGGTATTGTGGTGGGAAATTGCTTTCTTTCCCAGGAGGTAG GAGGAAAACAATCAAGGAGGTGGACAGGATGTGCACTCCA TTAGAGCAGCCACCAGAGCCTGACTTTTTGATAAGAGAGTA CATCAGTTAGGATAACGGTTAAAAGTATCTTTAAAAGACTT TTGCTTCAGGATGAATGATGTGGCCTGTGTGATTCAGCGAT AAATTCAAAAGCCTTGTCCCTATTGTGGCTTGCGGCCACATT TCGAACCCATTTTTCAAGCATGTTAAACCCAAGCGCAGCGC AGAGGGCTGCACATGGGGCAGTCACAAACCAAGCTCAATA ACCTTGCTGGTGGGGATGTGTTGGATACGCTGCTAATGCCT GTTTGCGACAATGCTCGCTAGTCCCGGTGGTGGCGGTGTTC ACAGGTAACAATGTTTACCACCGTGAATGGAACTTGTTTGA TTAACCCTGATCAGAGGATGAAAACACTAAAGAACCAAGT GAGAAAGAGGGAAGAGAACCGCATAGGGAAGAGCAGAGC GAGTAGACGAGCCGAACGCAGAGCCCGCGAGGGGCGAGTG GAAGCTCCCTGCGGGCAGGTACCCGACCACCGCCCTGCCCT GGGCGTGGCGGCCTCGGGCTCAGGGACCGCTTCGGCGCTAG ACGGCCGCGTCCGGAGGAAACGGGCGCTGGTGAAAGCCTA GGTGTCCTGGTCCACGCGCGCAGCCGGACGTCGGGTCCAGG GAGAGACGCGGGCTGGGGCGGGACGGGACCCGGCCCCTGA AGCGCGAGGGTGGGAGTGAAAGCAAAGAGGAGAAAAGTA GAGAGAGAGGACAGTGGGGCCCAGCGCCGCGCGAAAGGCA GGAACCGACCCGCGGACAGGAACGGGTGCAATGAGGTCCC CGGCGAGCGTGGGAACACAGGGTTCAGCCTCCTGCGGCGG GCGAGCACGCGGACCCCAGGGGCGGGCGGGTGCGACAGGA CGTGACCTGGAAGCGCGGCGCGTGCCACCGCCCTGGAGCAG GCATCCGGCCTCCGTGGAGCGGGCAGGCGGGCCCCGGGTCT GGAGCCTGCGACTGGGGAGGGCGCCGCGTCAACAGCAGCG GTTGCGGGGCGGGGCCGAGTGCGCGTGCGCGGCTCTCGCGG GCGGGGAGCAGGCGGGGGAGCGGGCGGGAAGCAGTGGGA GCGCGCGTGCGCGCGGCCGTGCAGCCTGGGCAGTGGGTCCT GCCTGTGACGCGCGGCGGCGGTCGGTCCTGCCTGTAACGGC GGCGGCGGCTGCTGCTCCGGACACCTGCGGCGGCGGCGGCG ACCCCGCGGCGGGCGCGGAGATGTGGCCCCTGGTAGCGGC GCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGTGAGTGGCTCCTCG CTCCCAGCCCTGCGGCTGCTGTCGCTTCGCCCCCGCGGGCGT GTGGGCTGCGCCCCAGCCAGCCCGGCGGCGCCCTGAAGAG GGTGGCCGGGGCGCAGAACACTCGGGCCCTGAGCGCCCGA AGTGCAGACGTGGGAGGGCCCCACGGGGAATCGGGCGCCC CCCTTCTTCCTCCCTTCCTTTCCCTGGTCGTCTTCTTCCCCCT GGGTGAGAGCGGGGCTCATCTCCTCCACCCGGTTCTCCATC TCCAAATGCACACACACAGGAAGACTCCAAACCGCGCACCT CGCGCAAAAATTAACTAGCAAGAAAGGGCGCGATCAGAGG CAAGGGGCTGCAGCTGCTAGGGATCCCCTTCTTTCGCACCC CTCTCCCTTCTCAGTGCTTAGACGCATTTGGGGTTGAGGGAG

[1906]

		GGAGAGTGGGAGGGCCCGGGCCTCTTGCGATGGAAGTGCG CATTTTGGCGAAGTCGGTGAGAAGGGGTTTCTGCCGTTTGC CTCCCACATGAACATAGGAGCGAAGAGGACGTAAAGGACA CAATTAAGTTTCATTTTCAACTCAGCATTCAATCAGAAGAAT CTTCCGGCCGTGTAATTTTTGCTGTCGTTTTTAATCCTAAAA ATAAGCTTGCTGGAAACTCTTCCTTTCTCGTGACCCTCACGC CCCATCAGCCACTTGCATACATTCTAAATTGTACGTTGAAGT TTTTCCCACTTTATTTGGGGGAACCGTTTTAAAAGTAATCTG GTTTTCGCCTGAAATAGGAAGACAGTAACCTCCAGTCAAAA CATGTGCAGCAGAATGGGATTTGGTGTTTTTCGACGCCAAA GAACCTCCACCCCCCCACCCCCACCCCGAGCTTTTGGAATC CATTTCGCTTTTGTAAAACGTGTGCTTCGTCTGTAAAAACTG AGCAAGGAATAGAAACATTCGTAGCTCTACAGTGAGTGCCT GTCACACTTCACATCCATAGAGCCTTTTGTGAACTTTTATAA GATTCAGAATTCAGCTTGAGCACCAGTGACAGCAATTGTTA CATTTATTCTAGAATGCTAAATTAATTCGATTTTAAACTGAT TATTAGCCTCGGTGTGCCGTTCCTAAAGGCTTGTGACTTTAG GTATTTCCAAGATGCCCTTAAGTCTCTGCTTACCACTTTCCT CCCTCCCCGAGCATCCTGGATGTTGGGACTGTGAATCCAGG TCTCCGTTATCTAAATGGTTGATGTTAGTGTTTCCTGTCATC ACGTTTAGTATGCTTGTTGCCTTTACTATCATTATAGCTAAA ATAATACTGCTTTCAGAGATGTGTTGTATAATCGCATAATA ATTTCAGAACGCCTTCATATTGAACCAGATATGAAGTGATA CAGTATCATTTATTCAAACTGCCTAAAAAGTAAAAAGTATA AACCATATACTATTTTTAAAACAGGTAGGTTAGATTTAAAT CACGTAGTTTAGAACTGTTGGAATGGTACTTTGAGTGATAG GATTTATGTTAGGCCTTCTTTAGTAATAGTTAATATCATGTA ATTAGCACTCGTTTACACACAATTTTAATGTGTTCGAATCCC TAGAGTCATCGAATTCAGAATTTATAGTATTTTATTTTACTT AGTTAATATTAACCTAAAAAAAAAAGCAAAATACAGGCATTA TGCAGTTGAGTTGTGTTAAGTGTGGACTGTAAAACAGGATA GTATTTGTTATAAAATATGTTTTTGTATGTGTTTAATATATA GCTTCAAAAGGACATGTATGAAGAAAGATGTCTCAGCACAT AGGTAGTTATAAACCAAGGGTTTGAGAGACTGACTTTAGAA TCTAGAATGAGTAAGAAAGTGATGGATCTGTACATTCATTT GTATTGAAGTTTGATTTTGCTTTCAGTTTCGTTAATTAAGCC CCGGGAATCAGGGACCTTTCCTGGCACCCTCTACAGTGTTA GTGGCCTTTGTGGTAAAAGAAGTTATCTCAGATACTCATTTC ATGCAATTACAGGCAAACTGGAAGGCACCTTAATGGTATGC AAGATGTGAAATGAATTACTATGTTGCATTCCACTCTGCCCC CACTCATGTACAATTATACTTTGTTTAAAAGTGCATAGTTTC AGTGGTATTTATTAGCTAGCAAATAAAACTTTAAATAAATA ATGATGGTGTTGTGAACTGTCTTTTCAGTGGTTGAATGATTC CTCTTTGTTCAAAATGAGTTGTTTTTTTTTTTAAATCAGGGT ACATATGATTAAATAAAATTTTTTTCCATCGTCTAAGTCTAG TAGTAATTTGGCTTGTTTAAATAAAAATGTTTTCTCTTAAAG

[1907]

		AATATATTATTTTTAATTACAAGTTGCCATTTTAAGGAAGTA AATGCCTATTTAAAAGTACGTATTTATGGGGCCGCCCCAGC AGTCTAGAGGCAGTGTTTTTTAAAGCATTACACTAAATGCC TACCATTAGGACACTTGCTCATGCTGTCATCTGTGTTTTGGC AGATGTTTTATCTTTGTCACTGAGTTGTTCATGGAGATTTGA AAGGCCAAGTTCTAAAGATGAGAGATAGATGACTTTCCCCC CAAATTGATACATATTCTAAATCCAAAATAATCACGCATAT TCGCAAAACTAGATTTGCATTTCATAGTATGAATTCAGCTAT AGCTAGTATATAGGCATTGCTTTTAATATAGTAATGTTCTTT TTGTGGCATAATTTTCAATCACTTTCCCTGTCTTAGGTTTCTG CCTACCTTTTTATACAAGATAAACATTTCTATTTTCATATCTT ATCTCTCAGTCTGATTTTAATAATATCGTCTTGGGTTATCAT AAAGTTACTTTCACTTTGTATACTAGTGTAGATATTTCTTCT GTGATAAAAAGAACAAGAATAATAGTGTAGGATCAGTTTTG TTAAACTCATTGTAGTACTAAAGTAGAAAATACAGAGCACC CAGGAAATTTGATTCTGATATACCTAGACTAAGACAATAGA ATCTGGGTTTTTCCTCTTTACGATTATACAGTGTTGAAACAG AAATCAAGCTACACCCACCTCTGAATATTTCATTCCAAATCC ATGGAGCAGTTGCATAAGACTCAGAATCTGGTCAATCTCAT GGTTTGAGATTCAGATTAGGAGAATTAATGTGCATATTTGA ATATATATCACACTTGTAGGTTAAAAGGTAAAGCAAGGGGT TTGGCTAGTTCAAGGCCTGTCAAAACCACTTTTTTCCATTTC AAGCAAGTATGAGCCTATACTACACACCAAGCAGTTTGCAA AGCCCTCTTTGGCATATAGACAAATTTCAGACAGTATGTCA GTATGTCTCTTAATGACTTAAGATGTAGTATATAGACAGTA GGGATATCTTGTTTTTATTCCCTCATGGTACTTAGGTGCTTG TTAAGGCCATAATTCTGGATGTTATTGACTTTAAACTGCCCT GCCCTTTTTAATTCTAAGTTGGCCTCTTCCATTCTTATAAGG CCACTTTTAAATTCATTAGGGGGATTGCGTTGGGTCAGAAC TAAGTACAACTTGTGGACACCCCACTCTACCCCAGACCTTT ATTTTAGTGTCCATTGAGGAGAGATCTGACTTCATCCTTTTT GTACGTAACCCAGTGTAGCTAGAGACTCCAGTTCTTCAAGC CAGACACTAGTTCTAAGGGGCAAAAGTAGGTAGGATTGCTT TCTGGCATGTGTCTTTACTGATGATCTTTGCTTCTTTACCTAA GAGGCTGCTGAGACTTCTTACTCCATTCCTGAACATCCATTC CCAGCAGATAATTAACTTCCTACTCTACTGCAAAAAATAGT GGTGTGTGGTTTGGACTCCCTCTGCTTCCCTCCCACCATTAC TAAACTGATCTATAACATCTTAGATAACCTTCGTCTCATTCT CTTCCGTCATCCAGCTTCAGAAGAAAACCTACTCACTTTTCC AACGAAAGGACAACCTGTCTACCACCTTTTCACTTCTACCAT CTTGGAGACCTGCTCAGTCAGCATAATTCTTCAGTCTTGCAT CTTAGATCTTTCCCTCTCCATTGACTCCTTCCCCGTAGCTTGC ACACATGATCAAATTTTACCCCATATTAAAAAATAAAACAA AAAACCTCAAGAACCAAAATGTCCTTGCCCTTGTTCCTGCCT GCACATTGTCAGTTGTTGCCTTCTCTGCTTTCTTACACTGCC AAATTTATTGTAAAAGAATCACTGCCACTTAATATATTTTAA

[1908]

		GTGCTTGATAAAGCCATCTTGTTTCTCTCTCATTTCTCAAAC ATAGTGTGCATCAGATCTCACTAGTCCATTGACAGATGGAA AGATATTCTCCCCAAATATTTAAGCCTCTTTTCTCTATAATT AGCCTACCATCTAACTAGCTACACATACTATTTTGGTTCACA ATTTTAATTTTCCCCTCTTTATCTCCCCTGCTTCCCACAACTA ACTTCTGTTGATTACTGTAAGTTTTAGGTCTTCTCTCCAGTT GTTCTTTACCTGGACTATTGCAGTAGTCTGTTAACGGATCTC CCTTTCTCTTTTCCCTTGCTGCCCTCAGTCCTTCCTTTACACT GCTGTCAATGTTTTTTTTTTAATGAAATTAAATCTGAGTGGT TTACAGTTGTTTATGTTATCAAGTCTAAACTCAGCATGACAT TCAAGGAAGCCCTTTAGAATTTTTCTTATTCATCTTTTCCAA CCTCATTTCCTAGAGCTCACCTAAATAATTCTCTGCTTTCAG TTCTTCACTTTCTTTATCTGGCTGTACACGTTACTCTGCCTAG AAAGCCCCTTCTTTCCCATAACATTCTTACTCATCCTTTAAG ACCCAGTTTAAACATCACCCTCTAGGAAGATCATTCATAGA CACATTCTTGTGATTTTTAAGGAACTTTTCTATCCAACCATA CAAGTGACTTGAGATTTTCCATGAAAATATGCAGCTTCATG ATTTCATAATCAAGTCTATACAAGTGAGAAGCAGTGGCAGG TTCTCTTGAAATACAGAAGAAAAATCTATCTTCTCCCACATG ATTTTTAGATTTTTCTTCTATGGAATTTATACTTTAAACTTTT TACATTCACAAGGAAGGTATTGAATCCTACTTTCTGGACCCT GTGTTAGATTCTTAGGATACCAAATGAAGACAGTGTCTTAC TTTCTGAGCCTGGAGAGATCAGTTAAGTAAAATAGTAATTA CACAGTAGTAGGTACAGTGACAACATTTGAACACAAGGCA ATGGGAGCAATAAGGAGGGGAAGAATACAATTGAGTAATG GTAGGGAAGGGGAACAAGATTGAACAACTCAACTGTGCTTT AGTAGGAAGAGCAAAAGTTAGCAAACTGTAGCTGCCATTTA TTGAGTACTTGCTGTATATGTGAAAGGTGATACAAAAACAT GTTATCTTATTAAATCTTAACAATATCTCTATGAGGTATATA CCATCACTATGCACATTTTATAGATGAGGAAACTGAGGAGC AGAGGTAAGTAACTTGCCTAAGGTTATACAGCTAAGAAGTA CATGAGGTGAATCTTAAACTAGGGTCGACCCCTTAATGTGT GCACTTAACTATTATACACCCTATGTACTCAGTGGGGTAAT AGTGTATAACAGTTAAGAGGCTATTTAGGTTTGAGGAACAG TATGTGCTAAGGCATGGGGATGAGAGTGCATTTGCATAGTC ATGGAATTGCAATAACGTCATTATGATTGGAGCTTAGTGTG GAAATGAGGGAGTACAGGAGGTGGGGCTGGAAAGGATCTT GAAGGACCTCGTTTGTATTCCATGCTAATGTACTTAGAATTT AGCCTGAAAAGGGTTGAGGGTGTTGTTAAAGTATCTTAGGC AAAGGAGTGCACATTTGCATTTAGAACAGTTATTTTGGGAA CTGTAGAAAATACATCAGGGCCAGGATGGAGAAACCTTGA GGATGGAGGCAGGGAGCTGGTTAGAAGGGTATGGCAGTAG TTCGAGGGGGGGAGGATGAGTGTCTAATTCATTCATTCAACA GACATTGGATTTAGGAACTATTAATTAGGTTGAACCTACTA AGAATTCTCCATGGCTAAGGAGAGGGAGTAATCTAATGTGA TTCTTAGGTCCAGGTCTGGTTCACTGGTAGATGATAGAAAA

[1909]

		TACTTTAGCAAAGTGATTTAGGCTGAGGGTAAGAAGTGGGG GTACGTAAGTTTTTGGACATACTGACTTTGAAGTAACTGTAT TACATCCAAGTGGAAGTGCACAGCAGACAGTTGGCTGTCCA ACATCTGCAGTTTAGAAGAAAGGCAGTGCATGATTCAGTTT TTTATTTAAAAGTTTGCAGGTGAAGAAAACCATGGGAGTCA GGGAAAATACTAGGGGGCAGAGGGTACTGAATCTGAAGCC CTTAGGGACACTAACATTTAGTGTGAGTCAAGGAATAGATT TCAACAAAGAAAGCAAACTAGGATGGGGTGGACAAAGCAG GAGGAAATTCGTAATCAGGAGATACCATGGAGGCCAAGAG AGAAGAGCAAGAAAGAGACTGCCCACTGGCTCAAGAACTG TGGAAAAGTCAAGACAGAAAGTGAACCATGCATATTTGATT TTTCACAAGGGATTGGTGGTGACTTTGGCAAGAGCTGTAGT AATGAAGAAGTAGGGGTGAATGGGTGGAGGCCACGTAACA GATTTAAGGAGTGAATTGGAAGTGAGGAAATGCTTATAGAT TGTTAATTTGGGATGCTAGGGAGAGAGAAAGTATGAGGGAT TTTTTTTAAGTTGGCAAATATTCAAGCAATTTTTAAAGACAC ACACAAAAACAACACCTTGTAAATGGAATGGGGGATGTGG GAGGCTGATAATCAACTAAGGAAAGTCGTTGAGGAGACTG ATGGGTATGGAGGCAGAAATGGAAACTAGCTTTCAGGTGAT GGGATTCATTTCAGAAAAGGAAGCAAAAAAAAAAAAAAGG TGTGGATAGTTGGGGTTACAGGTAGGTTTATAGGGAAGGAG TATTGGAAGCTTCAGGATTCTCCTCTGAAGGTTTCAGTTTGT ATTAAGAAATAGGGAGAGAGGACTGTTGGAGAGTATGGGA TAAAGGGCAGAAGGGAGTAATTTAAGAGTTGTTAAAAAGA AGCGAACATTTACATGAAATATGTAAAATGGTAAAGATTGA AGGCCCGGAGGAGCAGGGACTATGACATTCTTCTGTTTTTG CCTATTAGCAACATGAATTTTCTTAGAAATCTGTAAGACCA ATTACTCTTCTGCCCATCCATAAGGACGTTGTCCATGCAGAA AAGATAACACTTGTAACCTTGTATTATATACTTATCATCGCC CATTTGAGAATTGTAAGCTCCTAAAAGATAATAACTATATT TTTTCATCACTATATCCCCACATCCTATCACAATATTTCATC ACAGGTAATTCTTGACAAATGTTGATTGCATTTTTAAAATTT CTAACCTGAACTTGTGTGCTGTGACCACCATGGATTGAGTCT TCTCTGCCACTACAAAGCTCTTTTCTAGACTATGATATGAGA TGGTTTGGGCTGATAGTCTATATTCACCAATACTTGTACAGT TCCAATGAAGGTTTCAAGTCTAATACTTTTGGCATTTGATAT AAAATCATTTTCCCATTTTATTTGCTAATTTATCTATAACTCT GGCATTACTCTTGGTTACATTTGTCTGCTGCTATCTGATTTA GACTGCTATAAGCATATCTTGTTTATTCAGAGTTTTCTTATT CATGTTAATTATCTGTGTTTCTTTATTTGCTCTCTACATTTTA AATAGTTTCTTCACTTTGCTGTTTTATGAGAAGGGAGTAGGC AAAAGGAAAAAACCCCAAATCAGACAGTTTTACTACTTAAT AGTTTTTTAATGCATCTTTATAGAGATTGAAGTTGTAGTTAA CAGCTAGAGTGATATTTTTGGCCTGCCCTTATTTATTAATTA CTAGTGCAAAGGTTATTCAAATTGTGGTTTATCCAGGTCAAT TTTACTGTTATTTTTACTAATAGCATTTATTCTACTTAAATTG

[1910]

		CTTCAGCTATAAAATGTTTTTATTGTAACAAATAATGCAGTA TAATTATTGCTTTCTGTATTCCTTTGAAAATTCATTCTCTAAA CATATGTTATGAAATGGTGGATTGTTCACCAACTACTTCTTA CTTACTTAATTAAAGCCTTTGCAAAAAGTTTCATAGGATGA CTGAGTTCTTCATTCGTACCTCTTTTTTTTTAAGAATAATCTCT TGAAAGTCAAACCATGATTCATACAAATATAAAATGAACAT GTGTCAAAGATTTTATTTCACTAATTAATTAACAAGCAAACT AGCAAGAAGGCAAAACCCTTTTAAAAGAAAATTGGAAAAA CAGACACATTTATAGGCAATCAAGAATGCCTAAATGAATTT GCTAATAAATGCAAAATTGGTCAATATCCTCAGGGCAGTAA AATGTAGTCTTTTGGAATCCTCTCTTCCACCAGGTGGAAATC AATTGCAGAACAAGATTTATTTTTATCTGTATGGACAGCAA TCCATTTGAATTACTCTCAGTTTTCTACAACTTATGAAACTG TAAAACAGCCCAGTCAAAGTCAGTGAAAGGCACAGGCTTCT ATAGAGTCAGATAATTCCAAAGCGTCTGTTAGACATTGCCC AGCACTTGACTGAAAGGATACCCAGTAGTCTTTGTATCCCTT TCAAAATCTTCACCATATTTTCTGATACTTTCCTTCCTTTATA ATTTGAACATCTTCACCCCTTTATTCTTCTCTGGTATACTATG TCCTCTCTCCCTCAGTGTTTCTCTCTCAGGGGAAATAATTCA CAATTCCAAAGTTTTAAAGAATGCAACGGAAGTCCAGGTTT TGCCTTGGGCTTCCTAGTATTTGGGTGGCTAGAAATGTAGA AAACTGGGAAGAGGTGAGCTGTGGATGCCCACAATATAGG TTCAGACTGCAATTTCCCAGAAATATAACAATTTGGACTAG TCAAAGAGGGCCCATATCATTACATTAAAATGCCAGATTAT CTAGTTTTTATAGTATCACCCTACATTTTTACAGCATAGTAT TGTTTAGAGAGCACTTGCCGCTATGTTTTCCATGTTAATGCT CAACACAGTTCTGTGAAGTAGCCCGGTGTTTGTTTTTGATCC TCCTACTTAAGAGATCCTCCTATTTTAGAGAGTAAACCAAG GCATAGAAAAGTGAGTTGCTTAAGGCAGCATATTAAAAAG GGGCAGAAATAGTATTTTTACTCAGGTGTTTTGAACATTGTC CAGTACCTATATTCCAGTATGCATCCTTGCATTCAATTCATG GGGTATTTATTGAGTAAACATAGTGTTCTTACAATAGAAAC ATTCTATGCCTCTGATTTTTATTCCAGTTTATGTAGAAGTAA ATCTTAAGTGTGAACTATTAACAAAGTTGATATTTTATTTAT ATTTGTTAGTAATTTGTGTTTTGTTTTTGTTTATGTTTTGAGG GGAAGGCCAAGTAGCTACTTAGGTAAAAGAGTTGCTGAGTG GCTGAAGAATATGGAAGACAACTACAATTCCTACACATTCT TGTACATTTTAGTTGAACAATGAGTGATTACATTTATTTACC CAGTGCCTCTTCTATAAGGCAACAACTGGTAGTTTATCCTAT TGAGAAGCGTAGATAGGATGCTTATTAGCAGTAACTGCTCT TGGTTTCAACTTGCATCTTACTTAGCTTTTTCACCGTTTTGTG GTTTCTTGGAGGAAGAATACCCATAATATACATTTGGAGAC TGTTGTTCTGTAGTGTCAATGAAATGTGGGGGTGGGAAAAT GTCATTCAAGACTCCCATACAAAATGTCTATTGCTGCCTATA TTTTGCTATGGGAAAGTAGCCACAGATAATGTTTTTTTTTTC CTCATTAGTATTTTAAGATTTTCCATCCTAGTGGAAAGATAT

[1911]

		GATTTGATTCATCCTATTTACTTTGTATATTAAAGTACAGTA GAACCTGCCACTTTTTTTGGAAATGCAGCATAAGGATAAAG ATAAATTTCATATCAGTTCAGCAAGTTCTATTTAGCAGTGTG TTGAAGTTGAGACTGAATAAAATATTTGGTTTGGTTTTCTGT TCAAAATTTTACCTTGATAAGGACAATATTTTTCTACATATA TCAGTAGGCAGTAATGATTACTTCAAAGCTTCCAAAGCCAG ATACTACACCTGCATGTTCCAACATAGTTGCTGAATTTATTC CCAAGATGCATGTAATGTATACTTTGTATTATTGAGAATGA ATAAAGAAAAGTCATAATGATGCCTTCCAGCTGTGCAAGTT AATATTAAAATATAATTTGTTTGCATATTTCACCTAATAGGT CTTCTTCATTGCTATACTGTTTACTTAAGTGAACAATGGAAA TGTTGCTGTTTATCTTAAGGATTTGTAACATGCCTAAGATCT TACAGTACAGACTTCTATAATTAATGAAACATTTTTCTTTTT CCTTTCCAGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAA TCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCA TGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGT ATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCT TTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTA GTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGAT GCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACAC AGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAA GGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGGTAAGAC TTCTATGAAAGCTTCTTTTTTTATTTGTCCTGGTGCAACCTG ATCCTCTTTCGAGAGGAGGCCAAATGGGGATAGGTACTCCT TTGAATCAAAAAGCAGGCTGTTATTAATAAATGTTGATGTA ATGTTTAGCAAGTTTAAGATTGTGATTTCTATCCTATTTGTT AATCTACTCTTCATGGTAAAACACATTTACTATTTAATTTGT ATTACTTGTTAATTTGTATATTGTGTGGTTCTCAAACTTTTG GTCTAAGGACCATTTTATTTGGCTGATTGGTCCTGGGGTAAT GTACTCTTCATTTCTGTTTGCTGCCATCCAAGTGCTTTCTTTC CTGTGACTAATTTTCAAGTCTCTTTCCAATTATTCAGCCTTCT GTTTTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACCTTA CACTTTGACCAAGGGATGACAAGTCCCAGCCATGCTCCCTC TGGAGAGAATAGAGGAGAGTCAGGAGATTAAATCACGTTA TCATGGATGATTTCTTCAGATTTTCTGTGCTTAGCCTTACTTT GGTCTTCTTTTTGTTGGCCAAAATATGAGAGAACTAGAGAT TCAAATTCATTTATTCAAATTCAGACTTGATGATAGCACCAT GATTCTGCCCTTTTTATCACAAACTTGGGTTGCTGAGGTGTA GAAGGTAGTAAAATTAGCTGAAGTAAATAGTCTCCTCTCCT TGCTGTTTCCTGCTGTGCTAGCTGAGTTCTTCAACCCCATAT GAGTATGTTCTTTCTGTTTTGAAATCTCTATTTAGAATTACC TGTCATATTACCGATCATGGCTTAACCACATTTTGAGAACCT TAACTCTAGATAGGTTCAGTTCTGTTCAGTTGGATCAACTAT TTGCCTAGCTTTTATAAAATAATCTACTACCAGATTAGGAAT GGGGTGTTTGGTTTGATGAAATGTTTGCACATTACTTAGGAT TGAGAATCAGGAGGTCTGAGTTACAGCCCCTGTTCAGCAAC

[1912]

		TTACTATTCACCTGTGTGATCTTGAGAAGGTGCTTAACCGAG TCCAAGTTACCTCATGTCCGAAATGGAGATGACAATAGATA CTTGCTTTTATGTATTCTACAGTCTAATGAGCATAAACCAAA GTGTGTTGTAAATGTTAGTTGTTTTCCTGGGATGTTTATTTT ATGAAGTAAGGTATCAAGTTGTTGAAGTTAGCCTAGAGCAT TGTGAGAGGGATTTGTGTGCAGTGAGGAATGGGCAAGGGA TGGCTCCGAGTAGGCAAGGAGAATTTGAAAGGTCTTTCTGC TCAGAAATCTCTCTTACATTGTAGCTTTTACTATTGATATTA ATTTGGGCAAAGGAGCTTTTTTTGTTGTTGTTAAGTATACCT TTAATGAAGGGTGTAATCAGTCAGTCATATCCACTGCAACT AACTGGTATTAGATCATCTAATACCTAGTTGAAATTTTTCTG AGGTAATGTACAATTTTGTGGAAATGAAAGAATAAGATATG GGGGAACAGTAACTTTTGGGGGGTAATGCAGGTCACTGAGA GGTAAACTGGAAAACTCAAAATATGAGATTTGAAAGGCCA GAAGATGAAATGAAGATGGAAGAGAAAGGAATGCCAGGAT CTGAGATAAAAACAGTTTATTATTTTGCGTGTGATTGAAAG ACTGTTTTATCTTTGTTTGCAAAATACCCTATAAAAATAAAA ACTAGACTTATTTTGGGAGCCATTAAAAGGAGAAAGTATTG TTTTATTATAGAGAATGTAGAAAATTCTACCAGAGGTTTGA GACATTTGGCTTTGCATCCATTTTAATTTTTTGAAATAATTA TTGATTTACAGGACGATTCAAAGATAGAGAGCTTCCATGTG CCCTTCACCCAGTCCCCCCAATGGTTTCCTCTTATGTGACAC AATATGAAAATCAGGAAGTTCACAATGGTGCAGTGTGTGTT AATGGTTCGCTCTCATTTTATCACGTGTTTATTTGCGTAACT ACCTACACAATCAGGACATAGACCTATCCATCATAACAAAC ATCTCCCTCATGCTTATTCTTACTAGTCATACCGCCACCTCC CACTGTCCCTAACCTGGCAAGCACCAATTTGTCCTCCATATC TATAATTTTGTCATTTCAACAATGCTATATAAATGGAATGAT ACAAGATGTGACCTTTTGAGAAGGGCTTTTTCACTAAGCAC AATGCCCTTGAGATCTATCCAAGTTTTTGCATCTATCAATAG TTCTTTTTTCCTTACTTTTTTTTTTGCTGAGTAGTAGTCCATA GTATGAATATATCACAGTTTGTTTAACCACTTACCTATAGTA GGACATTTTGGTTGTTTCCAAGTTTGGGCTGTTACAAATGAA ACTGCTCTGAACAATTGTGTACAGGTTCTTGTGTAGACACA GTTTTCATTTCTCTGGGATAAATGCTCAGAAGTATGGTTACT GGGCTGTATGGTAAGTATATGCTTAGTTTTTAAAGAAACTG CCAGACTTTTCCAGAGTGGCTATTTCATTTTACATTTCCATC AACAATGTAAGAGTGATCTGGTTTCTCCACATCCTCACCAG TATCTGGTGCCACTATGTTGTAACCATTTTTAACTGAAAAAA ACAACAAACAAACAAAAACCAGTTAAAAAGTTATCTGCAC AAAAAGGTTAAATGGGGCAGGACTCTTACTATGGAGTATAA GTTCTTTTCTAATAAGAATACTTACTTGTCACGGACTTTGAG GATTTAAGCATTAGAAACCATTTTTACTATGTCGTGATTTTT GCAAATACAGGCATAAATGAGAAACAGAATTTGCTCAATA GAGAAGTGAATTCTACTTAATAGAATGCAGATAATAGTGAC CATTCTTTGTGCCTTTTTAAATTTTTTGGAGGACTAGGACTG

[1913]

		AATACATGGAAACACTATAAGATATAGTTTTATATACCTCT GTGCCTATGTATGATATAGTCCATTAGAAGGAGCACTGGAC TTGAAATTAGAAAGCTGTTTTCTAGACTTCACTGTTTAATAG CTTAAGAAAAGTTGGATAAAAAACTCAACCTATCTGTCCCT CAAATTCTTCTTAGTACAGTAAAGATGGCATCACCATCATG GAAATGTTTGAGATATAAATAATACCTCTCTTACTTAACAA AATTTTACTAAGTGCCTACCATGTGCCAGTCACCGTACTAG GCATCACAGATTCTGTGATGAATAAGACATTATTGCTGATTT CAAGGAAGTGGTTGCAGTACAAATATGAAGAGTGAAGTGA CCTAACATTTATTTGCACATGTGCCACATACTTTATGTAAGT CGTGTCCTGTTATCCTCTCAAGAACTCTAGGAGATAGATGG AGTTCTTACCATTTAACAAATAGGGAAGCAAAAGAGATTCA AGGTATTGTTCAAGGTCAGAGTAATAGCCAAGAATTAAACC TAGATCTCTTTGGCATCAAAACCCAGTATTTTTACCACCGTA ATATGTGGTTCATGTGAAAACACCTTGTAAATAACTAAATA CTGAATGCAAATACTAGTAATCATAAAATTTATCATTAATA TTTCTGTTCTATTAGCAATACAAAAACTTGAAAACTTAAAGT TTATTTTTCTCTAAGCTATTAGAGTTTTGTTTAGAAAGGTCA GTTCAAGTTCCGCAGTGTTGCCAATTCCATTATTATCAACAG GACATATGGTCTGTTTATAATGAAGACATGAAGGCATTGCA AGATCTTTGTATTAGTTTTCTAGTGCTGCATAACAACTACAA ATATAGCAGCTTAAAACACTACCCATTTTTTAGCTCAAAGTT TTGTAGGTGGCAAGCCTGGTCATGGCATGACTGGGTTCTCT GATCAAAGTCTTAAAAGACTAAAATCAAGGTGTTGCCCAGG GCATACTTTATTTGGAGTTTGGGGTCTTGTTCTAGGCTCACA TAATTGTGACAGAATTCAATTCCTTGTGATTGTAAGACTGG GGTCCCTGTTTCTTTGCTAAGTATCTGCCAAGGAATTGTAGC AGCTCCTAGAGATTGCCCTCATTTCTTGCCCCATGGCCCCTT GCATATTTAAAGCCAGCAAAGGAGAATCTTCCTCTTGTTGA ATCCCTCTCACATATTGAGTTTATTTTGCCAGGAAGAACCCA GACCCTTTTAAGAGACCACTTGGTTAGGTCAGCTCTCTCTCC CTCAAAAATAATCTCTCTTTCTTAAAGTCAGCTGATTTGGGA TCTTAATTACATCAGCAAACTCCCTTTTGCTGGGTGATATAA TCATGAAAATGAAATCCAATACATTCACAGTCCTAGTCTCC CACACACAAGGGGAGGGAATTATAAAAGATGCATGGCTAG GGCAGGGGTTTTGGGACCACCTTAGAATTCTGGGTTTGATT AAATAAATAATGGGACTGTAGCCTAGCAAGTCGACACATCA GAAAAGCCATCACAATCCTGAAACATCAAGTAAAAATTTGG TTTGCATTTTAGGATTGTAAATGTTACTGTGGTGTATGCGTG TGTGTGTGTGTGTAACCTGGTGTTCCCTATGTTTGTGGGAGT TTGAAGGAGACACTTTGTTGATAGGAATGGTGTCTTCACTTT TTTAGGTTGTCTCATTTTTGTACAGTGATAAGACAAATGAGG TCCTGGGTTTTAATAACACTTCAGCTTGAAAGCAAAAATTA AACACTTATTCATTGACTACACCCTTGTAATATCACTTCTTT GCCTTTCCACTAGCAAGAAGTTCATTTTCGTGGAAGCCATTC TGCCTGTCCAGGAATTGGAGGAGAGTGATAGACACAGTTGT

[1914]

		CAGCCATAGCTTGGGTAGAATAAGGATGTGAATGTCCTTGG CTTATCTTTATTAATCTTGTGATGGAAAAATATCTGACATTG TTCTTAGTCCATTTTAAGCTTAATTTATGTTCTTAGTGGCAT AGAAATTCAGAGCTGAAAGAAGTATCATGTCTCACTCTCCC CTTGAGGAACAAGAGTTAACGTCATCTGACAGTACTACCAT AACAAATCAATAGCTTAATAGGCATATAAGTGGCTTTATAT AAAATGTTGGTTTTTTTCCCCCAGCATCTCAGTTGGTTCTTA AATATCTAATTCCATGATCCTCAAACTTTTCCCACTGTAACA AATTAGAGAGAGGAGGAACATGTTCATCAGTGACTGTAGTT CAAATACAGCAGAAATGTGCAGCAGTGATTTCAAACTGAGA GAATCCTGGATGCCCTTCTCCATTGTGTGCCCCCCCCCCCA CCCGCCCCACATATCAGGGAACAATTTAAAATCCTGGCACA ATAATGAGAAGGGAGAGTGACAAACTGATAAGTTCCAGTT AAGAATCACTTAGACAGGCCAGGTGTGGCAGCCCACGCCTG TAATACCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCACCT GAGGTCAGGAATTTGAGACCAGCCTGGCCAACATGATAAA ACCCTGTCTCTACCAAAATTACAAAATTTAGCTGGGCATGG TGGCGCCTGCCTATAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGAC AGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGA GCTGAGACCACACCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGT GAGACTCCATCTCAAAAATAAAAAAAAAAGAATCACTTAG ACAGTATTTTTTGTTCTGTAATCTTCCTCTCTGTCATTGAAAT GTCTCATATTTCTTGTTTCACATAGAATCTGGGAGTCATCAA GTAGTCATCTAGTCTATCTCATCATCTAATTTACGAATTATT TCTATCACACCCCAAGTAGCTGGCGATTCAGATTTTTTACTG AAAGCTTGACATGATGAGACATTATTACTTCCCAGAGGATC TTGGTCTGTTATCAGGCAATTTCAGTTCTTCCTTAAATCAAG CTAAAACTTGCTACTATTCTCACTCACTGGGAGGGCTGTAGT ATTTCTCTCAAGTTTATACCTCTCTGTGATGAAAATCTCTGT TCTTTTAGCCATTGCTCATGGTTTCGGGATCCCCATTCTAGT CATCTTCCTTTGGAGCAATTCCCTGTTAGATCTTCAAATGTG ATGAGTAAAACTGAGCTCAGGACTGCGTTTGTTGGTCACAC CCTTCTCCCTTCCAAATGACTGCTGCTGTAACTTTCTGACAG GTCCTGCTTCCCTGTAATCCATTCTCCATGTGGCTGCCAAAG AAGATTTGAAATAAGTCAGGTTATTTTTCTTCCCTATTTAAA GCCTTCCAGCCGCTTGTCATTGCTCTTAGAATAAAATCCAAA CTCTCCCAACAAGCTTTTAAGACTCTACATGGTCTTGCCCCA GCAAACTCTTCCCATTTGATCTCATCACTGAATTCCAGTCAC AATGGCCATCCTTTGGTTTCTCAAAGTTGCCGTTCCTTTGGC ATCTCTTCCTCCCTGTCTTCACAATGTAGGCTCCTTCCCATC CTAGGCTTAGTTTCGTTCCTCTCCCTAGAGGCCTTTCCTTAC TGCCTCAGCTTCTCCCACTCTGCACACTCAGGGTCCTCTGCA TTGTTCACTGCTGGCCTTCAAGAGCCTAGAGGAGTTCCTCCC CATGGTGGGCTTTCAATAAGTGTTTGTGGAATAAGTGAAAA ATGAGTGGTCACACCAGGATCGAATGCACCTCTTACTTTTGT TAATATATTCAAATTAATATTAATATATTAATATTCTATTAA

[1915]

		TATATCCTAAAATTTTGTTGTGTATAGGGGCAGGGACCAAT GAAAGAACATTTCATTGTCAGCTCATCTTGACTATGAGATC AGATATTGGCTATATTTTGAAGGTAGAGTCAGCAGGATTTG CTGTTTAACTAGAGTGGGATGTGGGAGAAATCAGGGAGTCA GGTATAACTCCAAGGTTTTCAGCCTCAAGCAACTGAAGAAA TGGGGTCACCACGACTGAAATGAGGAAAATGAGAGGGGGA GTTTAGTGGGGGATGGGGTGATGAAAATATCAGGATTCATT GTGGAACATGAACAGTTAAGATTAACTGAAGAGCCTGAATT CACTGTTCCTCAGTTTCTACAACTATAAGGAGGGGTTAATA ATTTCTCACATCATAATTGTGAGGATTTGAGGAGTTGAGGT ACACAATTAAAAACAAAAGCACAGGGGAAGTAAGGAAAAA TACATCAATTAAGCATGGCTATTAGACCATACAGCCTTACC AAATCCATTGGGGATTAGATACAAAAATCCAAGCATGATCT CCAAAATTTTTTCCTGGTAGGGTTTTAGGCTATACTGAAGTG ACTTTTCTTTGGCATAAGAAGATATTCAGTTATACAGTTGGA AATAAAGGTATTGATTTGGAGTATCCAAAAACATCTCTCAG TAGAGATCCACAACCAAAGAAGCATAAAAAAAAGTCTTCC ATTCACTCGCAAAACTGTCTTATGACCATTGCAACCCTCAAC AGCAAACATATGGAGTCTCTACTACATATAGAGGAAAATGC TAGATTCTGAAAAGCTAATATCTATAAAACAGAGTTTATGA TGTTGTTATATTCTGGGGATTGATGTAAGCATTTTACCAGGA CTTATTATAGCATTATAAGCTTAACACAAGAAATATGTGGC TATCATTATGGAGTGAAAGGCTGGAAAATTCCTCACCTGTG ACCTGAGAGATAGTGCGTGGTAGAATTTGAAAGAAGTGTTG ATTTCAGAGGAATGCTAGTGCTTGCTTAGGGCAGTATTCAG AAGAACTCTTCCAATCACACAGCCCCTTGTACAGGCAAACT CCGGAATACTTTCAGTACATTTACTTGGCTTTATTGTTAGAG CAGAAACTTCACAGCTAAAATTATGGTCTTAGGGGTTTATA AGATGCAATTAAACTTAATTTTTAAAAGTTCTCACAAATCTT ATTTGAAGTCTTAATATCTTAATTTCCTTTATATAGGATATG TGGATATATTTTTATGATAAAAGTAACATGTGACCAACTTA ATAACAGCTTCGTTAATATCCTAAAGCCACTCATCTTACTTT ACATATAAACAGTCCTTCTGAAGCCTAATTATGCATGGATA ATTGCAGAGTGAGTTTGGGAAAAGACCAACCGGGCACATCT CTCTCCATTTTAACCACAATGAGAAGAGAGTACCTAGTGGT GCATCTTCCTCGCTTAGGTTCCCTGAGTCTGTCTTTACAGGA AGACTTCATTGTTACTTGAAGGTACATTCTTGGAACTTTACA CACCCAGCCACTCAACACATGAATACATACTTATTTTAGTTA ACTGAGTACTTAGTGAGTGCTAAGCTTTGTTTTAAGCCCTTT GCATGTAGTTTATTAACTTTGTTAATAGTTACAACAGTCCTT CAAGATACATGTACTGTGTTATACTAGTGTAACAGTTGAGG ACACCAAAGAACAAAGAGGTGTTGACACGTGGTCACGGTTC CATAGAGTGTTAAGTTAGAGTTGGGTTCAAACCCTGGCAGT GTGGCCACAGAGCCTTGTTCTCAGCCACTGCACTGCACTAC CTCCTCCCGTGAAACATAAGAAAAATGTGAGAAATGCTTAA GTAAGTGTAGTTTTTATTCATAAATAAAATTTACATAAGTAC

[1916]

		ATTATGTGTAATTTGTTTTATGTATATGTGTGTATGTATAAA TAAATACATGTAAAAATAAGGCCACAGTTTTAATTTTTTTCC ATCTCTATAATAAAGCATGTATTATAGACCATTAGCAGAAT TTAAAGTGTTATAGTAAATATTAATTGTGACTTTTGTTTTCT TCTTCCCCAGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTT ATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGAC AGTTTGGTATTAAAAGTAAGTATTATTTCTACTTTTCATTTA TGTTTCAGTGATGATATAGTTATTTCTACGAGACATTGTCAG CGAAATATTTAAAGTTGTACTAGGAAAAGTGCTATTATGAT AAATATGAGTATGTAATTTGAATACTACTAGTCTCCTTGAA GTATATGTTGTCGCCCACATTTTGCTGCAGTTCACTTTTAAT TCCTAAGAAGGTTGTTTTCACTTGGTGTTTTTTTAATCTCTTA AGAATGAATAGTAGGAATATTAGTACCAACACCTTAAACTC ATGTCACATTTTAATATTCACAGAACATCTACACACACATTA TGTTATTAGGTAAACAGGTGGTGACAGCCTGCATTAGTTTT AAGGTAGGACGTTATACTTTGGAGCATTTAGATTCCCCTCTT TTTATTTTCCCAGTTTGATTTTCTCTGTGTACACGTGTTCACC CTTGGAAAAGTCCAGTCGGAACTATGTTTTGTCATCCTCTGC GTGCAGTTCTGCAGCCTCTAAAGAAGCAGCCACCAGAGAGT TAGGTTCTTTGATCTTGCTTTCCTATAATAGTAACGTAACCA GACTTCTGAAGGCAGATCTTGATGCTGCATTAGATTTAGCTT CAACAACACAGAATTGTCATTACTAGGCAAATAGGTAATAT GCATTACGGTTAATGTTTAATCAACCATATTTTCATATTTTG GTAAAGAAAATTTACAAAATTAATGAAGTTCTGAGGTGACA GTCTAAACTTTTAAGCTTTTTAAATACAAGATTTATTCCTTC TTTCCTTGTAGCATCCTGAAGACCAGTAAACATTTATATAAG CAAGGAATAAATACTGCTTATTTAATTTATTCTGCAACCTTT AAACACACAAAAGCTAGTAAACTATTGCAGTGGATTGCCCT GTTGTATATTTTATGAATTTTACTTTTACTCAGCAGTTTAAG CTGTCTATATCTATGGTGGTGTATAAACATGGAAGGGAGAT GACTGATTGATTATATGTTTTAAGCGCTTTTCTCAGTGTATG GCATTCTGGAAATGCTTAGTGATTTCAGAAATGTTCTCAACT TTTGTCTGAAAGGAAAAAAGGGGGAAGAAAGGGGTGGCAG TGGCAACTGTCAAGACATTTTATAACTTTTACTTTCAAGATA GTGTCTAGACTTCTTTTGGAAATTTTCTTATAATCTCTTAGTT TTTTATGTCAAGAAAAGGACTGGTGTAGCATTAAGACCTAT TCTGGCATCAATGATATTAGGGAAAGCTTTTAACCATATTG GCAGAGCCAGACTTTAAGGGCTAAGTCATATGACTTGGGCA GGGAACAGCCTTTTTCAAAGATCATGAAATTATTTCACATA GTGCGATTTTTTGAGTTTGGCTTGATGGATGTTTGCTGATCC AGACGTTATCATTGGTGACATTATTTTTAGTGAAATGAACC AGGAGTGAGTTTGTTCACTGTTGGCTGTATTTTTACAAAATG AGCTTTACAATATTTTTTCTGACTTAAAAAAGTCATACATAT CACTTTAGAACACCTCGTACAAAGTAGGGAGTTATTTAAAA AAAAAAAAAAAAAACTCATCTGTAGTCCCCAAACCTAGAA ATAAACTATTGGTATATTCTGGTGAATTTCCTGTTTCCCTTT

[1917]

		CTGTCTTTTTCTATTCATTTTTGTTATCTTTTTTTTAAAAAAA GGTAACCATAAATGGACTCGTACAGCTTATATGCTTGTACG TTCTGATGTTCCCCCATGTCTTCAGAAATCTTGTTATAGCTG CCTGTGTTCTACTTTTGTGGATGCACTATAATTTACTTAACT CTCATCTTGATGGATTTTAAGGATGTTTCCAATTTTTTTGAT ACTATGAAAATAACTCTGCTAAAGATATGAAGCCTGGAATT GGCAGAGATATTTTAAGACTCTAGATACATACTGGCAAAAT GTTTTCCAGAAACGTTTGTATCAACTACTATTGCAGATGAG AATACCTGTCTTTCACCTCAGTTATAATTCTGATATTATAAC GCTAAAATCTCTGCAAATTTGATGGGTGAAAAAGCATCTTA TTGTAATTGTAATTTTTGTGTTAGTAAGGTGGAATGTTCTTT TTTATATTTTTTGTACTGGTCATATTTTAAGGAACGTGCTTA TAAACCTAAAGAAATATTTTGGTGGGAATTTTTTGTTTTGGC TCATCTTGAAACAGGTAGATGTGTGTGTATGTGCATGGAAG AGGTATGTCTATACATGATTCACCCAGCCTGCGCTCACATTT AAAGGTGTTGATGATAATAGTAGCTAACCATTTGTGGAGCT CTTGCTCTGCTTGACAGGTTCTGTGCAAAGTACTCTATATCT GAAATGACATTTATTTCTCCCAGAAACTCTATGGGCATAGA CACTGTTGTTATTCCCGTTTTGTAGATAAGAAACAGGCACA GATAGATTAGGCAATTTGCCCGCAATCACCCAGCCGTTTCC TGATAGTACTGGGATTTGAACTAGTACTGTTTACCACTGCAC TGTACTGCCTCCCCGTTTTGCATTTATTTTGAGGATTTTATTT CCATGAAGGGTGAACCTATATCTAAGCACATAATACTGAGT AGCTAAAACTTATTAGGAGAGCAGAATGTTGACCTGATTTG TTTACTTATTCTGCAAATACCTAGTGACAGGGTGCCTACTGA TTGCTGGACACCAAGCTACATGCCTGAAATGTGGGTGTGAT GTGCATATTGCCCTGGTTTTGTAGCACCCACATTTAAGCCAG GGAGACACGAATGTATGTGCATCCCATGCCTTGTCACATCT TTGAGATAGTCATGGATCCAAATCTAACTTTTCTGTTAGTGC CTCTGTTGATGGCCTGAGCATTCCACCAAATAGAAATAGAA AGCACCTCTATTCTCCACCTGCTTAGATGTATATTTTTTAGA ATCCAGTATGGTAAATCTTCTAAAGCATTCATAATAACTCA GACCCATGACTTTTATTTTATAGATTTCTAGTTCTGCTTAAC TTTTCCTGATTACCATTTATGGTCTGTACTTGGCTACAGGGG ATTTCTCTCAGTGGTTTTTCCAGCTCTGCATGTGAGTCTTTGT GGTCCAAGACAAACCTGGACCTTTACCAGGCTAAACTTTCA GTAAAGACAGCAGGTTATGCCCTCATTTGCTCACTCTGAGG AGAAAGAGTTTCTTTATACCAGAGCTGTATCTTGAAAGATG TCTCAGGATGCCATTGGTCCTACTGAGGAAGAAGCCTGAGA AGACTCTTAAACTCCCAGAGCCCAGCCAGCACTTGGTGAGC CCTGGACCACGTTTCAAAGATAAAGGCCTCTTACAGGGAAA TGTTCCTAAATACCTTCACCTTTAGCTTAGCTTTAACTTAGG AACTTTTAAGCAGAATCTCTATGCTTAGCAAACAGCTCAGA GATTGCTAGAATCAAACACCAAGGCTTAACTGATAGTATTG AATTTCAGACGCTTTGTTTGTGTTCTGAAAACTACACCAACT CACAGTTTGCCACTCTACTGACAATTAAGTTCCTGGCTGATT

[1918]

[1919]

		TTCAGGATTCTTCTTTCTCACTCTGATATCATTTTAAGTGCTG TCCACCTAGTCCTCCAGTTCCTGCAGGATTAAGGTCCAACTG TATGTAAAGAACTGGCTAACATTTTGAAATTCTTTGAGATA GGCCTATCTGTTCTTTCTTTGCCTTTGTAACTTTGTTTTATAC AGGCAATACTGGCTTCGCACAAAACCGCAAGACCATAAAC ATGACCATGTAAGCTGAAATTCTGCAAAACAATCTTCATGA TGAATGGGAAAAACTATTATTATATTGTTCCATGACCTTTAA AATTTTTTTTGTTGTTAAAACCTTAAAAACTCTGTTATTATC AATAACAACGGCATTGGGAAATGAAAAATAGTAAAGCTAG TATTTAGTATGTGGTAAATTAAATCATTAGAAACATCGAGA ATGAAAGTGTGTTATCAAGAGTAGTTTGAACAACACTTGTG TGTTCTTCTTGCATAACTTTGGATACAGAGCAAGCATCTTCT CTATGGCTTGGTGAATTGTCATACCCCTTTCTAAGTTTGGAT CGGTTTCTACCGTTTTATCCTTTGCACTCTCAATGTCATGAA AGAATTCCTTTAATGTTTTTTTGAATGTTTAAAGTTTATTTTA TTGCCAGTCACTTCCTCTGGGACATCTTTATTCTTTTTGTTAC ATCCTCCTCACTTTCCTCATTTATATCAGTAAGTCCACCTTC GCTGAGTTCTTCTGGCTTCATCTCTAGAGTTTCTTGCATTGC AGTAATGTCGACATTCGCACAATCAGCTATTTCTTCTCTTAC TCCATTTATGGTCTATTCAAATTTCACTCCTAGCATTTGTCA GTTTTTATTTCTTTACTCTTTCATCTTTCTTGCCTAGTTTCCTC TTTTGATTTATCCATTATAAAATGTCACATGGGTTTATCACT GGGAAACAAGGAGGTAACAAAACTCCATACTTTGCTGTCTG TGCATGACCTAAATATCAGATGTACAGTGACTAGTCACCAA CAGTCTTCAAAAGAAGTGACATGGTTGATCACTGATCATGA TGGGACATCTGCTATTTACATAGTTATTTTTGAACTGAAGAA ATAGCAGTGAAGTTGTACTTTATGCAGTTACTCAGTTAATAT ATTGTGGTAATTGAAATTTGGACTGTTTATGAGGGATTTATT TGATTAAACCATGGTAACTGGAATTCATATCAGAATAGTGC AAAGTGAGGACTGCTGTACTTGATTCCAAATTTAAAACTGT ATTCTAGGCATCTTTAATTTTTTTTTTTCAACTTTCCCCTCCC TGCTCAAAATTACTCCACAGAGATTTTGGTTACGGCTCAGA TGTCTTTGAGTAGATGTTCCTGTAGAAATCATTGTTAGAAAA TTCAAGGAAAAAAGTTCTCATTACACTACCTTGAGATCCTA CCAAGTCCTTGAGTTTTGACTTGAGGACAGCTTAATAATGA AAGTAATTCAGCCATGAAAGCATATTTAAAATAAGTAATGG AACAGGAAATTTCTTCATAGATTAGAAAAATTATTCTGAAA AAGTGAAGACATAGCCTATCTTGGACTAGGAAATTTCCATC CAAGAAAGTAAAATATACAATAAATATTATCACAAAGAATC ATTCTGTGACCTGGTTGATGGCCCCTGGTAATAAGACTTTGT TATTAAGTTTACTGTGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTTGCCCAGGCTGG AGTGCAGTGGCGTGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCGCCTC CCAGGTTCAAGCGATTCTTCTGTCTCAGCCTCCCGAGTAGCT ACAGGCTACTGGCGTGCACCACCATGCCTGGGTAATTTTTG TATTTTTAGTAGTGATGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTG

		GTCTCGAACTCCTGACCTCGTGATCCGTCTGTCTCGGCCTCC CAAAGTGCTGAGATTACAGGCATTAGCCACCATGCATGGCC CCTTACAGTGAATTCTGTTCAATAATCTTGAACTCCCAGTGC TTTCCCTTGGTCCTGTCCATATAATGATCACATTCTGTTATT AAATAATGTGCTTATGTGCTGATTTTATTGTAGGAGGAATTG AACAAATCTATAGCTCAGCATTTTACTCTTTTGTAGAAATCC CTTGACCCTTTCCAAATCCAGACATCACAACCTTCTCCATAT ACTCAAAAATTGTGAAATCCACAAGGCAGGGAAAGTTGAT AATGAAAAAAAGGAAGTTTGGTCTGTTGGACATCCTCTTCT TTCATCTTTTATGTTCAAAGTACTTGATGCACAAAGCCTGGA CTCTTTTATCTCTGTCCTATAGACTGATGTCTAGTCAGTATT CATTGTGACAAAATTGTTTCATTAGAGCAAGTTGGATAGTG TATGGAGATTATTATAAAATGATTTAACTTGTCTTCTGTCAA GTAATTTTATAATTGGTATTAATGTTCATTTTTTTCCAGTACC AGTTTCAGAAGCTTTCATTTGTGTATGCATGTGTGTGTTAAA TAAGTGTATTAGATACTTGAAAAATAGTAATTTAAATTTAA ACAATTTAAAAAATGAAATTGTAATTTTATGTGTAAAGGTG TCTGATGTGCTTTATTCTGCACTGAAAACAATATTCATTTAC AGCTCAACAGACACCAAATATATTCTAAAATTACTTTCCTA GAGTTATCAGAAAACAGCACTGTAATAATGAAATCAAACCC ATCTTTCTTTATGATTTATTCTTAGTCTGATACGCATCAGCCT GGTAAGCCTTCCTGTCTCTCTGCTTACTTACCAATCACTCCA AATGTCATGTCTTTGGGCAGGCATTAAATTCTTGGGTTTTGG GTTTTGTTGGATGGACTGCAGTCTGTGTGAGCCTATATGGGT GTGTCAAATCCAGTCTTTGGGGTGTCATGGAAACTTAGCAT GATAGACTTGATTTTATCCCCAAGTTGACTTGGTAATTTCAT TAGATTTCATCAGTCACAACCTGCATTTTATCTTGTATGTGC TGTCTATTGGTCACAAAATCAGAAAACCTTCTTGTCCATTCA TAACATTAGCTGTTTTTTCAGGTGGCTAGAGGGACATGTCAT TGCTTCATCTGCATGAATTTGAAAGATTAAATGCATAAAGG AATTTTCTTAGAGTAGAGTAGGCCTTCACCATCTCTTTAACT GGGAAAGAAGTTTTGGGAGTAACATACTCATCACTCACACC CCCCTCCCCTCAAACACACACACTCACCCATTAGAATGTAA GGGCCTTGAGGCAGGCCTTGTGTTTGCTTTTCGTGTTCACTG TCAGCATTTAGAATAGTGATAGTCATATAGATGGATAGTGC TCAATCAATTATTGTCAAATAAAGTAATCTACTTGTTCCTTG ATTTAGACTAGCAAAAGGGGCTGGTACATTGTAGGTACACA GTAAATATTTGTAGAACAGATGAATGAACCAACCCAACAGA TTTCTTAGAAGTAGCCTGCTTTTGGTTACTAATTATTTTATA GAACATATAAAAGAAAATTTTAGAATACCTAATTTGTTCAC AAAAATGTTATATTGTCTCCCCTGATACTTGGTATTCCTGTG TCAGGCTGAGCACTAAGGTTATACATTTTTTGTTAAGCATGT AATTACTGTTATTTCTCATGTACTTTATTTTGTGTATTGATTT CAGTAGTTGTAGCTGAGGGTAATCCTTAAGAGCATGCAGAT TTTAAAAATTACATAGATTGCCTTGCCAAGCCGTCTGAAAG TCATACTAGAAAATTTGATAAGAGCCTGCTGTTAACAACAC

[1920]

		ATTGAGTTATTTTTATCTTAATGCTAAGTGGAGAATTACTTG AATTTATTTTTTTTGCTGCATTTAATGTTTTGATACATTCAAT AAATAAGGATAAATCCACTTACTGAAGGACAAGAAAAGAT CAATAAGAGATCCTTGAGGTTATTGGGTTCTATGGCATCTAT TATATCAAATTCCTTGCCCTTTCACTATACTGAGAAATTTGA CGACTGGGCTAGCAACAAGATACCTACCCCACATTAGCTGT GGTACCTGCTGAAATGTGACCATGTGAGCAAAGAAAATGA GCCAAAAGAAACTCTTTCTGAAGATTCACTGAAGAAAACCT GGAGATACTCTTTCATTAGTAGACCCCACAGAGACAGGTGG AGTGTCCGTTATCCAGAATGCCTGGGACCAGAAGTGTTTTG GATTTCAGATTTTTTCACACTTGGGATCCTCAACATGTGTAT TTGTTGGAAATGGCTACTTAATTTAAGGAAAAGTTTAAGGT GGCCTGGAAAATAAGTAGTAGTTGAACTAATCAACAGGAA CCAAAACTACTTTCAATATATAGTGTACTTATACTCAAAGA GAGACGGACCATTTTATGGTGGAACCCTGTCTATGGTAGTA TTTTGTGATGTTTTATTTTTGTTGCTATTGTTTGCACTGTTTT CTCCTATAACAGCTCTTCTAAGCCTTAAGAGGATAAATTTTA TATGAGATTCAAACTCTTATTTTTGTTAAGAAGGATGTAAGT CACCAGGCATGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTG GGAGGCCGTGGCAGGTGGATCATGAGGTAAGGAGCTCGAG ATCAGCCTGGCCAACAATGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAA AAAAAAAAAAAAGAATTCAAAAATTAGCCAGGCCTGGTGG CGCATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGG AGAATCATTGAACCTGGGAGGCAGAGTTTGCAGTGAGCCGA GATTGTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTAACGGAGTGAGAG ACTCTGTCTCCAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAAAGAA AAATATAGAAGAAGAACATAAGTCAACCTTTTTCCATGAAA TTATACTGTACTCTAAGGCAAATTCTTGTTGCTTGATCTTAG TAGCTTTTTTATGCATTGACTTAAACCTGGAAGAGTTTCTTA TGAATGTTTGATTGACTGTGAGGTGCATTTGAAACAGCTTCT ACTTTATAACCCTTTGCAGAACTTTCAAGCTCTATTTAGATA ACAATATATATGGGATTAAAATGGAAAATGTGACATATGTC TAGAGAAAGTTCCTTTTTCTGTGTATGTGCCTTTTGTGACTT ATACACTCAGTTTCATTCTAGCCAGCATTTGAGCCTAGAAA ATAGGGAAGTTATGAAAACTCTGTGCCTTATAAGAAGGCAA GGCTATGACTGAGTATTAGACACATAAGTCCAGGGCTGGGC GGAAGTAATGAATCAAATAAAAACTTGGGGAACTTGCCATA GGATGTTTTCTGATTAATATGGGTTTCTCTTCTCTGATTAAT GTGGATTTCAGTTACTCAACTGTGTAACTGAAATCCACATTA ATAAATTGGTTATTTATTGCTTAGGACTTATCTCCCCATAAA GAGACTAAAATTGAGGTTATAAATTATGGGTAGATAGAAAT TCCAGAAATATTTAGGTACCTGTCATATACCTTAAACATAG ATTTTTATCACAATCATTTAGGGGCTTATTTATTGCTTTTACT TTATTTAATGTTTGTCACTGTAGAAGAAAAAAAACTAAATG CTAAATATAACATTTAAAATATTTTCCCCTTCATGACAGCCA CCAATTGATTACTGTCATGGAGACTATCTCTATGTGGATGAC

[1921]

		ACACAGCAGCATTTCAATCACACGCTGTTTCTTTCCGCTACT CAGTTTGCTTTTAGGTTGCCTTAAACAACTTCCTTGGTGAAA AAATCAACTTCAATATTAACCAAAATTTAAAAGATTCATAT ATAGTAAAAGAACTAATATTCGCAGATTGACCCATTCCATT CTTTCAGAGAAGGTATGAGATACTTGACAGTGGAGCTAGCA GCAGAAACAATAACATGTATGATGAATCCCATTGAGTCTTT GCAGTTTATTTTTATTAAAATATTTTAATTGAACAATTTAAG CTTTTTTTCTTCATCAGGATTTCACAAGGGTGTAATCTGCCC AGTTTTATTCTGTCATTTTTTTCAAAACAAA
CD47-206 (N-말단 없음)	서열 번호 133	ATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGA AATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTA AACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAAT TGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGA TGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACT TGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCA TCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATG AAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCT GTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTAAATATAGAT CCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTACTTGTTGCT GGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGAGCCATTCTT TTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCTACTGGCCTT GGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATATTACTTCAC TACTATGTGTTT
CD47-206 (복구된 N-말단 있음)	서열 번호 134	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTT
결실된 TMD3	서열 번호 135	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA

[1922]

		TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT
결실된 EC + TMD3	서열 번호 136	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTC
결실된 TMD2 + EC + TMD3	서열 번호 137	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA
결실된 최종 IC	서열 번호 138	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG

[1923]

		AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATC TTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGTAA
결실된 TMD5 + 최종 IC	서열 번호 139	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCTAA
결실된 EC + TMD5 + 최종 IC	서열 번호 140	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA

[1924]

		CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTGTAA
결실된 TMD4	서열 번호 141	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TAA
CD47 ECD (DAF/CD55 GPI 닻 있음)	서열 번호 142	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAACCAAATAAAGGAAGTGGAACCACTTCAGG TACTACCCGTCTTCTATCTGGGCACACGTGTTTCACGTTGAC AGGTTTGCTTGGGACGCTAGTAACCATGGGCTTGCTGACTT AA
CD47 ECD (긴 TRAILR3- GPI 닻 있음)	서열 번호 143	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG

[1925]

		AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAGCCACTGTGGAAAccccagctgctgaagagacaatgaa caccagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgaacaccagcccggggactcct gccccagctgctgaagagacaatgaccaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagaga caatgaccaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgatcaccagcccggg gactcctgccTCTTCTCATTACCTCTCATGCACCATCGTAGGGATC ATAGTTCTAATTGTGCTTCTGATTGTGTTTGTTTAA
CD47 ECD (짧은 TRAILR3-GPI 닻 있음)	서열 번호 144	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAatgatcaccagcccggggactcctgccTCTTCTCATTACC TCTCATGCACCATCGTAGGGATCATAGTTCTAATTGTGCTTC TGATTGTGTTTGTTTAA
CD47 ECD (CD8a TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 145	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGAC TTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTG CAACCACAGGAACCGAAGATAA
CD47 ECD (CD28 TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 146	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT

[1926]

		CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACTAA
CD47 ECD (PDGFR TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음)	서열 번호 147	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAgtggtgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctcc ctTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTAC TAA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, PDGFR 힌지, TMD 및 짧은 ICD (9aa) 있음	서열 번호 148	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAGCTGTGGGCCAGGACACGC AGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGtggt ggtgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctccctTATCATCCTCATC ATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTACTAA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, IgG4 힌지-CD28 TM	서열 번호 149	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAGaatctaagtacggaccgccctgcccccctt gccctTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGC TATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACTAA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa,	서열 번호 150	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA

[1927]

IgG4 힌지 -CD8a TM		TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAGaatctaagtacggaccgccctgcccccctt gccctATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAACCACAG GAACCGAAGATAA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD28 힌지- CD28 TM	서열 번호 151	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAATTGAAGTTATGTATCCTCC TCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCC ATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCC GGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGG AGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTAT TATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACT AA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD28 힌지- CD8a TM	서열 번호 152	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAATTGAAGTTATGTATCCTCC TCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCC ATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCC GGACCTTCTAAGCCCATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGG GACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTA CTGCAACCACAGGAACCGAAGATAA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD8a 힌지 -CD28 TM	서열 번호 153	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC

[1928]

		TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAACCACGACGCCAGCGCCGC GACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggcgggggggcgcagTGC ACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTTTGGGTGCTG GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTA ACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAG CAGGCTCCTGCACTAA
CD47 IgV, 힌지 영역에서 3aa, CD8a 힌지 -CD8a TM	서열 번호 154	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAAACCACGACGCCAGCGCCGC GACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggcgggggggcgcagTGC ACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGG GCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTG GTTATCACCCTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGATAA
WT, C15G	서열 번호 155	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTG CTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTAAAACACTTA AATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACAATTGCTTTA CTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTCATTGTTGGA GCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGATTGGATTAACC TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTATTGCGGCGTGT ATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATC TTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTATATGAAATTT GTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAGGAAAGC

[1929]

		TGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAAAAGGAA TGATGAATGATGAATAA
N361, C15G	서열 번호 156	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGATGGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N362, C15G	서열 번호 157	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGGCTCCACCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGATACACAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG

[1930]

		GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N363, C15G	서열 번호 158	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCTACCACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGACAAAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N364, C15G	서열 번호 159	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAGCTTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTATGAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG

[1931]

		TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N366, C15G	서열 번호 160	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGACACCACTAAAATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N368, C15G	서열 번호 161	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGTTCCCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTGAGAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG

[1932]

		GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N369, C15G	서열 번호 162	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAACTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTTGGAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3610, C15G	서열 번호 163	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTTCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC

[1933]

		ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3612, C15G	서열 번호 164	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACCACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGACAGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3614, C15G	서열 번호 165	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAAAATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT

[1934]

		AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3617, C15G	서열 번호 166	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3618, C15G	서열 번호 167	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCTACCACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTATTAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT

[1935]

		TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3621, C15G	서열 번호 168	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3623, C15G	서열 번호 169	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATGCCACTAGTTTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGAGTTACAAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT

[1936]

		CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
N3624, C15G	서열 번호 170	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTGGAAATGACACTGTCGTC ATTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTAC TGAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTT ACACCTTTGATGGACAGGTTAACAAGTCCACTGTCCCCACT GACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAA AGGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCT CACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACC AGAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGT TTCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTC CCAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATT AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC AATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGT CATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATT AAAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAG GGATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGA TTGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGG TGATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTA TTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAG GTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTT ATATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCT CCTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGA ATCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N361 돌연변이체	서열 번호 171	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGATGGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTG

[1937]

		ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N362 돌연변이체	서열 번호 172	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGGCTCCACCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGATACACAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N363 돌연변이체	서열 번호 173	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCTACCACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT

[1938]

		GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGACAAAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N364 돌연변이체	서열 번호 174	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAGCTTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTATGAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA

[1939]

hCD47 N366 돌연변이체	서열 번호 175	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGACACCACTAAAATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N368 돌연변이체	서열 번호 176	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGTTCCCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTGAGAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC

[1940]

		CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N369 돌연변이체	서열 번호 177	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAACTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTTGGAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3610 돌연변이체	서열 번호 178	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTTCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTGA CTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAG GAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCA CACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAG AGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTT CATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG

[1941]

		TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3612 돌연변이체	서열 번호 179	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACCACTACTATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGACAGGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3614 돌연변이체	서열 번호 180	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGCCACTACTAAAATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTGCTAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT

[1942]

		GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3617 돌연변이체	서열 번호 181	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGAGACCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3618 돌연변이체	서열 번호 182	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG

[1943]

		GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3621 돌연변이체	서열 번호 183	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAGAGTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3623 돌연변이체	서열 번호 184	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATGCCACTAGTTTTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGAGTTACAAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC

[1944]

		ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
hCD47 N3624 돌연변이체	서열 번호 185	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTTGGCAGATTCCACTAAGATTTAATAAAA CAAAATCTGTAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCA TTCCATGCTTTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACT GAAGTATACGTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTA CACCTTTGATGGACAGGTTAACAAGTCCACTGTCCCCACTG ACTTTAGTAGTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAA GGAGATGCCTCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTC ACACACAGGAAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCA GAGAAGGTGAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTT TCATGGTTTTCTCCAAATGAAAATATTCTTATTGTTATTTTCC CAATTTTTGCTATACTCCTGTTCTGGGGACAGTTTGGTATTA AAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAACA ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTCGTCCCAGGTGAATATTCATTA AAGAATGCTACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGG GATATTAATATTACTTCACTACTATGTGTTTAGTACAGCGAT TGGATTAACCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGT GATAGCCTATATCCTCGCTGTGGTTGGACTGAGTCTCTGTAT TGCGGCGTGTATACCAATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGG TTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAATTACTTGGACTAGTTTA TATGAAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTC CTAGGAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAA TCAAAAGGAATGATGAATGATGAATAA
CAG-CD47 (202) – CodOpt	서열 번호 200	ATGTGGCCCCTGGTCGCCGCCCTGTTGCTGGGCTCGGCTTGC TGCGGATCAGCTCAGCTACTGTTTAATAAAACAAAATCTGT AGAATTCACGTTTTGTAACGACACTGTCGTGATCCCATGCTT TGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACCACTGAAGTGTACG TGAAGTGGAAATTCAAAGGCAGAGACATTTACACCTTTGAC GGCGCCCTCAACAAGTCCACCGTGCCCACTGACTTTAGTAG CGCAAAAATTGAGGTCAGCCAATTACTAAAAGGAGATGCCT CTTTGAAGATGGACAAGAGCGATGCTGTCAGCCACACAGGG AACTACACTTGTGAAGTAACAGAGTTAACCCGCGAAGGTGA AACGATCATCGAGCTGAAGTATCGAGTGGTGTCCTGGTTTT CTCCGAACGAGAATATCCTTATCGTAATTTTCCCAATTTTCG CTATCCTCCTGTTCTGGGGCCAGTTTGGTATCAAGACACTCA

[1945]

		AATATCGGTCCGGTGGGATGGATGAGAAGACAATTGCCCTG CTTGTTGCTGGACTCGTGATCACCGTCATCGTGATTGTTGGG GCCATCCTTTTCGTCCCAGGGGAGTACAGCCTGAAGAATGC TACGGGCCTGGGATTAATTGTGACCTCTACAGGGATACTCA TCCTGCTTCACTACTATGTGTTCAGTACCGCGATTGGACTGA CCTCCTTCGTCATTGCCATATTGGTGATTCAGGTGATAGCCT ACATCCTCGCCGTGGTTGGCCTGAGTCTCTGTATCGCGGCGT GCATACCCATGCATGGCCCTCTTCTGATTTCAGGGTTGAGTA TCCTCGCACTAGCACAGTTGCTGGGACTGGTTTATATGAAA TTTGTGGCCTCCAACCAGAAGACTATACAGCCTCCTAGGAA GGCTGTAGAGGAGCCCCTGAATGCATTCAAGGAATCAAAA GGCATGATGAATGATGAATAA
CD47 ECD-CD59 GPI	서열 번호 341	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCTCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTG TAGAATTCACGTTTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCT TTGTTACTAATATGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATAC GTAAAGTGGAAATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGA TGGAGCTCTAAACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTA GTGCAAAAATTGAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCC TCTTTGAAGATGGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGG AAACTACACTTGTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGT GAAACGATCATCGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTT TCTCCAAATGAACAGCTTGAGAACGGGGGCACATCTCTCTC CGAAAAGACTGTCCTGTTACTGGTGACCCCTTTCTTGGCTGC CGCATGGAGCCTGCACCCCTAA
CAG-CD47 ECD-CD59 GPI	서열 번호 342	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAA TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAG GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTC CGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCC CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCG CGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGC CGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGT GAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC GCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTG AAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGG

[1946]

		AGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAG CGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCT GCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGC GAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGG GGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGG CTGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCA CGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCG CGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGG GGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGC TCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCT GTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAA TCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG TGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTA GCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGA AATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTC CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGAC GGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTT CTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATG TTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGC TGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCCGTT TATTAATTAAGTGAACCGTCAGAGCCACCATGTGGCCCCTG GTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTGCTGCGGATCAGC TCAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGT TTTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATA TGGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAA ATTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAA ACAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATT GAAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGAT GGATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTT GTGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCAT CGAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGA ACAGCTTGAGAACGGGGGCACATCTCTCTCCGAAAAGACTG TCCTGTTACTGGTGACCCCTTTCTTGGCTGCCGCATGGAGCC TGCACCCCTAA

[1947]

[1948] [표 32] CD47 단백질 도메인 및 추가 도메인에 대한 예시적인 아미노산 서열

설명	서열 번호	아미노산 서열
CD47 SP 도메인	서열 번호 20	MWPLVAALLLGSACCGSA
CD47 IgV 도메인	서열 번호 21	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKF KGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKS DAVSHTGNYTCEVTELTREGETII

[1949]

CD47 EC 도메인	서열 번호 22	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKF KGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKS DAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNE
CD47 TM1 도메인	서열 번호 23	NILIVIFPIFAILLFWGQFGI
CD47 IC1 도메인	서열 번호 24	KTLKYRSGGMDEKT
CD47 TM2 도메인	서열 번호 25	IALLVAGLVITVIVIVGAILF
CD47 EC1 도메인	서열 번호 26	VPGEYSLKNA
CD47 TM3 도메인	서열 번호 27	TGLGLIVTSTGILILLHYYVF
CD47 IC2 도메인	서열 번호 28	STAIGLT
CD47 TM4 도메인	서열 번호 29	SFVIAILVIQVIAYILAVVGL
CD47 EC2 도메인	서열 번호 30	SLCIAACIPMHG
CD47 TM5 도메인	서열 번호 31	PLLISGLSILALAQLLGLVYM
CD47(202) IC3 도메인	서열 번호 32	KFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKGMMNDE
CD47(201) IC3 도메인	서열 번호 33	KFVASNQKTIQPPRNN
DAF/CD55 GPI	서열 번호 34	PNKGSGTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT
긴 TRAILR3 GPI (TAPE 반복부 있음)	서열 번호 35	ATVETPAAEETMNTSPGTPAPAAEETMNTSPGTPAPAAEETMT TSPGTPAPAAEETMTTSPGTPAPAAEETMITSPGTPASSHYLSC TIVGIIVLIVLLIVFV
짧은 TRAILR3 GPI (TAPE 반복부 없음)	서열 번호 36	MITSPGTPASSHYLSCTIVGIIVLIVLLIVFV
CD59 GPI	서열 번호 37	QLENGGTSLSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP
CD8a TM 도메인	서열 번호 38	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
CD8a 9AA ICD	서열 번호 39	LYCNHRNRR
CD28 TM 도메인	서열 번호 40	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[1950]

CD28 9AA ICD	서열 번호 41	RSKRSRLLH
PDGFR TM 도메인	서열 번호 42	VVISAILALVVLTIISLIILI
PDGFR 9AA ICD	서열 번호 43	MLWQKKPRY
CD47 3AA 힌지 도메인	서열 번호 44	ELK
CD8a 힌지 도메인	서열 번호 45	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
CD28 힌지 도메인	서열 번호 46	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP
PDGFR 힌지 도메인	서열 번호 47	AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV
IgG4 힌지 도메인	서열 번호 48	ESKYGPPCPPCP

[1951]

[1952] [표 33] CD47 단백질 도메인 및 추가 도메인에 대한 예시적인 뉴클레오티드 서열

설명	서열 번호	뉴클레오티드 서열
CAG 프로모터	서열 번호 49	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAA TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGA CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAG GTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCC TCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCC AGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAG GCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTC CGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCC CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCG CGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGC CGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGT GAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGC GCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTG AAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGG

[1953]

		AGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAG CGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCT GCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGC GAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGG GGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTG CGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGG CTGCAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCA CGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCG CGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGG GGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGCCGGGGAGGGC TCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCT GTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAA TCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG TGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTA GCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGA AATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTC CCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGAC GGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTT CTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATG TTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGC TGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTC
EF1α 프로모터	서열 번호 50	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCG GTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAG AACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTC GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT GGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAG GCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGA GGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGT GGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAG CCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCT GGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACT GGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAG CGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGG CCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTG CGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGG AGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGG GTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCA GCCGTCGCTTCATGTGACTCCACTGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCC

[1954]

		ACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCAC TTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTT TTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
CD47 SP 도메인	서열 번호 51	ATGTGGCCCCTGGTAGCGGCGCTGTTGCTGGGCTCGGCGTG CTGCGGATCAGCT
CD47 IgV 도메인	서열 번호 52	CAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTT TTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATAT GGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAA TTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTG AAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATG GATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTG TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATC
CD47 EC 도메인	서열 번호 53	CAGCTACTATTTAATAAAACAAAATCTGTAGAATTCACGTT TTGTAATGACACTGTCGTCATTCCATGCTTTGTTACTAATAT GGAGGCACAAAACACTACTGAAGTATACGTAAAGTGGAAA TTTAAAGGAAGAGATATTTACACCTTTGATGGAGCTCTAAA CAAGTCCACTGTCCCCACTGACTTTAGTAGTGCAAAAATTG AAGTCTCACAATTACTAAAAGGAGATGCCTCTTTGAAGATG GATAAGAGTGATGCTGTCTCACACACAGGAAACTACACTTG TGAAGTAACAGAATTAACCAGAGAAGGTGAAACGATCATC GAGCTAAAATATCGTGTTGTTTCATGGTTTTCTCCAAATGAA
CD47 TM1 도메인	서열 번호 54	AATATTCTTATTGTTATTTTCCCAATTTTTGCTATACTCCTGT TCTGGGGACAGTTTGGTATT
CD47 IC1 도메인	서열 번호 55	AAAACACTTAAATATAGATCCGGTGGTATGGATGAGAAAAC A
CD47 TM2 도메인	서열 번호 56	ATTGCTTTACTTGTTGCTGGACTAGTGATCACTGTCATTGTC ATTGTTGGAGCCATTCTTTTC
CD47 EC1 도메인	서열 번호 57	GTCCCAGGTGAATATTCATTAAAGAATGCT
CD47 TM3 도메인	서열 번호 58	ACTGGCCTTGGTTTAATTGTGACTTCTACAGGGATATTAATA TTACTTCACTACTATGTGTTT
CD47 IC2 도메인	서열 번호 59	AGTACAGCGATTGGATTAACC
CD47 TM4 도메인	서열 번호 60	TCCTTCGTCATTGCCATATTGGTTATTCAGGTGATAGCCTAT ATCCTCGCTGTGGTTGGACTG
CD47 EC2 도메인	서열 번호 61	AGTCTCTGTATTGCGGCGTGTATACCAATGCATGGC
CD47 TM5 도메인	서열 번호 62	CCTCTTCTGATTTCAGGTTTGAGTATCTTAGCTCTAGCACAA TTACTTGGACTAGTTTATATG
CD47(202) IC3 도메인	서열 번호 63	AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAG GAAAGCTGTAGAGGAACCCCTTAATGCATTCAAAGAATCAA AAGGAATGATGAATGATGAA

[1955]

CD47(201) IC3 도메인	서열 번호 64	AAATTTGTGGCTTCCAATCAGAAGACTATACAACCTCCTAG GAATAAC
DAF/CD55 GPI	서열 번호 65	CCAAATAAAGGAAGTGGAACCACTTCAGGTACTACCCGTCT TCTATCTGGGCACACGTGTTTCACGTTGACAGGTTTGCTTGG GACGCTAGTAACCATGGGCTTGCTGACT
긴 TRAILR3 GPI (TAPE 반복부있음)	서열 번호 66	GCCACTGTGGAAAccccagctgctgaagagacaatgaacaccagcccggggactcct gccccagctgctgaagagacaatgaacaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagaga caatgaccaccagcccggggactcctgccccagctgctgaagagacaatgaccaccagcccgg ggactcctgccccagctgctgaagagacaatgatcaccagcccggggactcctgccTCTTCT CATTACCTCTCATGCACCATCGTAGGGATCATAGTTCTAATT GTGCTTCTGATTGTGTTTGTT
짧은 TRAILR3 GPI (TAPE 반복부 없음)	서열 번호 67	atgatcaccagcccggggactcctgccTCTTCTCATTACCTCTCATGCACCA TCGTAGGGATCATAGTTCTAATTGTGCTTCTGATTGTGTTTG TT
CD59 GPI	서열 번호 68	CAGCTTGAGAACGGGGGCACATCTCTCTCCGAAAAGACTGT CCTGTTACTGGTGACCCCTTTCTTGGCTGCCGCATGGAGCCT GCACCCC
CD8a TM 도메인	서열 번호 69	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTT CTCCTGTCACTGGTTATCACC
CD8a 9AA ICD	서열 번호 70	CTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGA
CD28 TM 도메인	서열 번호 71	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTAT AGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG
CD28 9AA ICD	서열 번호 72	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCAC
PDGFR TM 도메인	서열 번호 73	gtggtgatctcagccatcctggccctggtggtgctcaccatcatctccctTATCATCCTCA TC
PDGFR 9AA ICD	서열 번호 74	ATGCTTTGGCAGAAGAAGCCACGTTAC
CD47 3AA 힌지 도메인	서열 번호 75	GAGCTAAAA
CD8a 힌지 도메인	서열 번호 76	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCA CCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGC CGGCCAgcggcgggggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTC GCCTGTGAT
CD28 힌지 도메인	서열 번호 77	ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAA GAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTT GTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCC
PDGFR 힌지 도메인	서열 번호 78	GCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACA CTCCTTGCCCTTTAAGGtg

[1956]

IgG4 힌지 도메인	서열 번호 79	gaatctaagtacggaccgccctgcccccctttgccct

[1957]

[1958] [표 34] 예시적인 항-SIRPα 항체 아미노산 서열

Ab 도메인	서열 번호	아미노산 서열
VH또는HC	서열 번호186	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSL TSEDTAVYYCARWGAYWGQGTLVTVSA
VL또는LC	서열 번호187	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSS PKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYF CHQWSSYPRTFGAGTKLELK
VH또는HC	서열 번호188	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSL TSEDTAVYYCARWGAYWGQGTLVTVSS
scFv	서열 번호189	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSL TSEDTAVYYCARWGAYWGQGTLVTVSGGGGSGGGGSGGGG SQIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGS SPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASY FCHQWSSYPRTFGAGTKLELK
scFv	서열 번호190	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWYQQKPGSS PKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYF CHQWSSYPRTFGAGTKLELKGTTAASGSSGGSSSGAEVQLQQS GAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYYIHWVQQRTEQGLEWIG RIDPEDGETKYAPKFQDKATITADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAV YYCARWGAYWGQGTLVTVS
VH또는HC	서열 번호191	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYTFTSYWVHWVRQMPG KGLEWIGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSVDKSISTAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS
VL또는LC	서열 번호192	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWYQQ RPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYFCFQGTHVPYTFGGGTKVEIK
VL또는LC	서열 번호193	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSYGNTYLYWFQQ RPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCFQGTHVPYTFGGGTKVEIK
VH또는HC	서열 번호194	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDSDTHYNQKFKDHVTLSVDKSISTAYLQLSS LKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS
VH또는HC	서열 번호195	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLSS LKASDTAMYYCVRGGTGTMAWFAYWGQGTLVTVSS

[1959]

VH또는HC	서열 번호196	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLSS LKASDTAMYYCVRGGTGTLAWFAYWGQGTLVTVSS
VH또는HC	서열 번호197	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLSS LKASDTAMYYCVRGGTGTMAYFAYWGQGTLVTVSS
VH또는HC	서열 번호198	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSFTSYWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSFQGHVTLSVDKSISTAYLQLSS LKASDTAMYYCVRGGTGTLAYFAYWGQGTLVTVSS

[1960]

[1961] 소정의 구현예

[1962] 구현예 I-1. 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부,

[1963] 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및

[1964] 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하되, 여기서 결실은 18개 아미노산의 C-말단 결실이 아닌, 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질

[1965] 구현예 I-2. 인간 CD47 세포외 도메인의 일부,

[1966] 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및

[1967] 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질.

[1968] 구현예 I-3. 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부,

[1969] 적어도 한 개 및 5 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이의 일부, 및

[1970] 18개 아미노산의 C-말단 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인의 일부를 포함하는 조작된 CD47 단백질.

[1971] 구현예 I-4. 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부,

[1972] 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부, 및

[1973] 신호 펩티드

[1974] 를 포함하고, 세포내 도메인을 포함하지 않는 조작된 CD47 단백질.

[1975] 구현예 I-5. 인간 CD47 세포외 도메인, 및

[1976] 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부

[1977] 를 포함하고, 세포내 도메인을 포함하지 않는 조작된 CD47 단백질.

[1978] 구현예 I-6. 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및

[1979] 적어도 1개 및 5 개 미만의 인간 CD47 막관통 도메인(들) 또는 이들의 일부(들)을 포함하고, 세포내 도메인을 포함하지 않는 조작된 CD47 단백질.

[1980] 구현예 I-7. 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부, 및

[1981] 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인 또는 이의 일부,

[1982] 세포내 도메인이 없거나, 적어도 하나의 아미노산의 결실을 포함하는 인간 CD47 세포내 도메인을 포함하고, 서열 번호 1 및 서열 번호 6과 최대 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 조작된 CD47 단백질.

[1983] 구현예 I-8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형 부위를 포함하는 조작된 CD47 단백질.

[1984] 구현예 I-9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 조작된 CD47 단백질은 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형을 포함하는 조작된 CD47 단백질.

[1985] 구현예 I-10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 2개 미만의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 설페이트 글리코사미노글리칸 변형 부위를 포함하는 조작된 CD47 단백질.

[1986] 구현예 I-11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 2개 미만의 헤파란 및/또는 콘드로이틴 설페이트 글리코사미노글리칸 사슬을 포함하는 조작된 CD47 단백질.

[1987] 구현예 I-12. 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 5개 미만의 N-글리코실화 변형 부위를 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[1988] 구현예 I-13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 4개 미만의 N-글리코실화 변형 사슬을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[1989] 구현예 I-14. 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부는 야생형 인간 CD47 단백질과 비교하여 하나 이상의 트롬보스폰딘-1 결합 부위(들)을 결여한, 조작된 CD47 단백질.

[1990] 구현예 I-15. 구현예 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부는 야생형 인간 CD47 단백질과 비교하여 하나 이상의 인테그린 결합 부위(들)을 결여한, 조작된 CD47 단백질.

[1991] 구현예 I-16. 구현예 15에 있어서, 인테그린은 αvβ3 인테그린, αIIbβ3 인테그린, α2β1 인테그린, α4β1 인테그린, α6β1 인테그린, 및 α5 인테그린으로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 CD47 단백질.

[1992] 구현예 I-17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 세포외 도메인 또는 이의 일부가 적어도 하나의 SIRPα 상호작용 모티프를 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[1993] 구현예 I-18. 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 인간 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부 내의 시스테인과 인간 CD47 막관통 도메인(들) 내 또는 사이의 시스테인 간의 이황화 결합을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[1994] 구현예 I-19. 구현예 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 조작된 CD47 단백질은 관용원성 인자인, 조작된 CD47 단백질.

[1995] 구현예 I-20. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 조작된 CD47 단백질은 막관통 단백질인, 조작된 CD47 단백질.

[1996] 구현예 I-21. 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 인간 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 19-141과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[1997] 구현예 I-22. 구현예 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 인간 CD47 막관통 도메인(들)은 서열 번호 2의 아미노산 142-162와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열,

[1998] 서열 번호 2의 아미노산 177-197과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열,

[1999] 서열 번호 2의 아미노산 208-228과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열,

[2000] 서열 번호 2의 아미노산 236-257과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및

[2001] 서열 번호 2의 아미노산 269-289와 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2002] 구현예 I-23. 구현예 1 내지 3, 7 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 인간 CD47 세포내 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 290-323의 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2003] 구현예 I-24. 구현예 1, 7 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 7에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2004] 구현예 I-25. 구현예 1, 7 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 8에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2005] 구현예 I-26. 구현예 1, 7 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 9에 개시된 아미노산 서열과 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2006] 구현예 I-27. 구현예 1, 7 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 12에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2007] 구현예 I-28. 구현예 1, 7 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 10에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2008] 구현예 I-29. 구현예 1, 7 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 11에 개시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 CD47 단백질.

[2009] 구현예 I-30. 구현예 1 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 CD47 단백질은 조작된 인간 CD47 단백질, 조작된 인간화 CD47 단백질, 또는 조작된 부분적 인간화 CD47 단백질인 조작된 CD47 단백질.

[2010] 구현예 I-31. 구현예 1 내지 30 중 어느 한 항의 조작된 CD47 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

[2011] 구현예 I-32. 구현예 31의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

[2012] 구현예 I-33. 구현예 32에 있어서, 벡터는 다중시스트론성 벡터인 벡터.

[2013] 구현예 I-34. 구현예 33에 있어서, 다중시스트론성 벡터는 이중시스트론성 벡터 또는 삼중시스트론성 벡터인, 벡터.

[2014] 구현예 I-35. 구현예 32 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터인 벡터.

[2015] 구현예 I-36. 구현예 35에 있어서, 바이러스 벡터는 위형의, 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

[2016] 구현예 I-37. 구현예 31의 폴리뉴클레오티드 및/또는 구현예 32 내지 36의 중 어느 하나의 벡터를 포함하는 세포.

[2017] 구현예 I-38. 구현예 1 내지 30 중 어느 하나의 조작된 CD47 단백질을 포함하는 세포.

[2018] 구현예 I-39. 구현예 37 또는 38에 있어서, 줄기 세포인 세포.

[2019] 구현예 I-40. 구현예 39에 있어서, 줄기 세포는 만능 줄기 세포인, 세포.

[2020] 구현예 I-41. 구현예 40에 있어서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[iPSC] 또는 배아 줄기 세포인, 세포.

[2021] 구현예 I-42. 구현예 37 또는 38에 있어서, 세포는 췌장 섬 세포인 세포.

[2022] 구현예 I-43. 구현예 42에 있어서, 세포는 일차 췌장 섬 세포인 세포.

[2023] 구현예 I-44. 구현예 42에 있어서, 췌장 섬 세포는 만능 줄기 세포에서 분화된, 세포.

[2024] 구현예 I-45. 구현예 44에 있어서, 만능 줄기 세포는 iPSC 또는 ESC인, 세포.

[2025] 구현예 I-46. 구현예 37 또는 38에 있어서, 세포는 T 세포인 세포.

[2026] 구현예 I-47. 구현예 46에 있어서, T 세포는 일차 T 세포인 세포.

[2027] 구현예 I-48. 구현예 47에 있어서, 일차 T 세포는 키메라 항원 수용체[CAR]을 포함하는 T 세포인, 세포.

[2028] 구현예 I-49. 구현예 48에 있어서, T 세포는 CAR-T 세포인, 세포.

[2029] 구현예 I-50. 구현예 46에 있어서, T 세포는 만능 줄기 세포에서 분화된, 세포.

[2030] 구현예 I-51. 구현예 50에 있어서, 만능 줄기 세포는 iPSC 또는 ESC인, 세포.

[2031] 구현예 I-52. 구현예 37 또는 38에 있어서, 세포는 줄기 세포, 췌장 섬 세포, T 세포, CAR-T 세포, 심장 세포, 심장 전구세포, 신경 세포, 신경아교 전구세포, 내피 세포, B 세포, 망막 색소 상피 세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 혈액 세포, 형질 세포, 혈소판, 신장 세포, 상피 세포, 자연 살해 세포[NK 세포], 및 CAR-NK 세포로 이루어진 군에서 선택되는, 세포.

[2032] 구현예 I-53. 구현예 52에 있어서, 세포는 일차 세포인 세포.

[2033] 구현예 I-54. 구현예 52에 있어서, 세포는 분화된 세포인 세포.

[2034] 구현예 I-55. 구현예 37 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 세포는 저면역원성 세포인 세포.

[2035] 구현예 I-56. 구현예 37 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 주조직적합성[MHC] 클래스 I 단백질 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 단백질의 발현은 야생형 또는 대조군 세포와 비교하여 감소된, 세포.

[2036] 구현예 I-57. 구현예 37 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 단백질 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 단백질을 발현하지 않는 세포.

[2037] 구현예 I-58. 구현예 56 또는 57에 있어서, MHC 단백질은 HLA 단백질인, 세포.

[2038] 구현예 I-59. 구현예 56 내지 58 중 어느 하나에 있어서, MHC 클래스 I 단백질의 발현은 녹아웃시키거나 B2M의

발현을 감소시켜서 감소되는, 세포.

[2039] 구현예 I-60. 구현예 56 내지 58 중 어느 하나에 있어서, MHC 클래스 II 단백질의 발현은 녹아웃시키거나 CIITA의 발현을 감소시켜서 감소되는, 세포.

[2040] 구현예 I-61. 구현예 41, 45 내지 55 중 어느 하나에 있어서, TRAC 및/또는 TRBC는 녹아웃되거나, 이들의 발현이 감소되는, 세포.

[2041] 구현예 I-62. 구현예 37 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 세포를 생성하기 위한 출발 재료는 야생형 세포 및/또는 대조군 세포를 포함하는, 세포.

[2042] 구현예 I-63. 구현예 1 내지 30 중 어느 하나의 조작된 CD47 단백질을 포함하는 조성물.

[2043] 구현예 I-64. 구현예 37 내지 62 중 어느 하나의 세포를 포함하는 조성물.

[2044] 구현예 II-1. 조작된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물로서,

[2045] (a) 하나 이상의 세포외 도메인, 및

[2046] (b) 하나 이상의 막 테더(tether)를 포함하되,

[2047] 하나 이상의 세포외 도메인은 신호 조절 단백질 알파[SIRPα] 상호작용 모티프를 포함하는, 핵산 작제물.

[2048] 구현예 II-1a. 구현예 1에 있어서, 핵산 작제물은 하나 이상의 전장 CD47 세포내 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하지 않는, 핵산 작제물.

[2049] 구현예 II-2. 구현예 1에 있어서, SIRPα 상호작용 모티프는 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2050] 구현예 II-3. 구현예 2에 있어서, CD47 세포외 도메인은 CD47 면역글로불린 가변[IgV] 유사 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2051] 구현예 II-4. 구현예 1 또는 2에 있어서, CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 세포외 도메인.

[2052] 구현예 II-5. 구현예 2 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 52와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2053] 구현예 II-6. 구현예 2 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 53과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2054] 구현예 II-7. 구현예 2 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2055] 구현예 II-8. 구현예 2 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2056] 구현예 II-9. 구현예 1에 있어서, SIRPα 상호작용 모티프는 SIRPα 항체 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2057] 구현예 II-10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2058] 구현예 II-11. 구현예 10에 있어서, 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2059] 구현예 II-12. 구현예 10 또는 11에 있어서, 막관통 도메인은 CD47 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2060] 구현예 II-13. 구현예 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 54와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2061] 구현예 II-14. 구현예 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한

핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2062] 구현예 II-15. 구현예 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 58과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2063] 구현예 II-16. 구현예 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2064] 구현예 II-17. 구현예 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2065] 구현예 II-18. 구현예 10 또는 11에 있어서, 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2066] 구현예 II-19. 구현예 10, 11 또는 18에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 69와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2067] 구현예 II-20. 구현예 10 또는 11에 있어서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2068] 구현예 II-21. 구현예 10, 11 또는 20에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 71과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2069] 구현예 II-22. 구현예 10 또는 11에 있어서, 막관통 도메인은 PDGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2070] 구현예 II-23. 구현예 10, 11 또는 22에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 73과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2071] 구현예 II-24. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 막 테더는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2072] 구현예 II-25. 구현예 24에 있어서, GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻, TRAILR3 GPI 닻, 또는 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2073] 구현예 II-26. 구현예 24 또는 25에 있어서, GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2074] 구현예 II-27. 구현예 24 내지 26 중 어느 하나에 있어서, DAF/CD55 GPI 닻은 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2075] 구현예 II-28. 구현예 24 또는 25에 있어서, GPI 닻은 TRAILR3 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2076] 구현예 II-29. 구현예 24, 25, 또는 28 중 어느 하나에 있어서, TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2077] 구현예 II-30. 구현예 24, 25, 또는 28 중 어느 하나에 있어서, TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2078] 구현예 II-31. 구현예 24 또는 25에 있어서, GPI 닻은 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2079] 구현예 II-32. 구현예 24, 25, 또는 31 중 어느 하나에 있어서, CD59 GPI 닻은 서열 번호 68과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2080] 구현예 II-33. 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 제어 서열을 더 포함하는 핵산 작제물.

[2081] 구현예 II-34. 구현예 33에 있어서, 하나 이상의 제어 서열은 세포외 신호 펩티드를 암호화하는, 핵산 작제물.

[2082] 구현예 II-35. 구현예 33 또는 34에 있어서, 세포외 신호 펩티드는 서열 번호 51과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2083] 구현예 II-36. 구현예 33에 있어서, 하나 이상의 제어 서열은 프로모터를 포함하는, 핵산 작제물.

[2084] 구현예 II-37. 구현예 36에 있어서, 프로모터는 항구적 프로모터 또는 유도성 프로모터인, 핵산 작제물.

[2085] 구현예 II-38. 구현예 36 또는 37에 있어서, 프로모터는 자연 발생 프로모터, 혼성 프로모터, 또는 합성 프로모

터인, 핵산 작제물.

[2086] 구현예 II-39. 구현예 36 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, CAG 프로모터, 유비퀴틴/S27a 프로모터, SV40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, RSV 프로모터, MMTV 프로모터, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 긴 말단 반복 영역, CMV 프로모터, 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 열충격 프로모터, 폴리오마 바이러스 프로모터, 계두 바이러스 프로모터, 소 유두종 바이러스 프로모터, 조류 육종 바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터, B형 간염 바이러스 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[EBV] 프로모터, 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터, U6 프로모터, 또는 UBC 프로모터거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2087] 구현예 II-40. 구현예 36-39 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 CAG 프로모터거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2088] 구현예 II-41. 구현예 36 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 서열 번호 49와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 작제물.

[2089] 구현예 II-42. 구현예 36 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 EF1α 프로모터거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2090] 구현예 II-43. 구현예 36 내지 40, 또는 42 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 서열 번호 50과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 작제물.

[2091] 구현예 II-44. 구현예 33에 있어서, 하나 이상의 제어 서열은 리보솜 결합 부위, 인핸서 요소, 활성자 요소, 번역 개시 서열, 번역 종결 서열, 전사 개시 서열, 전사 종결 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 복제 요소, RNA 처리 및 유출 요소, 전위인자 서열, 전위효소 서열, 절연체 서열, 내부 리보솜 진입 부위[IRES], 5'UTR, 3'UTR, mRNA 3' 말단 처리 서열, 경계 요소, 좌위 조절 영역[LCR], 기질 부착 영역[MAR], 재조합 또는 카세트 교환 서열, 링커 서열, 분비 신호, 내성 마커, 고정 펩티드, 국재화 신호, 융합 태그, 친화도 태그, 샤페로닌, 단백질 분해효소 또는 이들의 조합을 포함하는, 핵산 작제물.

[2092] 구현예 II-45. 구현예 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 세포외 도메인은 세포외 힌지 도메인을 더 포함하는, 핵산 작제물.

[2093] 구현예 II-46. 구현예 45에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지, CD8a 힌지, CD28 힌지, PDGFR 힌지, 또는 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2094] 구현예 II-47. 구현예 45 또는 46에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2095] 구현예 II-48. 구현예 45 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 75와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2096] 구현예 II-49. 구현예 45 또는 46에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD8a 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2097] 구현예 II-50. 구현예 45, 46, 또는 49에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 76과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2098] 구현예 II-51. 구현예 45 또는 46에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD28 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2099] 구현예 II-52. 구현예 45, 46, 또는 7f51에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 77과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2100] 구현예 II-53. 구현예 45 또는 46에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 PDGFR 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2101] 구현예 II-54. 구현예 45, 46, 또는 53 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 78과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2102] 구현예 II-55. 구현예 45 또는 46에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2103] 구현예 II-56. 구현예 45, 46, 또는 55에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 79와 적어도 80% 동일한 핵

산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2104] 구현예 II-57. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 더 포함하는, 핵산 작제물.

[2105] 구현예 II-58. 구현예 57에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2106] 구현예 II-59. 구현예 57 또는 58에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2107] 구현예 II-60. 구현예 57 또는 58에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2108] 구현예 II-61. 구현예 57 또는 58에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 63과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2109] 구현예 II-62. 구현예 57 또는 58에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 64와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2110] 구현예 II-63. 구현예 57에 있어서, 세포내 도메인은 CD8a 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2111] 구현예 II-64. 구현예 57 또는 63에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2112] 구현예 II-65. 구현예 57에 있어서, 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2113] 구현예 II-66. 구현예 57 또는 58에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2114] 구현예 II-67. 구현예 57에 있어서, 세포내 도메인은 PDGFR 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 핵산 작제물.

[2115] 구현예 II-68. 구현예 57 또는 67에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 핵산 작제물.

[2116] 구현예 II-69. 구현예 57 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는, 핵산 작제물.

[2117] 구현예 II-70. 구현예 57 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 결실을 포함하는, 핵산 작제물.

[2118] 구현예 II-71. 구현예 57 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 삽입을 포함하는, 핵산 작제물.

[2119] 구현예 II-72. 구현예 57 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 변경된 기능을 포함하는, 핵산 작제물.

[2120] 구현예 II-73. 구현예 57 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 감소된 기능을 포함하는, 핵산 작제물.

[2121] 구현예 II-74. 구현예 57 내지 73 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 CD47 세포내 신호전달을 감소된 수준으로 포함하는, 핵산 작제물.

[2122] 구현예 II-75. 구현예 57 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 비기능성 세포내 도메인을 포함하는, 핵산 작제물.

[2123] 구현예 II-76. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 표 31에서 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2124] 구현예 II-77. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함

하는 핵산 작제물.

[2125] 구현예 II-78. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2126] 구현예 II-79. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2127] 구현예 II-80. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 133과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2128] 구현예 II-81. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 134와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2129] 구현예 II-82. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 135와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2130] 구현예 II-83. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 136과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2131] 구현예 II-84. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 137과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2132] 구현예 II-85. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 138과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2133] 구현예 II-86. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 139와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2134] 구현예 II-87. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 140과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2135] 구현예 II-88. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 141과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2136] 구현예 II-89. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 142와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2137] 구현예 II-90. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 143과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2138] 구현예 II-91. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 144와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2139] 구현예 II-92. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 145와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2140] 구현예 II-93. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 146과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2141] 구현예 II-94. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 147과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2142] 구현예 II-95. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 148과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2143] 구현예 II-96. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 149와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2144] 구현예 II-97. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 150과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2145] 구현예 II-98. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 151과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서

열을 포함하는 핵산 작제물.

[2146] 구현예 II-99. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 152와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2147] 구현예 II-100. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 153과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2148] 구현예 II-101. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 154와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2149] 구현예 II-102. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 155와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2150] 구현예 II-103. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 156과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2151] 구현예 II-104. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 157과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2152] 구현예 II-105. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 158과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2153] 구현예 II-106. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 159와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2154] 구현예 II-107. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 160과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2155] 구현예 II-108. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 161과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2156] 구현예 II-109. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 162와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2157] 구현예 II-110. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 163과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2158] 구현예 II-111. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 164와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2159] 구현예 II-112. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 165와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2160] 구현예 II-113. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 166과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2161] 구현예 II-114. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 167과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2162] 구현예 II-115. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 168과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2163] 구현예 II-116. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 169와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2164] 구현예 II-117. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 170과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2165] 구현예 II-118. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 171과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2166] 구현예 II-119. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 172와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서

열을 포함하는 핵산 작제물.

[2167] 구현예 II-120. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 173과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2168] 구현예 II-121. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 174와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2169] 구현예 II-122. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 175와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2170] 구현예 II-123. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 176과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2171] 구현예 II-124. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 177과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2172] 구현예 II-125. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 178과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2173] 구현예 II-126. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 179와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2174] 구현예 II-127. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 180과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2175] 구현예 II-128. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 181과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2176] 구현예 II-129. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 182와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2177] 구현예 II-130. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 183과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2178] 구현예 II-131. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 184와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2179] 구현예 II-132. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 185와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2180] 구현예 II-133. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 341과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2181] 구현예 II-134. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 342와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2182] 구현예 II-135. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 표 33에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2183] 구현예 II-136. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 표 33 및/또는 표 31에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2184] 구현예 II-137. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2185] 구현예 II-138. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2186] 구현예 II-139. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2187] 구현예 II-140. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산

서열을 포함하는 핵산.

[2188] 구현예 II-141. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 핵산 작제물.

[2189] 구현예 II-142. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2190] 구현예 II-143. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 및 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2191] 구현예 II-144. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 및 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2192] 구현예 II-145. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 및 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2193] 구현예 II-146. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 및 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2194] 구현예 II-147. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 및 서열 번호 61과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2195] 구현예 II-148. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 및 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2196] 구현예 II-149. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 및 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2197] 구현예 II-150. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2198] 구현예 II-151. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 53, 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2199] 구현예 II-152. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2200] 구현예 II-153. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 핵산 작제물.

[2201] 구현예 II-154. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2202] 구현예 II-155. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2203] 구현예 II-156. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2204] 구현예 II-157. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 53, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2205] 구현예 II-158. 구현예 1 내지 8k 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2206] 구현예 II-159. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 53, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2207] 구현예 II-160. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2208] 구현예 II-161. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 53, 서열 번호 73, 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2209] 구현예 II-162. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73, 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2210] 구현예 II-163. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73, 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2211] 구현예 II-164. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2212] 구현예 II-165. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2213] 구현예 II-166. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2214] 구현예 II-167. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2215] 구현예 II-168. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2216] 구현예 II-169. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2217] 구현예 II-170. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2218] 구현예 II-171. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2219] 구현예 II-172. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2220] 구현예 II-173. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71, 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2221] 구현예 II-174. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2222] 구현예 II-175. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2223] 구현예 II-176. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 49 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2224] 구현예 II-177. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 50 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2225] 구현예 II-178. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2226] 구현예 II-179. 구현예 1 내지 178 중 어느 하나의 핵산 작제물을 포함하는 벡터.

[2227] 구현예 II-180. 구현예 179에 있어서, 상기 벡터는 다중시스트론성 벡터인 벡터.

[2228] 구현예 II-181. 구현예 180에 있어서, 다중시스트론성 벡터는 이중시스트론성 벡터 또는 삼중시스트론성 벡터인, 벡터.

[2229] 구현예 II-182. 구현예 179 내지 181 중 어느 하나에 있어서, 플라스미드 또는 바이러스 벡터인 벡터.

[2230] 구현예 II-183. 구현예 182에 있어서, 바이러스 벡터는 위형[pseudotyped]의, 자기 불활성화 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

[2231] 구현예 II-184. 구현예 1 내지 178 중 어느 하나의 핵산 작제물에 의해 암호화되는 조작된 단백질.

[2232] 구현예 II-185. 조작된 단백질로서,

[2233] (a) 하나 이상의 세포외 도메인, 및

[2234] (b) 하나 이상의 막 테더를 포함하되,

[2235] 하나 이상의 세포외 도메인은 신호 조절 단백질 알파[SIRPα] 상호작용 모티프를 포함하는, 조작된 단백질.

[2236] 구현예 II-185a. 구현예 185에 있어서, 조작된 단백질은 하나 이상의 전장 CD47 세포내 도메인을 포함하지 않는, 조작된 단백질.

[2237] 구현예 II-186. 구현예 185에 있어서, SIRPα 상호작용 모티프는 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2238] 구현예 II-187. 구현예 186에 있어서, CD47 세포외 도메인은 CD47 면역글로불린 가변[IgV] 유사 도메인인, 조작된 단백질.

[2239] 구현예 II-188. 구현예 185 또는 186에 있어서, CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 세포외 도메인인, 조작된 단백질.

[2240] 구현예 II-189. 구현예 186 내지 188 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 21과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2241] 구현예 II-190. 구현예 186 내지 188 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 22와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2242] 구현예 II-191. 구현예 186 내지 188 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 26과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2243] 구현예 II-192. 구현예 186 내지 188 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 서열 번호 30과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2244] 구현예 II-193. 구현예 185에 있어서, SIRPα 상호작용 모티프는 SIRPα 항체 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2245] 구현예 II-194. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 186과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2246] 구현예 II-195. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 187과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2247] 구현예 II-196. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 188과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2248] 구현예 II-197. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 189와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2249] 구현예 II-198. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 190과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2250] 구현예 II-199. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 191과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2251] 구현예 II-200. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 192와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2252] 구현예 II-201. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 193과 적어도 80% 동일한 아미

노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2253] 구현예 II-202. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 194와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2254] 구현예 II-203. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 195와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2255] 구현예 II-204. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 196과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2256] 구현예 II-205. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 197과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2257] 구현예 II-206. 구현예 193에 있어서, SIRPα 항체 또는 이의 일부는 서열 번호 198과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2258] 구현예 II-207. 구현예 185 내지 193 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2259] 구현예 II-208. 구현예 207에 있어서, 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2260] 구현예 II-209. 구현예 207 또는 208에 있어서, 막관통 도메인은 CD47 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2261] 구현예 II-210. 구현예 207 내지 209 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 23과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2262] 구현예 II-211. 구현예 207 내지 209 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 25와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2263] 구현예 II-212. 구현예 207 내지 209 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 27과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2264] 구현예 II-213. 구현예 207 내지 209 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 29와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2265] 구현예 II-214. 구현예 207 내지 209 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 31과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2266] 구현예 II-215. 구현예 207 또는 208에 있어서, 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2267] 구현예 II-216. 구현예 207, 208 또는 215에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 38과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2268] 구현예 II-217. 구현예 207 또는 208에 있어서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2269] 구현예 II-218. 구현예 207, 208 또는 217에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 40과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2270] 구현예 II-219. 구현예 207 또는 208에 있어서, 막관통 도메인은 PDGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2271] 구현예 II-220. 구현예 207, 208 또는 219에 있어서, 막관통 도메인은 서열 번호 42와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2272] 구현예 II-221. 구현예 85 내지 193 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 막 테더는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2273] 구현예 II-222. 구현예 221에 있어서, GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻, TRAILR3 GPI 닻, 또는 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2274] 구현예 II-223. 구현예 221 또는 222에 있어서, GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2275] 구현예 II-224. 구현예 221 내지 223 중 어느 하나에 있어서, DAF/CD55 GPI 닻은 서열 번호 34와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2276] 구현예 II-225. 구현예 221 또는 222에 있어서, GPI 닻은 TRAILR3 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2277] 구현예 II-226. 구현예 221, 222, 또는 225 중 어느 하나에 있어서, TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 35와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2278] 구현예 II-227. 구현예 221, 222, 또는 225 중 어느 하나에 있어서, TRAILR3 GPI 닻은 서열 번호 36과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2279] 구현예 II-228. 구현예 221 또는 222에 있어서, GPI 닻은 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2280] 구현예 II-229. 구현예 221, 222, 또는 228 중 어느 하나에 있어서, CD59 GPI 닻은 서열 번호 37과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2281] 구현예 II-230. 구현예 185 내지 221 중 어느 하나에 있어서, 세포외 신호 펩티드를 더 포함하는 조작된 단백질.

[2282] 구현예 II-231. 구현예 230에 있어서, 세포외 신호 펩티드는 서열 번호 20과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 조작된 단백질.

[2283] 구현예 II-232. 구현예 185 내지 231 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 세포외 도메인은 세포외 힌지 도메인를 더 포함하는, 조작된 단백질.

[2284] 구현예 II-233. 구현예 232에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지, CD8a 힌지, CD28 힌지, PDGFR 힌지, 또는 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2285] 구현예 II-234. 구현예 232 또는 17a 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2286] 구현예 II-235. 구현예 232 내지 234 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 44와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2287] 구현예 II-236. 구현예 232 또는 233에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD8a 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2288] 구현예 II-237. 구현예 232, 233, 또는 236에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 45와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2289] 구현예 II-238. 구현예 232 또는 233에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD28 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2290] 구현예 II-239. 구현예 232, 233, 또는 238 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 46과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2291] 구현예 II-240. 구현예 232 또는 233에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 PDGFR 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2292] 구현예 II-241. 구현예 232, 233, 또는 240에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 서열 번호 47과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2293] 구현예 II-242. 구현예 232 또는 233 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2294] 구현예 II-243. 구현예 232, 233, 또는 242에 있어서, 세포외 힌지 도메인 서열 번호 48과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2295] 구현예 II-244. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인을 더 포함하는 조작된 단백질.

[2296] 구현예 II-245. 구현예 244에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2297] 구현예 II-246. 구현예 244 또는 245에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 24와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2298] 구현예 II-247. 구현예 244 또는 245에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 28과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2299] 구현예 II-248. 구현예 244 또는 245에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 32와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2300] 구현예 II-249. 구현예 244 또는 245에 있어서, 세포내 도메인 서열 번호 33과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2301] 구현예 II-250. 구현예 244에 있어서, 세포내 도메인은 CD8a 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2302] 구현예 II-251. 구현예 244 또는 250에 있어서, 세포내 도메인 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2303] 구현예 II-252. 구현예 244에 있어서, 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2304] 구현예 II-253. 구현예 244 또는 245에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2305] 구현예 II-254. 구현예 244에 있어서, 세포내 도메인은 PDGFR 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 조작된 단백질.

[2306] 구현예 II-255. 구현예 244 또는 254에 있어서, 세포내 도메인은 서열 번호 43과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 단백질.

[2307] 구현예 II-256. 구현예 244 또는 255에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는, 조작된 단백질.

[2308] 구현예 II-257. 구현예 244 내지 256 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 결실을 포함하는, 조작된 단백질.

[2309] 구현예 II-258. 구현예 244 내지 256 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 삽입을 포함하는, 조작된 단백질.

[2310] 구현예 II-259. 구현예 244 내지 258 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 변경된 기능을 포함하는, 조작된 단백질.

[2311] 구현예 II-260. 구현예 244 내지 259 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 감소된 기능을 포함하는, 조작된 단백질.

[2312] 구현예 II-261. 구현예 244 내지 260 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 CD47 세포내 신호전달을 감소된 수준으로 포함하는, 조작된 단백질.

[2313] 구현예 II-262. 구현예 244 내지 261 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 비기능성 세포내 도메인을 포함하는, 조작된 단백질.

[2314] 구현예 II-263. 구현예 185 내지 262 중 어느 하나에 있어서, 표 30에서 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2315] 구현예 II-264. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 1과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2316] 구현예 II-265. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 2와 적어도 80% 동일한 아미노산 서열

을 포함하는 조작된 단백질.

[2317] 구현예 II-266. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 6과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2318] 구현예 II-267. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 80과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2319] 구현예 II-268. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 81과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2320] 구현예 II-269. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 82와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2321] 구현예 II-270. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 83과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2322] 구현예 II-271. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 84와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2323] 구현예 II-272. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 85와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2324] 구현예 II-273. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 86과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2325] 구현예 II-274. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 87과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2326] 구현예 II-275. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 88과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2327] 구현예 II-276. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 89와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2328] 구현예 II-277. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 90과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2329] 구현예 II-278. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 91과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2330] 구현예 II-279. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 92와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2331] 구현예 II-280. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 93과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2332] 구현예 II-281. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 94와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2333] 구현예 II-282. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 95와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2334] 구현예 II-283. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 96과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2335] 구현예 II-284. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 97과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2336] 구현예 II-285. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 98과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2337] 구현예 II-286. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 99와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드

서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2338] 구현예 II-287. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 100과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2339] 구현예 II-288. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 101과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2340] 구현예 II-289. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 102와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2341] 구현예 II-290. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 103과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2342] 구현예 II-291. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 104와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2343] 구현예 II-292. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 105와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2344] 구현예 II-293. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 106과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2345] 구현예 II-294. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 107과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2346] 구현예 II-295. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 108과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2347] 구현예 II-296. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 109와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2348] 구현예 II-297. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 110과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2349] 구현예 II-298. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 111과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2350] 구현예 II-299. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 112와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2351] 구현예 II-300. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 113과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2352] 구현예 II-301. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 114와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2353] 구현예 II-302. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 115와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2354] 구현예 II-303. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 116과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2355] 구현예 II-304. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 117과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2356] 구현예 II-305. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 118과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2357] 구현예 II-306. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 119와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2358] 구현예 II-307. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 120과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드

서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2359] 구현예 II-308. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 121과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2360] 구현예 II-309. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 122와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2361] 구현예 II-310. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 123과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2362] 구현예 II-311. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 124와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2363] 구현예 II-312. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 125과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2364] 구현예 II-313. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 126과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2365] 구현예 II-314. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 127과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2366] 구현예 II-315. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 128과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2367] 구현예 II-316. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 129와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2368] 구현예 II-317. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 130과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2369] 구현예 II-318. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 131과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2370] 구현예 II-319. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 132와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2371] 구현예 II-320. 구현예 185 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 340과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 작제물.

[2372] 구현예 II-321. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 표 32에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2373] 구현예 II-322. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 표 32 및/또는 표 30에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2374] 구현예 II-323. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 및 서열 번호 26과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2375] 구현예 II-324. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 및 서열 번호 25와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2376] 구현예 II-325. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23 및 서열 번호 24와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2377] 구현예 II-326. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 서열 번호 30 및 서열 번호 31과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2378] 구현예 II-327. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열

번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 및 서열 번호 30과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2379] 구현예 II-328. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 및 서열 번호 29와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2380] 구현예 II-329. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 23, 서열 번호 24, 서열 번호 25, 서열 번호 26, 서열 번호 27, 및 서열 번호 28과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2381] 구현예 II-330. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 22 및 서열 번호 34와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2382] 구현예 II-331. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 22 및 서열 번호 35와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2383] 구현예 II-332. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 22 및 서열 번호 36과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2384] 구현예 II-333. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 22, 서열 번호 38, 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2385] 구현예 II-334. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 22, 서열 번호 40, 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2386] 구현예 II-335. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 22, 서열 번호 42, 및 서열 번호 43과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2387] 구현예 II-336. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 47, 서열 번호 42 및 서열 번호 43과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2388] 구현예 II-337. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 48, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2389] 구현예 II-338. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 48, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2390] 구현예 II-339. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 46, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2391] 구현예 II-340. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 46, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2392] 구현예 II-341. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 45, 서열 번호 40 및 서열 번호 41과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2393] 구현예 II-342. 구현예 185 내지 255 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 21, 서열 번호 45, 서열 번호 38 및 서열 번호 39와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 단백질.

[2394] 구현예 II-343. 구현예 185 내지 342 중 어느 하나에 있어서, 야생형 인간 CD47 단백질보다 더 적은 글리코실화 변형 부위를 포함하는 조작된 단백질.

[2395] 구현예 II-344. 구현예 343에 있어서, N206 글리코실화 부위를 포함하지 않는 조작된 단백질.

[2396] 구현예 II-345. 구현예 185 내지 344 중 어느 하나의 조작된 단백질을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2397] 구현예 II-346. 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자를 포함하는 유전자 조작된 세포로서, 여기서 조작된 단백질은

[2398] (a) 하나 이상의 세포외 도메인, 및

[2399] (b) 하나 이상의 막 테더를 포함하되,

[2400] 하나 이상의 세포외 도메인은 신호 조절 단백질 알파[SIRPα] 상호작용 모티프를 포함하는, 유전자 조작된 세포

[2401] 구현예 II-346a. 구현예 346에 있어서, 조작된 단백질은 하나 이상의 전장 CD47 세포내 도메인을 포함하지 않는, 유전자 조작된 세포.

[2402] 구현예 II-347. 구현예 346에 있어서, SIRPα 상호작용 모티프는 CD47 세포외 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2403] 구현예 II-348. 구현예 347에 있어서, CD47 세포외 도메인은 CD47 면역글로불린 가변[IgV] 유사 도메인인, 유전자 조작된 세포.

[2404] 구현예 II-349. 구현예 23 또는 347에 있어서, CD47 세포외 도메인은 인간 CD47 세포외 도메인인, 유전자 조작된 세포.

[2405] 구현예 II-350. 구현예 347 내지 349 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 52와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2406] 구현예 II-351. 구현예 347 내지 349 중 어느 하나에 있어서, CD47 세포외 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 53과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2407] 구현예 II-352. 구현예 347 내지 349 중 어느 하나에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

[2408] 구현예 II-353. 구현예 347 내지 349 중 어느 하나에 있어서, 상기 CD47 세포외 도메인은 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

[2409] 구현예 II-354. 구현예 346에 있어서, SIRPα 상호작용 모티프는 SIRPα 항체 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2410] 구현예 II-355. 구현예 346 내지 354 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 막 테더는 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2411] 구현예 II-356. 구현예 355에 있어서, 막관통 도메인은 CD3제타, CD8a, CD16a, CD28, CD32a, CD32c, CD40, CD47, CD64, ICOS, 덱틴-1, DNGR1, EGFR, GPCR, MyD88, PDGFR, SLAMF7, TRL1, TLR2, TLR3, TRL4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 또는 VEGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2412] 구현예 II-357. 구현예 355 또는 356에 있어서, 막관통 도메인은 CD47 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2413] 구현예 II-358. 구현예 355 내지 357 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 54와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2414] 구현예 II-359. 구현예 355 내지 357 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2415] 구현예 II-360. 구현예 355 내지 357 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 58과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2416] 구현예 II-361. 구현예 355 내지 357 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2417] 구현예 II-362. 구현예 355 내지 357 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2418] 구현예 II-363. 구현예 355 또는 356에 있어서, 막관통 도메인은 CD8a 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2419] 구현예 II-364. 구현예 355, 356 또는 363 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 69와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2420] 구현예 II-365. 구현예 355 또는 356에 있어서, 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2421] 구현예 II-366. 구현예 355, 356 또는 365 중 어느 하나에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 71과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2422] 구현예 II-367. 구현예 355 또는 356에 있어서, 막관통 도메인은 PDGFR 막관통 도메인이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2423] 구현예 II-368. 구현예 355, 356 또는 367에 있어서, 막관통 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 73과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2424] 구현예 II-369. 구현예 346 내지 354 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 막 테더는 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2425] 구현예 II-370. 구현예 369에 있어서, GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻, TRAILR3 GPI 닻, 또는 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2426] 구현예 II-371. 구현예 369 또는 370에 있어서, GPI 닻은 DAF/CD55 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2427] 구현예 II-372. 구현예 369 내지 371 중 하나에 있어서, DAF/CD55 GPI 닻은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2428] 구현예 II-373. 구현예 369 또는 370에 있어서, GPI 닻은 TRAILR3 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2429] 구현예 II-374. 구현예 369, 370 또는 373 중 어느 하나에 있어서, TRAILR3 GPI 닻은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2430] 구현예 II-375. 구현예 369, 370 또는 373 중 어느 하나에 있어서, TRAILR3 GPI 닻은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2431] 구현예 II-376. 구현예 369 또는 370에 있어서, GPI 닻은 CD59 GPI 닻이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2432] 구현예 II-377. 구현예 369, 370, 또는 376 중 어느 하나에 있어서, CD59 GPI 닻은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 68과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2433] 구현예 II-378. 구현예 346 내지 369 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 제어 서열을 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2434] 구현예 II-379. 구현예 378에 있어서, 하나 이상의 제어 서열은 세포외 신호 펩티드를 암호화하는, 유전자 조작된 세포.

[2435] 구현예 II-380. 구현예 378 또는 379에 있어서, 세포외 신호 펩티드는 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 51과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2436] 구현예 II-381. 구현예 378에 있어서, 하나 이상의 제어 서열은 프로모터를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2437] 구현예 II-382. 구현예 381에 있어서, 프로모터는 항구적 프로모터 또는 유도성 프로모터인, 유전자 조작된 세포.

[2438] 구현예 II-383. 구현예 381 또는 382에 있어서, 프로모터는 자연 발생 프로모터, 혼성 프로모터, 또는 합성 프로모터인, 유전자 조작된 세포.

[2439] 구현예 II-384. 구현예 381 내지 383 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, CAG 프로모터, 유비퀴틴/S27a 프로모터, SV40 초기 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터, RSV 프로모터, MMTV 프로모터, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 긴 말단 반복 영역, CMV 프로모터, 액틴 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 열충격 프로모터, 폴리오마 바이러스 프로모터, 계두 바이러스 프로모터, 소 유두종 바이러스 프로모터, 조류 육종 바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터, B형 간염 바이러스 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터,

SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[EBV] 프로모터, 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터, 또는 UBC 프로모터거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2440] 구현예 II-385. 구현예 381 내지 384 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 CAG 프로모터거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2441] 구현예 II-386. 구현예 381 내지 385 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 프로모터를 포함하고, 상기 프로모터는 서열 번호 49와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2442] 구현예 II-387. 구현예 381 내지 384 중 어느 하나에 있어서, 프로모터는 EF1α 프로모터거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2443] 구현예 II-388. 구현예 381 내지 385, 또는 387 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 프로모터를 포함하고, 상기 프로모터는 서열 번호 50과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2444] 구현예 II-389. 구현예 378에 있어서, 하나 이상의 제어 서열은 리보솜 결합 부위, 인핸서 요소, 활성자 요소, 번역 개시 서열, 번역 종결 서열, 전사 개시 서열, 전사 종결 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 복제 요소, RNA 처리 및 유출 요소, 전위인자 서열, 전위효소 서열, 절연체 서열, 내부 리보솜 진입 부위[IRES], 5'UTR, 3'UTR, mRNA 3' 말단 처리 서열, 경계 요소, 좌위 조절 영역[LCR], 기질 부착 영역[MAR], 재조합 또는 카세트 교환 서열, 링커 서열, 분비 신호, 내성 마커, 고정 펩티드, 국재화 신호, 융합 태그, 친화도 태그, 샤페로닌, 단백질 분해효소 또는 이들의 조합을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2445] 구현예 II-390. 구현예 346 내지 389 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 세포외 도메인은 세포외 힌지 도메인를 더 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2446] 구현예 II-391. 구현예 390에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지, CD8a 힌지, CD28 힌지, PDGFR 힌지, 또는 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2447] 구현예 II-392. 구현예 390 또는 391에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD47 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2448] 구현예 II-393. 구현예 390 내지 392 중 어느 하나에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 75와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2449] 구현예 II-394. 구현예 390 또는 391에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD8a 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2450] 구현예 II-395. 구현예 390, 391 또는 394에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 76과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2451] 구현예 II-396. 구현예 390 또는 391에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 CD28 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2452] 구현예 II-397. 구현예 390, 391 또는 396에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 77과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2453] 구현예 II-398. 구현예 390 또는 391에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 PDGFR 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2454] 구현예 II-399. 구현예 390, 391, 또는 398에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 78과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2455] 구현예 II-400. 구현예 390 또는 391에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 IgG4 힌지거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2456] 구현예 II-401. 구현예 390, 391, 또는 400에 있어서, 세포외 힌지 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 79와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2457] 구현예 II-402. 구현예 346 내지 401 중 어느 한 항에 있어서, 제1 이식유전자는 세포내 도메인을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 더 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2458] 구현예 II-403. 구현예 402에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2459] 구현예 II-404. 구현예 402 또는 403에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2460] 구현예 II-405. 구현예 402 또는 403에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2461] 구현예 II-406. 구현예 402 또는 403에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 63과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2462] 구현예 II-407. 구현예 402 또는 403에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 제1 이식유전자는 서열 번호 64와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2463] 구현예 II-408. 구현예 402에 있어서, 세포내 도메인은 CD8a 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2464] 구현예 II-409. 구현예 402 또는 408에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2465] 구현예 II-410. 구현예 402에 있어서, 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2466] 구현예 II-411. 구현예 402 또는 403에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2467] 구현예 II-412. 구현예 402에 있어서, 세포내 도메인은 PDGFR 세포내 도메인 또는 이의 일부거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2468] 구현예 II-413. 구현예 402 또는 412에 있어서, 세포내 도메인은 제1 이식유전자에 의해 암호화되고, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2469] 구현예 II-414. 구현예 402 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2470] 구현예 II-415. 구현예 402 내지 414 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 결실을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2471] 구현예 II-416. 구현예 402 내지 414 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 하나 이상의 삽입을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2472] 구현예 II-417. 구현예 402 내지 416 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 변경된 기능을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2473] 구현예 II-418. 구현예 402 내지 417 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 감소된 기능을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2474] 구현예 II-419. 구현예 402 내지 418 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 야생형 CD47 세포내 도메인에 비해 CD47 세포내 신호전달을 감소된 수준으로 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2475] 구현예 II-420. 구현예 402 내지 419 중 어느 하나에 있어서, 세포내 도메인은 비기능성 세포내 도메인을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2476] 구현예 II-421. 구현예 346 내지 420 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 표 31에서 선택된 서열과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2477] 구현예 II-422. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2478] 구현예 II-423. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2479] 구현예 II-424. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2480] 구현예 II-425. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 133과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2481] 구현예 II-426. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 134와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2482] 구현예 II-427. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 135와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2483] 구현예 II-428. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 136과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2484] 구현예 II-429. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 137과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2485] 구현예 II-430. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 138과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2486] 구현예 II-431. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 139과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2487] 구현예 II-432. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 140과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2488] 구현예 II-433. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 141과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2489] 구현예 II-434. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 142와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2490] 구현예 II-435. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 143과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2491] 구현예 II-436. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 144와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2492] 구현예 II-437. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 145와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2493] 구현예 II-438. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 146과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2494] 구현예 II-439. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 147과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2495] 구현예 II-440. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 148과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2496] 구현예 II-441. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 149와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2497] 구현예 II-442. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 150과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2498] 구현예 II-443. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 151과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2499] 구현예 II-444. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 152와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2500] 구현예 II-445. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 153과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2501] 구현예 II-446. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 154와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2502] 구현예 II-447. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 155와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2503] 구현예 II-448. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 156과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2504] 구현예 II-449. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 157과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2505] 구현예 II-450. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 158과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2506] 구현예 II-451. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 159와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2507] 구현예 II-452. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 160과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2508] 구현예 II-구현예 II-453. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 161과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2509] 구현예 II-454. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 162와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2510] 구현예 II-455. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 163과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2511] 구현예 II-456. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 164와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2512] 구현예 II-457. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 165와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2513] 구현예 II-458. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 166과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2514] 구현예 II-459. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 167과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2515] 구현예 II-460. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 168과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2516] 구현예 II-461. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 169와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2517] 구현예 II-462. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 170과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2518] 구현예 II-463. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 171과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2519] 구현예 II-464. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 172와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2520] 구현예 II-465. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 173과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2521] 구현예 II-466. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 174와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2522] 구현예 II-467. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 175와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2523] 구현예 II-468. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 176과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2524] 구현예 II-469. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 177과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2525] 구현예 II-470. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 178과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2526] 구현예 II-471. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 179와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2527] 구현예 II-472. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 180과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2528] 구현예 II-473. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 181과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2529] 구현예 II-474. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 182와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2530] 구현예 II-475. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 183과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2531] 구현예 II-476. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 184와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2532] 구현예 II-477. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 185와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2533] 구현예 II-478. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 341과 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2534] 구현예 II-479. 구현예 346 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 서열 번호 342와 적어도 80% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2535] 구현예 II-480. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 표 33에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2536] 구현예 II-481. 구현예 346에 있어서, 제1 이식유전자는 표 33 및/또는 표 31에서 선택된 하나 이상의 서열과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2537] 구현예 II-482. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2538] 구현예 II-483. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 14와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2539] 구현예 II-484. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2540] 구현예 II-485. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 13과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2541] 구현예 II-486. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2542] 구현예 II-487. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 18과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2543] 구현예 II-488. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56 및 서열 번호 57과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2544] 구현예 II-489. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55 및 서열 번호 56과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2545] 구현예 II-490. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54 및 서열 번호 55와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2546] 구현예 II-491. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61 및 서열 번호 62와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2547] 구현예 II-492. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60 및 서열 번호 61과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2548] 구현예 II-493. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59 및 서열 번호 60과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2549] 구현예 II-494. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 51, 서열 번호 52, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 서열 번호 56, 서열 번호 57, 서열 번호 58 및 서열 번호 59와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2550] 구현예 II-495. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2551] 구현예 II-496. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 53 및 서열 번호 65와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2552] 구현예 II-497. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2553] 구현예 II-498. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 53 및 서열 번호 66과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2554] 구현예 II-499. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2555] 구현예 II-500. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 53 및 서열 번호 67과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2556] 구현예 II-501. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2557] 구현예 II-502. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 53, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2558] 구현예 II-503. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2559] 구현예 II-504. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 53, 서열 번호 71 및

서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2560] 구현예 II-505. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2561] 구현예 II-506. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 53, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2562] 구현예 II-507. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2563] 구현예 II-508. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 78, 서열 번호 73 및 서열 번호 74와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2564] 구현예 II- 구현예 II-509. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2565] 구현예 II-510. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2566] 구현예 II-511. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2567] 구현예 II-512. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 79, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2568] 구현예 II-513. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2569] 구현예 II-514. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2570] 구현예 II-515. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2571] 구현예 II-516. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 77, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2572] 구현예 II-517. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2573] 구현예 II-518. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 71 및 서열 번호 72와 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2574] 구현예 II-519. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49, 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2575] 구현예 II-520. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 52, 서열 번호 76, 서열 번호 69 및 서열 번호 70과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2576] 구현예 II-521. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 49 및 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2577] 구현예 II-522. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 50 및 서열 번호 200

과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2578] 구현예 II-523. 구현예 346 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자는 서열 번호 200과 적어도 80% 동일한 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2579] 구현예 II-524. 구현예 346 내지 523 중 어느 하나에 있어서, 그의 유전체 내 제1 삽입 부위에서 제1 이식유전자를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2580] 구현예 II-525. 구현예 524에 있어서, 제1 삽입 부위는 T-세포 수용체[TCR] 좌위인, 유전자 조작된 세포.

[2581] 구현예 II-526. 구현예 525에 있어서, TCR 좌위는, TRAC 좌위, TRBC1 좌위, 또는 TRBC2 좌위거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2582] 구현예 II-527. 구현예 525에 있어서, 제1 삽입 부위는 β2 마이크로글로불린(B2M) 좌위인, 유전자 조작된 세포.

[2583] 구현예 II-528. 구현예 525에 있어서, 제1 삽입 부위는 클래스 II 전사활성자[CIITA] 좌위인, 유전자 조작된 세포.

[2584] 구현예 II-529. 구현예 525에 있어서, 제1 삽입 부위는 피난항 좌위인, 유전자 조작된 세포.

[2585] 구현예 II-530. 구현예 529에 있어서, 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 유전자 조작된 세포.

[2586] 구현예 II-531. 구현예 525 내지 530 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 엑손인, 유전자 조작된 세포.

[2587] 구현예 II-532. 구현예 525 내지 530 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 인트론인, 유전자 조작된 세포.

[2588] 구현예 II-533. 구현예 525 내지 530 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 인트론과 엑손 사이에 존재하는, 유전자 조작된 세포.

[2589] 구현예 II-534. 구현예 525 내지 530 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 조절 영역에 존재하는, 유전자 조작된 세포.

[2590] 구현예 II-535. 구현예 346 내지 534 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질이 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

[2591] 구현예 II-536. 구현예 346 내지 535 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되지 않은 비교 세포에 비해 TCR의 세포 표면 발현이 감소된 유전자 조작된 세포.

[2592] 구현예 II-537. 구현예 346 내지 536 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되지 않은 비교 세포에 비해 B2M의 세포 표면 발현이 감소된 유전자 조작된 세포.

[2593] 구현예 II-538. 구현예 346 내지 537 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되지 않은 비교 세포에 비해 CIITA의 세포 표면 발현이 감소된 유전자 조작된 세포.

[2594] 구현예 II-539. 구현예 346 내지 538 중 어느 하나에 있어서, TCR 좌위, B2M 좌위, TAP I 좌위, NLRC5 좌위, CIITA 좌위, HLA-A 좌위, HLA-B 좌위, HLA-C 좌위, HLA-DP 좌위, HLA-DM 좌위, HLA-DOA 좌위, HLA-DOB 좌위, HLA-DQ 좌위, HLA-DR 좌위, RFX5 좌위, RFXANK 좌위, RFXAP 좌위, NFY-A 좌위, NFY-B 좌위, NFY-C 좌위, 또는 이들의 조합을 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2595] 구현예 II-540. 구현예 346 내지 539 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되어 HLA-A 좌위, HLA-B 좌위, HLA-C 좌위, 또는 이들의 조합을 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

[2596] 구현예 II-541. 구현예 346 내지 539 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되어 HLA-DM 좌위, HLA-DO 좌위, HLA-DP 좌위, HLA-DQ 좌위, HLA-DR 좌위, 또는 이들의 조합을 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

[2597] 구현예 II-542. 구현예 346 내지 541 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되어 TCR 좌위를 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

[2598] 구현예 II-543. 구현예 346 내지 542 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되어 B2M 좌위를 녹아웃시키는 유전자 조작된 세포.

[2599] 구현예 II-544. 구현예 346 내지 543 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작되어 CIITA 좌위를 녹아웃시키는 유전

자 조작된 세포.

[2600] 구현예 II-545. 구현예 346 내지 544 중 어느 하나에 있어서, 세포는,

[2601] (a) 하나 이상의 주조직적합성 복합체[MHC] 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및/또는

[2602] (b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

[2603] 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2604] 구현예 II-546. 구현예 346 내지 545 중 어느 하나에 있어서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2605] 구현예 II-547. 구현예 346 내지 546 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2606] 구현예 II-548. 구현예 346 내지 547 중 어느 하나에 있어서, 세포는,

[2607] (a) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및

[2608] (b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

[2609] 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2610] 구현예 II-549. 구현예 346 내지 548 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

[2611] 구현예 II-550. 구현예 346 내지 549 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 이동[trafficking]을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

[2612] 구현예 II-551. 구현예 346 내지 550 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 기능을 감소시키며, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 유전자 조작된 세포.

[2613] 구현예 II-552. 구현예 346 내지 551 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 I 분자인, 유전자 조작된 세포.

[2614] 구현예 II-553. 구현예 522에 있어서, 하나 이상의 HLA 클래스 I 분자는 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2615] 구현예 II-554. 구현예 346 내지 551 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 상기 하나 이상의 분자는 B2M, NLRC5 및 TAP1로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2616] 구현예 II-555. 구현예 346 내지 554 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

[2617] 구현예 II-556. 구현예 346 내지 555 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 이동을 감소시키는, 유전자 조작된 세포.

[2618] 구현예 II-557. 구현예 346 내지 556 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 기능을 감소시키고, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 유전자 조작된 세포.

[2619] 구현예 II-558. 구현예 346 내지 557 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 II 분자인, 유전자 조작된 세포.

[2620] 구현예 II-559. 구현예 558에 있어서, 하나 이상의 HLA 클래스 II 분자는 HLA-DP, HLA-DQ, 및/또는 HLA-DR로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2621] 구현예 II-560. 구현예 346 내지 557 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하

는 하나 이상의 분자는 CIITA 및 CD74로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2622] 구현예 II-561. 구현예 346 내지 547 중 어느 하나에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2623] 구현예 II-562. 구현예 561에서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 또는 Serpinb9거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2624] 구현예 II-563. 구현예 561 또는 562에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 상기 제2 이식유전자는 TCR 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2625] 구현예 II-564. 구현예 561 또는 562에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 B2M 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2626] 구현예 II-565. 구현예 561 또는 562에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 CIITA 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2627] 구현예 II-566. 구현예 561 또는 562에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 피난항 좌위의 삽입 부위에서 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2628] 구현예 II-567. 구현예 566에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

[2629] 구현예 II-568. 구현예 561 내지 565 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 관용원성 인자가 세포 표면에 발현된, 유전자 조작된 세포.

[2630] 구현예 II-569. 구현예 346 내지 568 중 어느 하나에 있어서, 키메라 항원 수용체[CAR]을 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2631] 구현예 II-570. 구현예 569에 있어서, CAR은 CD5-특이적 CAR, CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD23-특이적 CAR, CD30-특이적 CAR, CD33-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD70-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, 카파, 람다, B 세포 성숙화제[B cell maturation agent, BCMA]-특이적 CAR, G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[GPRC5D]-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, LeY-특이적 CAR, NKG2D 리간드-특이적 CAR, WT1-특이적 CAR, GD2-특이적 CAR, HER2-특이적 CAR, EGFR-특이적 CAR, EGFRvIII-특이적 CAR, B7H3-특이적 CAR, PSMA-특이적 CAR, PSCA-특이적 CAR, CAIX-특이적 CAR, CD171-특이적 CAR, CEA-특이적 CAR, CSPG4-특이적 CAR, EPHA2-특이적 CAR, FAP-특이적 CAR, FRα-특이적 CAR, IL-13Rα-특이적 CAR, 메소텔린-특이적 CAR, MUC1-특이적 CAR, MUC16-특이적 CAR, ROR1-특이적 CAR, C-Met-특이적 CAR, CD133-특이적 CAR, Ep-CAM-특이적 CAR, GPC3-특이적 CAR, HPV16-E6-특이적 CAR, IL13Ra2-특이적 CAR, MAGEA3-특이적 CAR, MAGEA4-특이적 CAR, MART1-특이적 CAR, NY- ESO-1-특이적 CAR, VEGFR2-특이적 CAR, α-폴레이트 수용체-특이적 CAR, CD24-특이적 CAR, CD44v7/8-특이적 CAR, EGP-2-특이적 CAR, EGP-40-특이적 CAR, erb-B2-특이적 CAR, erb-B 2,3,4-특이적 CAR, FBP-특이적 CAR, 태아 아세틸콜린 e 수용체-특이적 CAR, GD2-특이적 CAR, GD3-특이적 CAR, HMW-MAA-특이적 CAR, IL-11Rα-특이적 CAR, KDR-특이적 CAR, 루이스 Y-특이적 CAR, L1-세포 접착 분자-특이적 CAR, MAGE-A1-특이적 CAR, 종양 태아성 항원(h5T4)-특이적 CAR, TAG-72-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2632] 구현예 II-571. 구현예 569 또는 570에 있어서, CAR은 CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, BCMA-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2633] 구현예 II-572. 구현예 569 내지 571 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전자 조작된 세포는 CAR가 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

[2634] 구현예 II-573. 구현예 346 내지 567 중 어느 하나에 있어서, 키메라 자가 항원 수용체[CAAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2635] 구현예 II-574. 구현예 573에 있어서, 상기 CAAR은 췌장 β-세포 항원, 활막 관절 항원, 수초 염기성 단백질, 단백지방 단백질, 수초 올리고수지상 당단백질, MuSK, 각질형성세포 접착 단백질 데스모글레인 3(Dsg3), Ro-RNP

복합체, La 항원, 골수세포형 과산화효소, 단백질 가수분해효소 3, 카르디오리핀, 시트룰린화 단백질, 카르바밀화 단백질, 및 기저막 콜라겐의 α3 사슬로 이루어진 군에서 선택된 항원을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2636] 구현예 II-575. 구현예 573 또는 574에 있어서, CAAR이 세포 표면에 발현된 유전자 조작된 세포.

[2637] 구현예 II-576. 구현예 346 내지 567 중 어느 하나에 있어서, B-세포 자가항체 수용체[BAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는 유전자 조작된 세포.

[2638] 구현예 II-577. 구현예 576에 있어서, BAR의 세포 표면 발현을 갖는, 유전자 조작된 세포.

[2639] 구현예 II-578. 구현예 569 내지 577 중 어느 하나에 있어서, 제3 이식유전자는 피난항 좌위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2640] 구현예 II-579. 구현예 569 내지 578 중 어느 하나에 있어서, 제3 이식유전자는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, MICA 좌위, MICB 좌위 또는 피난항 좌위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2641] 구현예 II-580. 구현예 569 내지 579 중 어느 하나에 있어서, 제3 이식유전자는 AAVS1 좌위, ABO 좌위, CCR5 좌위, CLYBL 좌위, CXCR4 좌위, F3 좌위, FUT1 좌위, HMGB1 좌위, KDM5D 좌위, LRP1 좌위, RHD 좌위, ROSA26 좌위 또는 SHS231 좌위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2642] 구현예 II-581. 구현예 346 내지 566 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자 및 제2 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2643] 구현예 II-582. 구현예 346 내지 566 또는 576 내지 580 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자 및 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2644] 구현예 II-583. 구현예 561 내지 580 중 어느 하나에 있어서, 제2 이식유전자 및 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2645] 구현예 II-584. 구현예 346 내지 580 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자 및 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 유전자 조작된 세포.

[2646] 구현예 II-585. 구현예 346 내지 584 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자 및 제3 이식유전자는 세 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

[2647] 구현예 II-586. 구현예 346 내지 584 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자 및 상기 제3 이식유전자는 두 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

[2648] 구현예 II-587. 구현예 346 내지 584 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자 및 상기 제3 이식유전자는 다중시스트론성 작제물에 의해 암호화되는, 유전자 조작된 세포.

[2649] 구현예 II-588. 구현예 346 내지 587 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자 및/또는 제2 이식유전자 및/또는 제3 이식유전자는 유전체 편집 복합체를 암호화하는, 유전자 조작된 세포.

[2650] 구현예 II-589. 구현예 588에 있어서, 유전체 편집 복합체는 유전체 표적화 엔티티(entity) 및 유전체 변형 엔티티를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2651] 구현예 II-590. 구현예 589에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 핵산 유도[nucleic acid-guided] 표적화 엔티티인, 유전자 조작된 세포.

[2652] 구현예 II-591. 구현예 589 또는 590 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZF] 핵산 결합 물질, 전사 활성자 유사 효과기[TALE] 핵산 결합 물질, 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, 귀소 핵산내부분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2653] 구현예 II-592. 구현예 589 내지 591 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13,

Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, dCas(D10A), dCas(H840A), dCas13a, dCas13b, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2654] 구현예 II-593. 구현예 589 내지 592 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 표적 좌위를 절단, 탈아미노화, 틈내기, 중합, 조사[interrogate], 통합, 절개, 풀기, 끊기, 변경, 메틸화, 탈메틸화하거나 아니면, 유전자 조작된 세포.

[2655] 구현예 II-594. 구현예 589 내지 593 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 재조합효소, 통합효소, 전위효소, 핵산내부분해효소, 핵산말단분해효소, 틈내기효소, 나선효소, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 역전사효소, 탈아미노효소, 플립파제(flippase), 메틸화효소, 탈메틸화효소, 아세틸화효소, 핵산 변형 단백질, RNA 변형 단백질, DNA 변형 단백질, 아르고노트(Argonaute) 단백질, 후성적 변형 단백질, 히스톤 변형 단백질, 또는 이들의 기능적 부분을 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2656] 구현예 II-595. 구현예 589 내지 594 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, TnpB 핵산분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 염기 편집, 프라임 편집, 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE], 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2657] 구현예 II-596. 구현예 589 내지 595 중 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, FokI, dCas (D10A), dCas (H840A), dCas13a, dCas13b, 염기 편집기, 프라임 편집기, 표적-프라임화된 역전사[TPRT] 편집기, APOBEC1, 시티딘 탈아미노효소, 아데노신 탈아미노효소, 우라실 당화효소 억제제[UGI], 아데닌 염기 편집기[ABE], 시토신 염기 편집기[CBE], 역전사효소, 세린 통합효소, 재조합효소, 전위효소, 중합효소, 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기, 10-11 전좌 메틸시토신 이산소화효소[TET], TET1, TET3, TET1CD, 히스톤 아세틸기전달효소 p300, 히스톤 메틸기전달효소 SMYD3, 히스톤 메틸기전달효소 PRDM9, H3K79 메틸기전달효소 DOT1L, 전사 억제자, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2658] 구현예 II-597. 구현예 589 내지 596 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 단일 폴리펩티드의 상이한 도메인인, 유전자 조작된 세포.

[2659] 구현예 II-598. 구현예 589 내지 597 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 함께 작동 가능한 상태로 연결된 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 유전자 조작된 세포.

[2660] 구현예 II-599. 구현예 589 내지 597 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 서로 연결되지 않은 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 유전자 조작된 세포.

[2661] 구현예 II-600. 구현예 589 내지 599 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 복합체는 적어도 하나의 표적 좌위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 안내 핵산을 포함하고, 임의로 상기 안내 핵산은 안내 RNA[gRNA]인, 유전자 조작된 세포.

[2662] 구현예 II-601. 구현예 588 내지 598 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 복합체는 RNA-안내 핵산분해효소를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2663] 구현예 II-602. 구현예 601에 있어서, RNA-안내 핵산분해효소는 Cas 핵산분해효소를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2664] 구현예 II-603. 구현예 602에 있어서, 유전체 편집 복합체는 Cas 핵산분해효소 및 gRNA를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체를 포함하는, 유전자 조작된 세포.

[2665] 구현예 II-604. 구현예 602 또는 603에 있어서, Cas 핵산분해효소는 II형 또는 V형 카스 단백질인, 유전자 조작된 세포.

[2666] 구현예 II-605. 구현예 602 내지 604 중 어느 하나에 있어서, Cas 핵산분해효소는 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3 및 Mad7로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2667] 구현예 II-606. 구현예 346 내지 587 중 어느 하나에 있어서, 인간 세포 또는 비-인간 동물 세포인 유전자 조작된 세포.

[2668] 구현예 II-607. 구현예 606에 있어서, 비-인간 동물 세포는 돼지, 소 또는 양인, 유전자 조작된 세포.

[2669] 구현예 II-608. 구현예 606에 있어서, 인간 세포인 유전자 조작된 세포.

[2670] 구현예 II-609. 구현예 346 내지 608 중 어느 하나에 있어서, 줄기 세포 또는 전구세포에서 유래한 분화된 세포인 유전자 조작된 세포.

[2671] 구현예 II-610. 구현예 609에 있어서, 줄기 세포는 만능 줄기 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2672] 구현예 II-611. 구현예 610에 있어서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]인, 유전자 조작된 세포.

[2673] 구현예 II-612. 구현예 610에 있어서, 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포[ESC]인, 유전자 조작된 세포.

[2674] 구현예 II-613. 구현예 346 내지 612 중 어느 하나에 있어서, 세포는 공여자에게서 단리된 일차 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2675] 구현예 II-614. 구현예 613에 있어서, 공여자는, 일차 세포가 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하고/하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 유전자 조작된 세포.

[2676] 구현예 II-615. 구현예 346 내지 614 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 다수의 공여자에게서 단리된 일차 세포 집단의 일부인, 유전자 조작된 세포.

[2677] 구현예 II-616. 구현예 346 내지 615 중 어느 하나에 있어서, 다수의 공여자는, 일차 세포가 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하고/하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 유전자 조작된 세포.

[2678] 구현예 II-617. 구현예 346 내지 616 중 어느 하나에 있어서, 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식 세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 혈액 세포, 또는 이들의 조합인, 유전자 조작된 세포.

[2679] 구현예 II-618. 구현예 346 내지 617 중 어느 하나에 있어서, 세포는 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2680] 구현예 II-619. 구현예 618에 있어서, 상기 T 세포는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CDS+ T 세포, 미감작 T 세포, 조절 T[Treg] 세포, 비조절 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, T-여포 헬퍼[Tfh] 세포, 세포독성 T 림프구[CTL], 효과기 T[Teff] 세포, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, CD45RA를 발현하는 효과기 기억 T 세포[TEMRA 세포], 조직-상주 기억[Trm] 세포, 가상 기억 T 세포, 선천적 기억 T 세포, 기억 줄기 세포[Tse], γδ T 세포, 및 이들의 조합인, 유전자 조작된 세포.

[2681] 구현예 II-620. 구현예 618 또는 619에 있어서, T 세포는 세포독성 T 세포, 헬퍼 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T

세포, 종양 침윤 림프구, 또는 이들의 조합인, 유전자 조작된 세포.

[2682] 구현예 II-621. 구현예 618 내지 620 중 어느 하나에 있어서, 세포는 인간 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2683] 구현예 II-622. 구현예 618 내지 621 중 어느 하나에 있어서, 세포는 자가 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2684] 구현예 II-623. 구현예 618 내지 구현예 621 중 어느 하나에 있어서, 세포는 동종이계 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2685] 구현예 II-624. 구현예 623에 있어서, 동종이계 T 세포는 일차 T 세포인, 유전자 조작된 세포.

[2686] 구현예 II-625. 구현예 623 또는 624에 있어서, 동종이계 T 세포는 배아 줄기 세포[ESC] 또는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]에서 분화된, 유전자 조작된 세포.

[2687] 구현예 II-626. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 25배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 150배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1000배, 1100배, 1200배, 1300배, 1400배, 1500배, 2000배, 2500배, 3000배, 3500배, 4000배, 4500배, 또는 5000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2688] 구현예 II-627. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배 내지 적어도 약 15배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2689] 구현예 II-628. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배 내지 적어도 약 10배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2690] 구현예 II-629. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1배 내지 적어도 약 5배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2691] 구현예 II-630. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 3배 내지 적어도 약 4배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2692] 구현예 II-631. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 3배 내지 적어도 약 10배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2693] 구현예 II-632. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 4배 내지 적어도 약 10배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2694] 구현예 II-633. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 500배 내지 적어도 약 2000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2695] 구현예 II-634. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 500배 내지 적어도 약 1500배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2696] 구현예 II-635. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 900배 내지 적어도 약 1000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2697] 구현예 II-636. 구현예 346 내지 625 중 어느 하나에 있어서, 조작된 단백질은 유전자 조작된 세포에서, 유전자 조작된 세포와 동일한 세포 유형의 대조군 세포에서의 내인성 CD47 단백질보다 적어도 약 1000배 초과의 수준으로 발현되는, 유전자 조작된 세포.

[2698] 구현예 II-637. 구현예 345 내지 636 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포를 포함하는 조성물.

[2699] 구현예 II-638. (i) 구현예 345 내지 636 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포 및 (ii) 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

[2700] 구현예 II-639. 구현예 345 내지 636 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포, 구현예 637의 조성물 또는 구현예 638의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

[2701] 구현예 II-640. 구현예 639에 있어서, 대상에서 질환을 치료하는 방법.

[2702] 구현예 II-641. 대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한 구현예 345 내지 636 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포를 포함하는 세포 집단.

[2703] 구현예 II-642. 대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한 구현예 637의 조성물.

[2704] 구현예 II-643. 대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한 구현예 638의 약학 조성물.

[2705] 구현예 II-644. 대상에서 질환을 치료하는데 사용하기 위한, 구현예 345 내지 636 중 어느 하나의 유전자 변형된 세포, 구현예 56의 세포 집단, 구현예 54 또는 56a의 조성물, 또는 구현예 54a 또는 54b의 약학 조성물의 용도.

[2706] 구현예 II-645. 구현예 345 내지 636 중 어느 하나의 유전자 변형된 세포, 구현예 56의 세포 집단, 구현예 54 또는 56a의 조성물, 또는 구현예 54a 또는 54b의 약학 조성물의 질환 치료용 의약 제조에서의 용도.

[2707] 구현예 II-646. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 질환은 암인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2708] 구현예 II-647. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 암은 CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD70, 카파, 람다, B 세포 성숙화제[BCMA], G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[GPRC5D], CD123, LeY, NKG2D 리간드, WT1, GD2, HER2, EGFR, EGFRvIII, B7H3, PSMA, PSCA, CAIX, CD171, CEA, CSPG4, EPHA2, FAP, FRα, IL-13Rα, 메소텔린, MUC1, MUC16, ROR1, C-Met, CD133, Ep-CAM, GPC3, HPV16-E6, IL13Ra2, MAGEA3, MAGEA4, MART1, NY-ESO-1, VEGFR2, α-폴레이트 수용체, CD24, CD44v7/8, EGP-2, EGP-40, erb-B2, erb-B 2,3,4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, G_{D2}, G_{D3}, HMW-MAA, IL-11Rα, KDR, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자, MAGE-A1, 종양태아성 항원(h5T4), 및/또는 TAG-72 발현과 연관되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2709] 구현예 II-648. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 암은 혈액암인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2710] 구현예 II-649. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 혈액암은 골수성 신생물, 골수형성 이상증후군[MDS], 골수증식성/골수형성 이상증후군, 급성 림프구성 백혈병[ALL], 만성 림프구성 백혈병[CLL], 급성 골수성 백혈병[AML], 만성 골수성 백혈병[CML], 모세포 위기 만성 골수성 백혈병[blast crisis chronic myelogenous leukemia, bcCML], B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B-ALL], T 세포 급성 림프구성 백혈병[T-ALL], T 세포 림프종 및 B 세포 림프종으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2711] 구현예 II-650. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 암은 고형암인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2712] 구현예 II-651. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 고형암은 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 상피암, 신장 세포 암종, 췌장 선암종, 자궁경부 암종, 결장직장암, 교모세포종, 횡문근육종, 신경모세포종, 흑색종, 유잉 육종, 골육종, 중피종 및 선암종에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2713] 구현예 II-652. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 질환은 자가면역질환인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2714] 구현예 II-653. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 자가면역질환은 루푸스, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 건선, 건선성 관절염, 다발성 경화증, 크론병, 궤양성 대장염, 애디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염 및 셀리악병으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성

물, 약학 조성물 또는 용도.

[2715] 구현예 II-654. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 질환은 당뇨병인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2716] 구현예 II-655. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 전당뇨병, 및 임신성 당뇨병으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2717] 구현예 II-656. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 질환은 신경 질환인, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2718] 구현예 II-657. 이전의 구현예들 중 어느 하나에 있어서, 신경 질환은 강경증, 뇌전증, 뇌염, 뇌수막염, 편두통, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 펠리제우스-메르츠바하병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 변형된 세포, 세포 집단, 조성물, 약학 조성물 또는 용도.

[2719] 구현예 II-658. 핵산 작제물을 포함하는 유전자 조작된 세포의 제조 방법으로서, 구현예 1 내지 184 중 어느 하나의 핵산 작제물을 세포에 전달하여 유전자 조작된 세포를 제조하는 방법.

[2720] 구현예 II-659. 구현예 658에 있어서, 핵산 작제물은 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자를 포함하는, 방법.

[2721] 구현예 II-660. 구현예 658 또는 659에 있어서, 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자를 세포의 유전체 내의 제1 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 포함하는 방법.

[2722] 구현예 II-661. 구현예 660에 있어서, 제1 삽입 부위는 T-세포 수용체[TCR] 좌위인, 방법.

[2723] 구현예 II-662. 구현예 661에 있어서, TCR 좌위는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, 또는 TRBC2 좌위거나 이를 포함하는, 방법.

[2724] 구현예 II-663. 구현예 661에 있어서, 제1 삽입 부위는 β2 마이크로글로불린(B2M) 좌위인, 방법.

[2725] 구현예 II-664. 구현예 661에 있어서, 제1 삽입 부위는 클래스 II 전사활성자[CIITA] 좌위인, 방법.

[2726] 구현예 II-665. 구현예 661에 있어서, 제1 삽입 부위는 피난항 좌위인, 방법.

[2727] 구현예 II-666. 구현예 665에 있어서, 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

[2728] 구현예 II-667. 구현예 660 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 엑손인, 방법.

[2729] 구현예 II-668. 구현예 660 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 인트론인, 방법.

[2730] 구현예 II-669. 구현예 660 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 인트론과 엑손 사이에 존재하는, 방법.

[2731] 구현예 II-670. 구현예 660 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 조절 영역에 존재하는, 방법.

[2732] 구현예 II-671. 구현예 660 내지 670 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 유전자 치료 벡터, 전위효소, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스, 퓨조좀, 피기백(PiggyBac) 전위인자, 슬리핑뷰티(Sleeping Beauty) (SB11) 전위인자, Mos1 전위인자, 또는 Tol2 전위인자를 이용한 삽입을 포함하는, 방법.

[2733] 구현예 II-672. 구현예 660 내지 671 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 렌티바이러스 벡터를 이용한 삽입을 포함하는, 방법.

[2734] 구현예 II-673. 구현예 660 내지 670 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 유전체 변형 단백질을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

[2735] 구현예 II-674. 구현예 658 내지 673 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 복합체를 세포 내로 도입하는 단계를 더 포함하는 방법.

[2736] 구현예 II-675. 구현예 674에 있어서, 유전체 편집 복합체는 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티를 포함하는, 방법.

[2737] 구현예 II-676. 구현예 675에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 유전체 편집 복합체를 피난항 부위로 국재화시키

고, 임의로, 상기 유전체 표적화 엔티티는 핵산 안내 표적화 엔티티인, 방법.

[2738] 구현예 II-677. 구현예 675 또는 676에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZF] 핵산 결합 물질, 전사 활성자 유사 효과기 [TALE] 핵산 결합 물질, 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, 귀소 핵산내부분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2739] 구현예 II-678. 구현예 675 내지 677 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas9, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, dCas (D10A), dCas (H840A), dCas13a, dCas13b, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2740] 구현예 II-679. 구현예 675 내지 678 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 표적 좌위를 절단, 탈아미노화, 틈내기, 중합, 조사, 통합, 절개, 풀기, 끊기, 변경, 메틸화, 탈메틸화하거나 아니면, 불안정화하는, 방법.

[2741] 구현예 II-680. 구현예 675 내지 679 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 재조합효소, 통합효소, 전위효소, 핵산내부분해효소, 핵산말단분해효소, 틈내기효소, 나선효소, DNA 중합효소, RNA 중합효소, 역전사효소, 탈아미노효소, 플립파제, 메틸화효소, 탈메틸화효소, 아세틸화효소, 핵산 변형 단백질, RNA 변형 단백질, DNA 변형 단백질, 아르고노트 단백질, 후성적 변형 단백질, 히스톤 변형 단백질, 또는 이들의 기능적 부분을 포함하는, 방법.

[2742] 구현예 II-681. 구현예 675 내지 680 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는, 서열 특이적 핵산분해효소, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, Cas 핵산분해효소 및 안내 RNA(CRISPR-Cas 조합)를 포함하는 RNA-안내 핵산분해효소, gRNA 및 Cas 핵산분해효소를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, Cas 핵산분해효소, 핵심 Cas 단백질, TnpB 핵산분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, CRISPR-연관 전위효소[CAST], II형 또는 V형 Cas 단백질, 염기 편집, 프라임 편집, 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE], 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 유전자 조작된 세포.

[2743] 구현예 II-682. 구현예 675 내지 681 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, FokI, dCas (D10A), dCas (H840A), dCas13a, dCas13b, 염기 편집기, 프라임 편집기, 표적-프라임화된 역전사[TPRT] 편집기, APOBEC1, 시티딘 탈아미노효소, 아데노신 탈아미노효소, 우라실 당화효소 억제제[UGI], 아데닌 염기 편집기[ABE], 시토신 염기 편집기[CBE], 역전사효소, 세린 통합효소, 재조합효소, 전위효소, 중합효소, 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기, 10-11 전좌 메틸시토신 이산소화효소[TET], TET1, TET3, TET1CD, 히스톤 아세틸기전달효소 p300, 히스톤 메틸기전달효소 SMYD3, 히스톤 메틸기전달효소 PRDM9, H3K79 메틸기전달효소 DOT1L, 전사 억제자, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 방

법.

[2744] 구현예 II-683. 구현예 675 내지 682 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 단일 폴리펩티드의 상이한 도메인인, 방법.

[2745] 구현예 II-684. 구현예 675 내지 683 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 함께 작동 가능한 상태로 연결된 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 방법.

[2746] 구현예 II-685. 구현예 675 내지 683 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 서로 연결되지 않은 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 방법.

[2747] 구현예 II-686. 구현예 674 내지 685 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 복합체는 유전체 피난항 부위 내 적어도 하나의 서열에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 안내 핵산을 포함하고, 임의로 상기 안내 핵산은 안내 RNA[gRNA]인, 방법.

[2748] 구현예 II-687. 구현예 674 내지 686 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 복합체는 RNA-안내 핵산분해효소를 포함하는, 방법.

[2749] 구현예 II-688. 구현예 687에 있어서, RNA-안내 핵산분해효소는 Cas 핵산분해효소를 포함하는, 방법.

[2750] 구현예 II-689. 구현예 688에 있어서, 유전체 편집 복합체는 Cas 핵산분해효소 및 gRNA를 포함하는 리보핵산단백질[RNP] 복합체를 포함하는, 방법.

[2751] 구현예 II-690. 구현예 688 또는 689에 있어서, Cas 핵산분해효소 II형 또는 V형 Cas 단백질인, 방법.

[2752] 구현예 II-691. 구현예 688 내지 690 중 어느 하나에 있어서, 녹아웃은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a (C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3 및 Mad7로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2753] 구현예 II-692. 구현예 678에 있어서, gRNA는 상보적 영역을 포함하고, 이러한 상보적 영역은 유전자좌 내 표적 핵산 서열에 대해 상보적인 핵산 서열을 포함하고, 표적 핵산 서열은 삽입 부위를 포함하는, 방법.

[2754] 구현예 II-693. 구현예 692에 있어서, 유전자좌는 TCR 좌위인, 방법.

[2755] 구현예 II-694. 구현예 692에 있어서, 유전자좌는 B2M 좌위인, 방법.

[2756] 구현예 II-695. 구현예 692에 있어서, 유전자좌는 CIITA 좌위인, 방법.

[2757] 구현예 II-696. 구현예 660 내지 695 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 프로토스페이서 인접 모티프[PAM] 서열에서부터 25 개 이하의 뉴클레오티드이며, PAM 서열은 ngg, nag, ngrrt, ngrrn, nnnngatt, nnnnryac, nnagaaw, naaaac, tttv, ttn, attn, tttn, gttn, 또는 yttn이며, 여기서

[2758] (i) r = a 또는 g,

[2759] (ii) y = c 또는 t,

[2760] (iii) w = a 또는 t,

[2761] (iv) v = a 또는 c 또는 g, 및

[2762] (v) n = a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2763] 구현예 II-697. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 SpCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 ngg 또는 nag이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2764] 구현예 II-698. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 SaCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 ngrrt 또는 ngrrn이며, 여기서

[2765] (i) r = a 또는 g, 및

[2766] (ii) n = a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2767] 구현예 II-699. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 NmeCas9를 이용한 상동성 유도 복

구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 nnnngatt이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2768] 구현예 II-700. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 CjCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 nnnnryac이며, 여기서

[2769] (i) r = a 또는 g,

[2770] (ii) y = c 또는 t, 및

[2771] (iii) n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2772] 구현예 II-701. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 StCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 nnagaaw이며, 여기서

[2773] (i) w = a 또는 t, 및

[2774] (ii) n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2775] 구현예 II-702. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TdCas9를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 naaaac이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2776] 구현예 II-703. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 LbCas12a를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 tttv이며, 여기서 v = a 또는 c 또는 g인, 방법.

[2777] 구현예 II-704. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 AsCas12a를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 tttv이며, 여기서 v = a 또는 c 또는 g인, 방법.

[2778] 구현예 II-705. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 AacCas12b를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 ttn이며, 여기서 n = a, c, t 또는 g인, 방법.

[2779] 구현예 II-706. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 BhCas12b를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 attn., tttn, 또는 gttn이며, 여기서 n = a, c, t 또는 g인, 방법.

[2780] 구현예 II-707. 구현예 660 내지 696중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 MAD7(ErCas12a)을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, PAM은 yttn이며, 여기서,

[2781] (i) y= c 또는 t, 및

[2782] (ii) n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2783] 구현예 II-708. 구현예 660, 678 또는 697 내지 707중 어느 하나에 있어서, 부위-유도 핵산분해효소를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입은 렌티바이러스를 이용하는 HDR 이상의 HDR 효율로 수행되는, 방법.

[2784] 구현예 II-709. 구현예 660 내지 673, 675, 676, 또는 677 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 ZFN을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

[2785] 구현예 II-710. 구현예 660 내지 673, 675, 676, 677, 또는 709 중 어느 하나에 있어서, 제1 삽입 부위는 아연 집게 결합 서열에서부터 25개 이하의 뉴클레오티드인, 방법.

[2786] 구현예 II-711. 구현예 660 내지 673, 675, 676, 또는 677 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TALEN을 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

[2787] 구현예 II-712. 구현예 660 내지 673, 675, 676, 677, 또는 711, 제1 삽입 부위는 전사 활성자 유사 효과기[TALE] 핵산분해효소 결합 서열에서부터 25개 이하의 뉴클레오티드인, 방법.

[2788] 구현예 II-713. 구현예 660 내지 675 또는 677 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 안내 RNA[gRNA] 및 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하는, 방법.

[2789] 구현예 II-714. 구현예 713에 있어서, gRNA는 상보적 영역을 포함하고, 이러한 상보적 영역은 유전자좌 내의 표적 핵산 서열에 대해 상보적인 핵산 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산 서열은 삽입 부위를 포함하는 것인 방법.

[2790] 구현예 II-715. 구현예 714에 있어서, 유전자좌는 TCR 좌위인, 방법.

[2791] 구현예 II-716. 구현예 714에 있어서, 유전자좌는 B2M 좌위인, 방법.

[2792] 구현예 II-717. 구현예 714에 있어서, 유전자좌는 CIITA 좌위인, 방법.

[2793] 구현예 II-718. 구현예 714에 있어서, 유전자좌는 피난항 좌위인, 방법.

[2794] 구현예 II-719. 구현예 718에 있어서, 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

[2795] 구현예 II-720. 구현예 713 내지 719 중 어느 하나에 있어서, 삽입 부위는 표적 인접 모티프[TAM] 서열에서부터 25개 이하의 뉴클레오티드이되, 상기 TAM 서열은 tca, tcac, tcag, tcat, tcaa, ttcan, ttcaa, ttcag, 또는 ttgat이고, 여기서,

[2796] (i) n = a, c, t 또는 g인, 방법.

[2797] 구현예 II-721. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tca인, 방법.

[2798] 구현예 II-722. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcac인, 방법.

[2799] 구현예 II-723. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcag인, 방법.

[2800] 구현예 II-724. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcat인, 방법.

[2801] 구현예 II-725. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 tcaa인, 방법.

[2802] 구현예 II-726. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttcan이며, 여기서 n= a, c, t, 또는 g인, 방법.

[2803] 구현예 II-727. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttcaa인, 방법.

[2804] 구현예 II-728. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttcag인, 방법.

[2805] 구현예 II-729. 구현예 713 내지 720 중 어느 하나에 있어서, 삽입하는 단계는 TnpB 폴리펩티드를 이용한 상동성 유도 복구[HDR]-매개 삽입을 포함하고, 상기 TAM은 ttgat인, 방법.

[2806] 구현예 II-730. 구현예 658 또는 659에 있어서, 핵산 작제물을 세포에 전달하는 단계는 레트로바이러스 또는 아데노-연관 바이러스[AAV] 벡터를 이용한 바이러스 형질도입을 포함하는, 방법.

[2807] 구현예 II-731. 구현예 730에 있어서, 상기 레트로바이러스는, 몰로니 쥐 백혈병 바이러스[M-MuLV], 몰로니 쥐 육종 바이러스[MoMSV], 하베이 쥐 육종 바이러스[HaMuSV], 쥣과 유방 종양 바이러스[MuMTV], 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스[GaLV], 고양이 백혈병 바이러스[FLV], 스푸마바이러스, 프리엔드(Friend) 쥐 백혈병 바이러스, 쥣과 줄기 세포 바이러스[MSCV] 및 라우스 육종 바이러스[RSV], 렌티바이러스, 감마레트로바이러스, 엡실론레트로바이러스, 알파레트로바이러스, 베타레트로바이러스, 델타레트로바이러스, 또는 스푸마레트로바이러스이거나 이를 포함하는, 방법.

[2808] 구현예 II-732. 구현예 730에 있어서, AAV 벡터는 AAV6 벡터 또는 AAV9 벡터인, 방법.

[2809] 구현예 II-733. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 중 어느 하나에 있어서, TCR 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 TCR의 발현을 감소시키는, 방법.

[2810] 구현예 II-734. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 733 중 어느 하나에 있어서, TCR 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 TCR의 발현을 파괴하는, 방법.

[2811] 구현예 II-735. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 중 어느 하나에 있어서, B2M 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 B2M의 발현을 감소시

키는, 방법.

[2812] 구현예 II-736. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 또는 735 중 어느 하나에 있어서, B2M 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 MHC I 분자의 발현을 감소시키는, 방법.

[2813] 구현예 II-737. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 또는 735 또는 내지 736 중 어느 하나에 있어서, B2M 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 B2M의 발현을 파괴하는, 방법.

[2814] 구현예 II-738. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 또는 735 내지 737 중 어느 하나에 있어서, B2M 유전자좌에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 MHC I 분자의 발현을 파괴하는, 방법.

[2815] 구현예 II-739. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 중 어느 하나에 있어서, CIITA 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 CIITA의 발현을 감소시키는, 방법.

[2816] 구현예 II-740. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 또는 739 중 어느 하나에 있어서, CIITA 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 MHC II 분자의 발현을 감소시키는, 방법.

[2817] 구현예 II-741. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732 또는 739 내지 740 중 어느 하나에 있어서, CIITA 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 CIITA의 발현을 파괴하는, 방법.

[2818] 구현예 II-742. 구현예 660, 661, 662, 673 내지 693, 696 내지 715, 또는 720 내지 732, 또는 739 내지 741 중 어느 하나에 있어서, CIITA 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 제1 이식유전자는 기능적 MHC II 분자의 발현을 파괴하는, 방법.

[2819] 구현예 II-743. 구현예 658 내지 742 중 어느 하나에 있어서, 세포는,

[2820] (a) 하나 이상의 주조직적합성 복합체[MHC] 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및/또는

[2821] (b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

[2822] 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

[2823] 구현예 II-744. 구현예 658 내지 743 중 어느 하나에 있어서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

[2824] 구현예 II-745. 구현예 658 내지 744 중 어느 하나에 있어서, 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

[2825] 구현예 II-746. 구현예 658 내지 745 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는,

[2826] (a) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및

[2827] (b) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자

[2828] 중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하는 하나 이상의 변형을 포함하는, 방법.

[2829] 구현예 II-747. 구현예 743 내지 746 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 방법.

[2830] 구현예 II-748. 구현예 743 내지 747 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분

자의 세포 표면 이동을 감소시키는, 방법.

[2831] 구현예 II-749. 구현예 743 내지 748 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 기능을 감소시키며, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 방법.

[2832] 구현예 II-750. 구현예 743 내지 749 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자는 하나 이상의 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 I 분자인, v.

[2833] 구현예 II-751. 구현예 750에 있어서, 하나 이상의 HLA 클래스 I 분자는 HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2834] 구현예 II-752. 구현예 743 내지 751 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 상기 하나 이상의 분자는 B2M, NLRC5 및 TAP1로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2835] 구현예 II-753. 구현예 743 내지 752 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 단백질 발현을 감소시키는, 방법.

[2836] 구현예 II-754. 구현예 743 내지 753 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 세포 표면 이동을 감소시키는, 방법.

[2837] 구현예 II-755. 구현예 743 내지 754 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 기능을 감소시키고, 임의로 상기 기능은 항원 제시인, 방법.

[2838] 구현예 II-756. 구현예 743 내지 755 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자는 인간 백혈구 항원[HLA] 클래스 II 분자인, 방법.

[2839] 구현예 II-757. 구현예 756에 있어서, 하나 이상의 HLA 클래스 II 분자는 HLA-DP, HLA-DQ, 및/또는 HLA-DR로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2840] 구현예 II-758. 구현예 743 내지 757 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자는 CIITA 및 CD74로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[2841] 구현예 II-759. 구현예 660 내지 758 중 어느 하나에 있어서, 피난항 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능성 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, 또는 SHS231의 발현을 파괴하는, 방법.

[2842] 구현예 II-760. 구현예 660 내지 758 중 어느 하나에 있어서, 피난항 좌위에서의 삽입 부위에서 조작된 단백질을 암호화하는 상기 제1 이식유전자는 기능성 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26, 또는 SHS231 분자의 발현을 파괴하는, 방법.

[2843] 구현예 II-761. 구현예 658 내지 760 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 조작된 단백질이 세포 표면에 발현된, 방법.

[2844] 구현예 II-762. 구현예 658 내지 761 중 어느 하나에 있어서, 핵산 작제물은 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

[2845] 구현예 II-763. 구현예 762에 있어서, 제2 이식유전자를 세포의 유전체 내의 제2 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

[2846] 구현예 II-764. 구현예 762에 있어서, 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, B2M-HLA-E, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CCL21, CCL22, CTLA4-Ig, C1 억제제, CR1, DUX4, FASL, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, H2-M3, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, IL-39, MANF, Mfge8, PD-L1, 또는 Serpinb9거나 이를 포함하는, 방법.

[2847] 구현예 II-765. 구현예 762 내지 764 중 어느 하나에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 TCR 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는 것인 방법.

[2848] 구현예 II-766. 구현예 762 내지 764 중 어느 하나에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 B2M 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는 것인 방법.

[2849] 구현예 II-767. 구현예 762 내지 121b764 중 어느 하나에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 CIITA 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는 것인 방법.

[2850] 구현예 II-768. 구현예 762 내지 764 중 어느 하나에 있어서, 관용원성 인자를 암호화하는 제2 이식유전자는 피난항 좌위에서의 제2 삽입 부위에서 삽입되는 것인 방법.

[2851] 구현예 II-769. 구현예 768에 있어서, 상기 피난항 좌위는 AAVS1, ABO, CCR5, CLYBL, CXCR4, F3, FUT1, HMGB1, KDM5D, LRP1, MICA, MICB, RHD, ROSA26 또는 SHS231 좌위인, 방법.

[2852] 구현예 II-770. 구현예 762 내지 769 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 관용원성 인자가 세포 표면에 발현된, 방법.

[2853] 구현예 II-771. 구현예 658 내지 770 중 어느 하나에 있어서, 핵산 작제물이 키메라 항원 수용체[CAR]을 암호화하는 제3 이식유전자를 추가로 포함하는, 방법.

[2854] 구현예 II-772. 구현예 771에 있어서, 제3 이식유전자를 세포의 유전체 내의 제3 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

[2855] 구현예 II-773. 구현예 771에 있어서, CAR은 CD5-특이적 CAR, CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD23-특이적 CAR, CD30-특이적 CAR, CD33-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD70-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, 카파, 람다, B 세포 성숙화제[BCMA]-특이적 CAR, G-단백질 연결 수용체 C족 5군 D원[GPRC5D]-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, LeY-특이적 CAR, NKG2D 리간드-특이적 CAR, WT1-특이적 CAR, GD2-특이적 CAR, HER2-특이적 CAR, EGFR-특이적 CAR, EGFRvIII-특이적 CAR, B7H3-특이적 CAR, PSMA-특이적 CAR, PSCA-특이적 CAR, CAIX-특이적 CAR, CD171-특이적 CAR, CEA-특이적 CAR, CSPG4-특이적 CAR, EPHA2-특이적 CAR, FAP-특이적 CAR, FRα-특이적 CAR, IL-13Rα-특이적 CAR, 메소텔린-특이적 CAR, MUC1-특이적 CAR, MUC16-특이적 CAR, ROR1-특이적 CAR, C-Met-특이적 CAR, CD133-특이적 CAR, Ep-CAM-특이적 CAR, GPC3-특이적 CAR, HPV16-E6-특이적 CAR, IL13Ra2-특이적 CAR, MAGEA3-특이적 CAR, MAGEA4-특이적 CAR, MART1-특이적 CAR, NY-ESO-1-특이적 CAR, VEGFR2-특이적 CAR, α-폴레이트 수용체-특이적 CAR, CD24-특이적 CAR, CD44v7/8-특이적 CAR, EGP-2-특이적 CAR, EGP-40-특이적 CAR, erb-B2-특이적 CAR, erb-B 2,3,4-특이적 CAR, FBP-특이적 CAR, 태아 아세틸콜린 e 수용체-특이적 CAR, G_{D2}-특이적 CAR, G_{D3}-특이적 CAR, HMW-MAA-특이적 CAR, IL-11Rα-특이적 CAR, KDR-특이적 CAR, 루이스 Y-특이적 CAR, L1-세포 접착 분자-특이적 CAR, MAGE-A1-특이적 CAR, 종양태아성 항원(h5T4)-특이적 CAR, TAG-72-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 방법.

[2856] 구현예 II-774. 구현예 771 내지 773 중 어느 하나에 있어서, CAR은 CD19-특이적 CAR, CD20-특이적 CAR, CD22-특이적 CAR, CD38-특이적 CAR, CD123-특이적 CAR, CD138-특이적 CAR, BCMA-특이적 CAR, 또는 CD19/CD22-이중특이적 CAR이거나 이를 포함하는, 방법.

[2857] 구현예 II-775. 구현예 771 내지 774 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 CAR이 세포 표면에 발현된, 방법.

[2858] 구현예 II-776. 구현예 658 내지 770 중 어느 하나에 있어서, 핵산 작제물은 키메라 자가 항원 수용체[CAAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

[2859] 구현예 II-777. 구현예 776에 있어서, 제3 이식유전자를 세포의 유전체 내의 제3 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

[2860] 구현예 II-778. 구현예 776에 있어서, CAAR은 췌장 β-세포 항원, 활막 관절 항원, 수초 염기성 단백질, 단백지방 단백질, 수초 올리고수지상 당단백질, MuSK, 각질형성세포 접착 단백질 데스모글레인 3(Dsg3), Ro-RNP 복합체, La 항원, 골수세포형 과산화효소, 단백질 가수분해효소 3, 카르디오리핀, 시트룰린화 단백질, 카르바밀화 단백질, 및 기저막 콜라겐의 α3 사슬로 이루어진 군에서 선택된 항원을 포함하는, 방법.

[2861] 구현예 II-779. 구현예 776 내지 778 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 CAAR이 세포 표면에 발현된, 방법.

[2862] 구현예 II-780. 구현예 658 내지 770 중 어느 하나에 있어서, 핵산 작제물은 B-세포 자가항체 수용체[BAR]를 암호화하는 제3 이식유전자를 더 포함하는, 방법.

[2863] 구현예 II-781. 구현예 780에 있어서, 제3 이식유전자를 세포의 유전체 내의 제3 삽입 부위 내로 삽입하는 단계를 더 포함하는 방법.

[2864] 구현예 II-782. 구현예 780에 있어서, 유전자 조작된 세포는 BAR의 세포 표면에 발현을 갖는, 방법.

[2865] 구현예 II-783. 구현예 771 내지 782 중 어느 하나에 있어서, 제3 이식유전자는 피난항 좌위에 삽입되는, 방법.

[2866] 구현예 II-784. 구현예 771 내지 783 중 어느 하나에 있어서, 제3 이식유전자는 TRAC 좌위, TRBC1 좌위, TRBC2 좌위, B2M 좌위, CIITA 좌위, MICA 좌위, MICB 좌위 또는 피난항 좌위에 삽입되는, 방법.

[2867] 구현예 II-785. 구현예 771 내지 784 중 어느 하나에 있어서, 제3 이식유전자는 AAVS1 좌위, ABO 좌위, CCR5 좌위, CLYBL 좌위, CXCR4 좌위, F3 좌위, FUT1 좌위, HMGB1 좌위, KDM5D 좌위, LRP1 좌위, RHD 좌위, ROSA26 좌위, 또는 SHS231 좌위에 삽입되는, 방법.

[2868] 구현예 II-786. 구현예 658 내지 785 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 및 제2 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

[2869] 구현예 II-787. 구현예 658 내지 768 또는 780 내지 785 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자 및 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

[2870] 구현예 II-788. 구현예 762 내지 785 중 어느 하나에 있어서, 제2 이식유전자 및 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

[2871] 구현예 II-789. 구현예 658 내지 785 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자, 및 제3 이식유전자는 동일한 삽입 부위에 삽입되는, 방법.

[2872] 구현예 II-790. 구현예 658 내지 789 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자, 및 제3 이식유전자는 세 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 방법.

[2873] 구현예 II-791. 구현예 658 내지 789 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자, 및 제3 이식유전자는 두 개의 별개의 작제물에 의해 암호화되는, 방법.

[2874] 구현예 II-792. 구현예 658 내지 789 중 어느 하나에 있어서, 제1 이식유전자, 제2 이식유전자, 및 제3 이식유전자는 다중시스트론성 작제물에 의해 암호화되는, 방법.

[2875] 구현예 II-793. 구현예 658 내지 792 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 인간 세포 또는 비-인간 동물 세포인, 방법.

[2876] 구현예 II-794. 구현예 793에 있어서, 비-인간 동물 세포는 돼지, 소 또는 양 세포인, 방법.

[2877] 구현예 II-795. 구현예 793에 있어서, 유전자 조작된 세포는 인간 세포인, 방법.

[2878] 구현예 II-796. 구현예 658 내지 795 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포는 줄기 세포 또는 전구세포로부터 유래한 분화된 세포인, 방법.

[2879] 구현예 II-797. 구현예 658 내지 796 중 어느 하나에 있어서, 세포가 줄기 세포 또는 전구세포인, 방법.

[2880] 구현예 II-798. 구현예 658 내지 796 중 어느 하나에 있어서, 세포는 줄기 세포 또는 전구세포에서 유래한 분화된 세포인, 방법.

[2881] 구현예 II-799. 구현예 796에 있어서, 줄기 세포는 만능 줄기 세포인, 방법.

[2882] 구현예 II-800. 구현예 799에 있어서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]를 포함하는, 방법.

[2883] 구현예 II-801. 구현예 799에 있어서, 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포[ESC]인, 방법.

[2884] 구현예 II-802. 구현예 658 내지 801 중 어느 하나에 있어서, 세포는 공여자에게서 단리된 일차 세포인, 방법.

[2885] 구현예 II-803. 구현예 802에 있어서, 공여자는, 일차 세포가 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하고/하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 방법.

[2886] 구현예 II-804. 구현예 658 내지 803 중 어느 하나에 있어서, 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식 세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 혈액 세포, 또는 이들의 조합인, 방법.

[2887] 구현예 II-805. 구현예 658 내지 804 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 방법.

[2888] 구현예 II-806. 구현예 805에 있어서, T 세포는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CDS+ T 세포, 미감작 T 세포, 조절 T[Treg] 세포, 비조절 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, T-여포 헬퍼[Tfh] 세포, 세포독성 T 림프구[CTL], 효과기 T[Teff] 세포, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, CD45RA를 발현하는 효과기 기억 T 세포[TEMRA 세포], 조직-상주 기억[Trm] 세포, 가상 기억 T 세포, 선천적 기억 T 세포, 기억 줄기 세포[Tsc], γδ T 세포, 또는 이들의 조합인, 방법.

[2889] 구현예 II-807. 구현예 805 또는 806에 있어서, T 세포가 세포독성 T-세포, 헬퍼 T-세포, 기억 T-세포, 조절 T-세포, 종양 침윤 림프구, 또는 이들의 조합인, 방법.

[2890] 구현예 II-808. 구현예 805 내지 807 중 어느 하나에 있어서, 세포는 인간 T-세포인, 방법.

[2891] 구현예 II-809. 구현예 805 내지 808 중 어느 하나에 있어서, 세포는 자가 T-세포인 방법.

[2892] 구현예 II-810. 구현예 805 내지 808 중 어느 하나에 있어서, 세포는 동종이계 T 세포인, 방법.

[2893] 구현예 II-811. 구현예 810에 있어서, 동종이계 T-세포는 일차 T 세포인, 방법.

[2894] 구현예 II-812. 구현예 810 또는 811에 있어서, 상기 동종이계 T 세포는 배아 줄기 세포[ESC] 또는 유도 만능 줄기 세포[iPSC]에서 분화된, 방법.

[2895] 구현예 III-386. (i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고/시키거나, (ii) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하되, (i)의 감소된 발현 및 (ii)의 증가된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비교한 것인 조작된 세포.

[2896] 구현예 III-386a. 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포로서, 변형은:

[2897] (a) (i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자, 및/또는

[2898] (ii) 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 조절하는 하나 이상의 분자중 하나 이상의 대립유전자를 불활성화하거나 파괴하고/거나

[2899] (b) 하나 이상의 관용원성 인자의 발현을 증가시키되,

[2900] (ii)의 증가된 발현은 변형을 포함하지 않는 섬 세포에 비교한 것인, 조작된 세포.

[2901] 구현예 III-387. 구현예 388에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은:

[2902] a. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자

[2903] b. 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는

[2904] c. 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2905] 구현예 III-388. 구현예 388 또는 구현예 389에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 분자의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2906] 구현예 III-389. 구현예 390에 있어서, 조작된 세포는 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분자를 발현하지 않는 조작된 세포.

[2907] 구현예 III-390. 구현예 388 내지 391 중 어느 하나에 있어서, 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형은 증가된 세포 표면 발현을 포함하고/하거나, 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형은 감소된 세포 표면 발현을 포함하는, 조작된 세포.

[2908] 구현예 III-391. 구현예 388 내지 392 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2909] 구현예 III-392. 구현예 388 내지 393 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 B2M의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2910] 구현예 III-393. 구현예 388 내지 394 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 HLA-A, HLA-B, 및/또는 HLA-C의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2911] 구현예 III-394. 구현예 388 내지 395 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2912] 구현예 III-395. 구현예 388 내지 396 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나이상의 변형은 CIITA의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2913] 구현예 III-396. 구현예 388 내지 397 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, RFX5, RFXANK, 및/또는 RFXAP의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2914] 구현예 III-397. 구현예 388 내지 398 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-L1, Serpinb9, A20/TNFAIP3, CD39, CR1, HLA-F, IL15-RF, MANF 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 관용원성 인자를 포함하는, 조작된 세포.

[2915] 구현예 III-398. 구현예 388 내지 399 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 조작된 세포.

[2916] 구현예 III-399. 구현예 388 내지 400 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CCL22를 포함하는, 조작된 세포.

[2917] 구현예 III-400. 구현예 388 내지 401 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD16 또는 CD16 Fc 수용체를 포함하는, 조작된 세포.

[2918] 구현예 III-401. 구현예 388 내지 402 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24를 포함하는, 조작된 세포.

[2919] 구현예 III-402. 구현예 388 내지 403 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD39를 포함하는, 조작된 세포.

[2920] 구현예 III-403. 구현예 388 내지 404 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CR1을 포함하는, 조작된 세포.

[2921] 구현예 III-404. 구현예 388에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD52를 포함하는, 조작된 세포.

[2922] 구현예 III-405. 구현예 388 내지 406 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD55를 포함하는, 조작된 세포.

[2923] 구현예 III-406. 구현예 388 내지 407에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD200을 포함하는, 조작된 세포.

[2924] 구현예 III-407. 구현예 388 내지 408 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 DUX4를 포함하는, 조작된 세포.

[2925] 구현예 III-408. 구현예 388 내지 409 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E를 포함하는, 조작된 세포.

[2926] 구현예 III-409. 구현예 388 내지 410 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-G를 포함하는, 조작된 세포.

[2927] 구현예 III-410. 구현예 388 내지 411 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 IDO1을 포함하는, 조작된 세포.

[2928] 구현예 III-411. 구현예 388 내지 412 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 IL15-RF를 포함하는, 조작된 세포.

[2929] 구현예 III-412. 구현예 388 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 IL35를 포함하는,

조작된 세포.

[2930] 구현예 III-413. 구현예 388 내지 414 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 PD-L1을 포함하는, 조작된 세포.

[2931] 구현예 III-414. 구현예 388 내지 415 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 MANF를 포함하는, 조작된 세포.

[2932] 구현예 III-415. 구현예 388 내지 416 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3을 포함하는, 조작된 세포.

[2933] 구현예 III-416. 구현예 388 내지 417 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E 및 CD47을 포함하는, 조작된 세포.

[2934] 구현예 III-417. 구현예 388 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, CD46, 및 CD59로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, CD46, 및 CD59를 포함하는, 조작된 세포.

[2935] 구현예 III-418. 구현예 388 내지 419 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47 및 CD39로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47 및 CD39를 포함하는, 조작된 세포.

[2936] 구현예 III-419. 구현예 388 내지 420 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47 및 CCL22로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47 및 CCL22를 포함하는, 조작된 세포.

[2937] 구현예 III-420. 구현예 388 내지 421 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, HLA-G 및 PD-L1로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47 및 PD-L1을 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD47, HLA-G 및 PD-L1을 포함하는, 조작된 세포.

[2938] 구현예 III-421. 구현예 388 내지 422 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24, CD47, 및 PD-L1로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD24, CD47, 및 PD-L1을 포함하는, 조작된 세포.

[2939] 구현예 III-422. 구현예 388 내지 423 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, 및 PD-L1로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, 및 PD-L1을 포함하는, 조작된 세포.

[2940] 구현예 III-423. 구현예 388 내지 424 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46, CD55, CD59, 및 CR1로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 CD46, CD55, CD59, 및 CR1을 포함하는, 조작된 세포.

[2941] 구현예 III-424. 구현예 388 내지 425 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD46, CD55, CD59, 및 CR1로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD46, CD55, CD59, 및 CR1을 포함하는, 조작된 세포.

[2942] 구현예 III-425. 구현예 388 내지 426 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59, 및 CR1로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, CD24, CD47, PD-L1, CD46, CD55, CD59, 및 CR1을 포함하는, 조작된 세포.

[2943] 구현예 III-426. 구현예 388 내지 427 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E 및 PD-L1을 포함하는, 세포.

[2944] 구현예 III-427. 구현예 388 내지 428 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, PD-L1, 및 A20/TNFAIP로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, PD-L1, 및 A20/TNFAIP을 포함하는, 조작된 세포.

[2945] 구현예 III-428. 구현예 388 내지 429 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, PD-L1, 및

MANF로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, PD-L1, 및 MANF로 포함하는, 조작된 세포.

[2946] 구현예 III-429. 구현예 388 내지 430 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, PD-L1, A20/TNFAIP, 및 MANF로 이루어진 군에서 선택된 두 개 이상의 관용원성 인자를 포함하고, 임의로 하나 이상의 관용원성 인자는 HLA-E, PD-L1, A20/TNFAIP, 및 MANF로 포함하는, 조작된 세포.

[2947] 구현예 III-430. (i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, (ii) CD47의 발현을 증가시키는, 하나 이상의 변형을 포함하되, 여기서 (i)의 감소된 발현 및 (ii)의 증가된 발현은 변형을 포함하지 않는 동일한 세포 유형의 세포에 비교한 것인, 조작된 세포.

[2948] 구현예 III-431. 구현예 432에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분자의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2949] 구현예 III-432. 구현예 432 또는 구현예 46에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 B2M의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2950] 구현예 III-433. 구현예 432 내지 434 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 HLA-A, HLA-B, 및/또는 HLA-C의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2951] 구현예 III-434. 구현예 432 내지 435 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 CIITA의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2952] 구현예 III-435. 구현예 432 내지 435 중 어느 하나에 있어서, (i)에서의 하나 이상의 변형은 HLA-DP, HLA-DR, 및/또는 HLA-DQ의 발현을 감소시키는, 조작된 세포.

[2953] 구현예 III-436. 구현예 388 내지 437 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포가 하나 이상의 추가의 관용원성 인자의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 더 포함하는, 조작된 세포.

[2954] 구현예 III-437. 구현예 438에 있어서, 하나 이상의 추가의 관용원성 인자는 A20/TNFAIP3, C1-억제제, CCL21, CCL22, CD16, CD16 Fc 수용체, CD24, CD27, CD35, CD39, CD46, CD47, CD52, CD55, CD59, CD64, CD200, CR1, CTLA4-Ig, DUX4, FasL, H2-M3, HLA-C, HLA-E, HLA-E 중쇄, HLA-F, HLA-G, IDO1, IL-10, IL15-RF, IL-35, MANF, Mfge8, PD-L1, Serpinb9, A20/TNFAIP3, CD39, CR1, HLA-F, IL15-RF, MANF 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 관용원성 인자를 포함하는, 조작된 세포.

[2955] 구현예 III-438. 구현예 439에 있어서, 하나 이상의 추가의 관용원성 인자는 CD47을 포함하는, 조작된 세포.

[2956] 구현예 III-439. 구현예 388 내지 440 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 하나 이상의 추가 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형을 더 포함하는, 조작된 세포.

[2957] 구현예 III-440. 구현예 441에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, ABO, CADM1, CD58, CD38, CD142, CD155, CEACAM1, CTLA-4, FUT1, ICAM1, IRF1, MIC-A, MIC-B, NLGN4Y, PCDH11Y, PD-1, 산화적 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질, RHD, TRAC, TRB을 포함하고, 임의로, 산화적 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질은 TXNIP, PERK, IRE1α 및 DJ-1(PARK7)로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[2958] 구현예 III-441. 구현예 441 또는 442에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 하나 이상의 Y 염색체 단백질, 임의로 프로토카데린-11 Y-연결[PCDH11Y] 및/또는 뉴롤리진-4 Y-연결[NLGN4Y]을 포함하는, 조작된 세포.

[2959] 구현예 III-442. 구현예 441 내지 443 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 하나 이상의 NK 세포 리간드, 임의로 MIC-A 및/또는 MIC-B를 포함하는, 조작된 세포.

[2960] 구현예 III-443. 구현예 441 내지 444 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 산화적 또는 ER 스트레스에 관여하는 하나 이상의 단백질, 임의로 티오레독신-상호작용 단백질[TXNIP], PKR-유사 ER 키나제[PERK], 이노시톨-요구 효소 1α[IRE1α], 및/또는 DJ-1 (PARK7)을 포함하는, 조작된 세포.

[2961] 구현예 III-444. 구현예 441 내지 446 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 하나 이상의 혈액 항원 단백질, 임의로 ABO, FUT1 및/또는 RHD를 포함하는, 조작된 세포.

[2962] 구현예 III-445. 구현예 388 내지 446 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 B2M, TAP I, NLRC5, CIITA, HLA-

A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO, RFX5, RFXANK, RFXAP, NFY-A, NFY-B, NFY-C, ABO, CADM1, CD58, CD38, CD142, CD155, CEACAM1, CTLA-4, FUT1, ICAM1, IRF1, MIC-A, MIC-B, NLGN4Y, PCDH11Y, PD-1, 산화적 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질, RHD, TRAC, TRB의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형을 더 포함하고, 임의로, 산화적 또는 ER 스트레스에 관여하는 단백질은 TXNIP, PERK, IRE1α 및 DJ-1(PARK7)로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[2963] 구현예 III-446. 구현예 447에 있어서, TRB는 TRBC1, TRBC2, 또는 TRBC1 및 TRBC2인, 조작된 세포.

[2964] 구현예 III-447. 구현예 388 내지 448 중 어느 하나에 있어서, 감소된 발현은 세포 표면 발현을 포함하지 않거나 또는 검출 가능한 세포 표면 발현을 포함하지 않는, 조작된 세포.

[2965] 구현예 III-448. 구현예 388 내지 449 중 어느 하나에 있어서, 감소된 발현은 감소된 mRNA 발현을 포함하고, 임의로 감소된 발현은 검출 가능한 mRNA 발현을 포함하지 않는, 조작된 세포.

[2966] 구현예 III-449. 구현예 388 내지 460 중 어느 하나에 있어서, 감소된 발현은 감소된 단백질 발현 또는 감소된 단백질 활성을 포함하고, 임의로 감소된 발현은 검출 가능한 단백질 발현 또는 단백질 활성을 포함하지 않는, 조작된 세포.

[2967] 구현예 III-450. 구현예 388 내지 451 중 어느 하나에 있어서, 감소된 발현은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화하거나 조절하는 유전자의 활성을 제거하는 것을 포함하는, 조작된 세포.

[2968] 구현예 III-451. 구현예 388 내지 452 중 어느 하나에 있어서, 감소된 발현은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화하거나 조절하는 유전자의 대립유전자의 불활성 또는 파괴를 포함하는, 조작된 세포.

[2969] 구현예 III-452. 구현예 388 내지 453 중 어느 하나에 있어서, 감소된 발현은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화하거나 조절하는 두 개의 대립유전자 모두의 불활성화 또는 파괴를 포함하는, 조작된 세포.

[2970] 구현예 III-453. 구현예 388 내지 454 중 어느 하나에 있어서, 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화 또는 조절하는 유전자 내에 인델을 포함하는, 조작된 세포.

[2971] 구현예 III-454. 구현예 388 내지 455 중 어느 하나에 있어서, 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화 또는 조절하는 유전자 내에 유전체 DNA의 연속 구간의 해독틀이동 돌연변이 또는 결실을 포함하는, 조작된 세포.

[2972] 구현예 III-455. 구현예 388 내지 456 중 어느 하나에 있어서, 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화하거나 조절하는 유전자의 모든 코딩 서열을 불활성화 또는 파괴를 포함하는, 조작된 세포.

[2973] 구현예 III-456. 구현예 388 내지 456 중 어느 하나에 있어서, 발현을 감소시키기 위한 하나 이상의 변형은 i) 하나 이상의 MHC 클래스 I 분자 및/또는 하나 이상의 MHC 클래스 II 분자, 또는 ii) 하나 이상의 추가 분자의 발현을 암호화하거나 조절하는 유전자를 녹아웃시키는 것을 포함하는, 조작된 세포.

[2974] 구현예 III-457. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[2975] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[2976] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[2977] c. CCL22의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[2978] 구현예 III-458. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[2979] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[2980] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[2981] c. CD39의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[2982] 구현예 III-459. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[2983] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[2984] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[2985] c. CD46 및 CD59의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[2986] 구현예 III-460. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는

[2987] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[2988] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[2989] c. PD-L1의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[2990] 구현예 III-461. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[2991] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[2992] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[2993] c. HLA-G 및 PD-L1의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[2994] 구현예 III-462. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[2995] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[2996] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[2997] c. CD142의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[2998] 구현예 III-463. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[2999] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[3000] b. CD47의 발현을 증가시키고, 그리고

[3001] c. MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3002] 구현예 III-464. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3003] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3004] b. CD24의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3005] 구현예 III-465. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3006] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3007] b. CD200의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3008] 구현예 III-466. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3009] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3010] b. CD52의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3011] 구현예 III-467. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3012] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3013] b. DUX4의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3014] 구현예 III-468. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서,

[3015] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3016] b. IDO1의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3017] 구현예 III-469. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3018] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3019] b. IL-35의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3020] 구현예 III-470. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3021] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3022] b. PD-L1의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3023] 구현예 III-471. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3024] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3025] b. HLA-E의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3026] 구현예 III-472. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3027] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고, 그리고

[3028] b. HLA-G의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3029] 구현예 III-473. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3030] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[3031] b. CD155의 발현을 감소시키고, 그리고

[3032] c. HLA-E의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3033] 구현예 III-474. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3034] a. MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고,

[3035] b. RFXANK의 발현을 감소시키고, 그리고

[3036] c. HLA-E의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3037] 구현예 III-475. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3038] a. MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키고,

[3039] b. MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고,

[3040] c. CD47, CD24 및 PD-L1 중 하나 이상의 발현을 증가시키고, 그리고

[3041] d. CD46, CD55, CD59 및 CR1의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3042] 구현예 III-476. 구현예 388 내지 458 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는,

[3043] a. MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키고,

[3044] b. MIC-A 및/또는 MIC-B의 발현을 감소시키고,

[3045] c. TXNIP의 발현을 감소시키고, 그리고

[3046] d. PD-L1 및 HLA-E의 발현을 증가시키는 하나 이상의 변형을 포함하는 조작된 세포.

[3047] 구현예 III-477. 구현예 477에 있어서, 변형은 A20/TNFAIP3 및 MANF의 발현을 추가로 증가시키는, 조작된 세포.

[3048] 구현예 III-478. 구현예 388 내지 479 중 어느 하나에 있어서, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형은 MHC 클래스 I 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형으로 이루어진, 조작된 세포.

[3049] 구현예 III-479. 구현예 388 내지 479 중 어느 하나에 있어서, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형은 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형으로 이루어진, 조작된 세포.

[3050] 구현예 III-480. 구현예 388 내지 479 중 어느 하나에 있어서, MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II 분자의 발

현을 감소시키는 하나 이상의 변형은 MHC 클래스 I 분자 및 MHC 클래스 II 분자의 발현을 감소시키는 하나 이상의 변형으로 이루어진, 조작된 세포.

[3051] 구현예 III-481. 구현예 388 내지 482 중 어느 하나에 있어서, 증가된 발현은 증가된 mRNA 발현을 포함하는, 조작된 세포.

[3052] 구현예 III-482. 구현예 388 내지 483 중 어느 하나에 있어서, 증가된 발현은 증가된 단백질 발현 또는 단백질 활성을 포함하는, 조작된 세포.

[3053] 구현예 III-483. 구현예 388 내지 484 중 어느 하나에 있어서, 증가된 발현은 i) 하나 이상의 관용원성 인자, 또는 ii) 하나 이상의 추가의 관용원성 인자의 발현을 암호화하거나 조절하는 유전자의 활성을 증가시키는 것을 포함하는, 조작된 세포.

[3054] 구현예 III-484. 구현예 485에 있어서, 유전자는 내인성 유전자이고, 하나 이상의 변형은 내인성 프로모터의 하나 이상의 변형을 포함하는, 조작된 세포.

[3055] 구현예 III-485. 구현예 485에 있어서, 유전자는 내인성 유전자이고, 하나 이상의 변형은 이종 프로모터의 도입을 포함하는, 조작된 세포.

[3056] 구현예 III-486. 구현예 487에 있어서, 이종 프로모터는 CAG 프로모터, 거대세포바이러스[CMV] 프로모터, EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[EBV] 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터, 및 UBC 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3057] 구현예 III-487. 구현예 388 내지 481 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포가 하나 이상의 이식유전자를 포함하는, 조작된 세포.

[3058] 구현예 III-488. 구현예 489에 있어서, 상기 하나 이상의 이식유전자가 상기 하나 이상의 관용원성 인자 또는 상기 하나 이상의 추가의 관용원성 인자 중 적어도 하나를 암호화하는, 조작된 세포.

[3059] 구현예 III-489. 구현예 489 또는 490에 있어서, 하나 이상의 이식유전자는 하나 이상의 추가의 관용원성 인자 중 적어도 하나를 암호화하는, 조작된 세포.

[3060] 구현예 III-490. 구현예 489 내지 491 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 이식유전자는 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는, 조작된 세포.

[3061] 구현예 III-491. 구현예 489 내지 492 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 이식유전자는 하나 이상의 조절 요소를 포함하는, 조작된 세포.

[3062] 구현예 III-492. 구현예 489 내지 493 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 이식유전자는 상기 하나 이상의 조절 요소에 작동 가능한 상태로 연결된, 조작된 세포.

[3063] 구현예 III-493. 구현예 493 또는 구현예 107에 있어서, 하나 이상의 조절 요소는 하나 이상의 프로모터, 인핸서, 인트론, 종결자, 번역 개시 신호, 폴리아데닐화 신호, 복제 요소, RNA 처리 및 유출 요소, 전위인자, 전위 효소, 절연체, 내부 리보솜 진입 부위[IRES], 5'UTR, 3'UTR, mRNA 3' 말단 처리 서열, 경계 요소, 좌위 조절 영역[LCR], 기질 부착 영역[MAR], 재조합 또는 카세트 교환 서열, 링커 서열, 분비 신호, 내성 마커, 고정 펩티드, 국재화 신호, 융합 태그, 친화도 태그, 샤페로닌, 및 단백질분해효소를 포함하는, 조작된 세포.

[3064] 구현예 III-494. 구현예 493, 구현예 495 또는 구현예 107 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 조절 요소는 프로모터를 포함하는, 조작된 세포.

[3065] 구현예 III-497. 구현예 495 또는 496에 있어서, 프로모터는 CAG 프로모터, 거대세포바이러스[CMV] 프로모터, EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[EBV] 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터, 및 UBC 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3066] 구현예 III-498. 구현예 489 내지 497 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포가 하나 이상의 이식유전자를 암호화하는 하나 이상의 벡터를 포함하는, 조작된 세포.

[3067] 구현예 III-499. 구현예 498에 있어서, 하나 이상의 벡터 중 적어도 하나는 다중시스트론성 벡터인, 조작된 세포.

[3068] 구현예 III-500. 구현예 499에 있어서, 다중시스트론성 벡터는 하나 이상의 관용원성 인자 또는 하나 이상의 추가의 관용원성 인자 중 적어도 하나를 암호화하는, 조작된 세포.

[3069] 구현예 III-501. 구현예 499 또는 구현예 113에 있어서, 다중시스트론성 벡터는 하나 이상의 관용원성 인자 또는 하나 이상의 추가의 관용원성 인자 중 적어도 하나를 추가로 암호화하는, 조작된 세포.

[3070] 구현예 III-502. 구현예 500 또는 구현예 501에 있어서, 다중시스트론성 벡터는 하나 이상의 추가 분자 중 적어도 하나를 추가로 암호화하는, 조작된 세포.

[3071] 구현예 III-503. 구현예 489 내지 502 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 이식유전자는 하나 이상의 링커 서열에 의해 분리되는, 조작된 세포.

[3072] 구현예 III-504. 구현예 503에 있어서, 하나 이상의 링커 서열은 IRES 서열 또는 절단가능한 펩티드 서열을 포함하는, 조작된 세포.

[3073] 구현예 III-505. 구현예 504에 있어서, 절단가능한 펩티드 서열은 자기-절단가능한 펩티드, 임의로 2A 펩티드를 포함하는, 조작된 세포.

[3074] 구현예 III-506. 구현예 505에 있어서, 2A 펩티드는 F2A 서열, E2A 서열, P2A 서열 및 T2A 서열로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3075] 구현예 III-507. 구현예 504 내지 506 중 어느 하나에 있어서, 절단가능한 펩티드 서열은 단백질분해효소 절단가능한 서열 또는 화학적으로 절단가능한 서열을 포함하는, 조작된 세포.

[3076] 구현예 III-508. 구현예 500 내지 507 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 관용원성 인자, 상기 하나 이상의 추가의 관용원성 인자, 및/또는 상기 하나 이상의 추가 분자가 동일한 프로모터에 작동 가능한 상태로 연결되는, 조작된 세포.

[3077] 구현예 III-509. 구현예 508에 있어서, 상기 프로모터는 항구적 프로모터인, 조작된 세포.

[3078] 구현예 III-510. 구현예 508 또는 509에 있어서, 프로모터는 CAG 프로모터, 거대세포바이러스[CMV] 프로모터, EF1α 프로모터, EF1α 짧은 프로모터, PGK 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스[MMTV] 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터, 엡스타인 바 바이러스[EBV] 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스[RSV] 프로모터, 및 UBC 프로모터로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3079] 구현예 III-511. 구현예 492 내지 510 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 키메라 항원 수용체[CAR]을 포함하는, 조작된 세포.

[3080] 구현예 III-512. 구현예 511에서, CAR은 신호 펩티드, CD19에 특이적인 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 공동자극 도메인 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 조작된 세포.

[3081] 구현예 III-513. 구현예 511 또는 구현예 125에 있어서, CAR은 CD19, CD20, CD22, CD38, CD123, CD138, BCMA, 또는 이들의 임의의 조합에 특이적인, 조작된 세포.

[3082] 구현예 III-514. 구현예 513에 있어서, CAR은 CD19/CD22-이중특이적 CAR인, 조작된 세포.

[3083] 구현예 III-515. 구현예 492 내지 514 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 추가 분자는 하나 이상의 안전 스위치를 포함하는, 조작된 세포.

[3084] 구현예 III-516. 구현예 515에 있어서, 하나 이상의 안전 스위치는 조작된 세포의 제어된 사멸을 가능하게 하는, 조작된 세포.

[3085] 구현예 III-517. 구현예 515 또는 516에 있어서, 하나 이상의 안전 스위치는 약물 또는 전구약물의 존재하에, 또는 선택적 외인성 화합물에 의한 활성화시에 제어된 세포 사멸을 유도하는, 조작된 세포.

[3086] 구현예 III-518. 구현예 515 내지 517 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 안전 스위치는 조작된 세포의 세포 자멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질이거나 이를 포함하는, 조작된 세포.

[3087] 구현예 III-519. 구현예 518에 있어서, 조작된 세포의 세포자멸사를 유도할 수 있는 유도성 단백질은 카스파제 단백질인, 조작된 세포.

[3088] 구현예 III-520. 구현예 519에 있어서, 카스파제 단백질은 카스파제 9인, 조작된 세포.

[3089] 구현예 III-521. 구현예 515 내지 520 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 안전 스위치는 하나 이상의 자살 유전자를 포함하는, 조작된 세포.

[3090] 구현예 III-522. 구현예 521에 있어서, 하나 이상의 자살 유전자는 시토신 탈아미노효소[CyD], 헤르페스바이러스 티미딘 키나제[HSV-Tk], 유도성 카스파제 9[iCaspase9], 및 라파마이신-활성화된 카스파제 9[rapaCasp9]로 이루어진 군에서 선택된 것인, 조작된 세포.

[3091] 구현예 III-523. 구현예 489 내지 522 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 이식유전자 중 적어도 하나는 조작된 세포의 유전체 내로 통합되는, 조작된 세포.

[3092] 구현예 III-524. 구현예 523에 있어서, 통합은 조작된 세포의 유전체 내로의 비-표적화된 삽입에 의한, 조작된 세포.

[3093] 구현예 III-525. 구현예 524에 있어서, 통합은 렌티바이러스 벡터를 이용하여 조작된 세포의 유전체 내로의 비-표적화된 삽입에 의한, 조작된 세포.

[3094] 구현예 III-526. 구현예 523에 있어서, 통합은 조작된 세포의 표적 유전체 좌위 내로의 표적화된 삽입에 의한, 조작된 세포.

[3095] 구현예 III-527. 구현예 526에 있어서, 표적화된 삽입은 상동성 유도 복구를 갖는 핵산분해효소-매개 유전자 편집에 의한 것인, 조작된 세포.

[3096] 구현예 III-528. 구현예 526 또는 527에 있어서, 표적 유전체 좌위는 알부민 유전자좌, ABO 유전자좌, B2M 유전자좌, CIITA 유전자좌, CCR5 유전자좌, CD142 유전자좌, CLYBL 유전자좌, CXCR4 유전자좌, F3 유전자좌, FUT1 유전자좌, HMGB1 유전자좌, KDM5D 유전자좌, LRP1 유전자좌, MIC-A 유전자좌, MIC-B 유전자좌, PPP1R12C (AAVS1로도 알려짐) 유전자좌, RHD 유전자좌, ROSA26 유전자좌, 피난항 유전자좌, SHS231 좌위, TAP1 유전자좌, TRAC 유전자좌, 및 TRBC 유전자좌로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3097] 구현예 III-529. 구현예 388 내지 528 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포의 유전체는 감소된 발현을 갖는 구현예 388 내지 141 중 어느 하나의 하나 이상의 분자를 암호화하는 하나 이상의 유전자에서의 하나 이상의 유전자 편집을 포함하는, 조작된 세포.

[3098] 구현예 III-530. 구현예 388 내지 529 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 유전체 편집 복합체를 포함하는, 조작된 세포.

[3099] 구현예 III-531. 구현예 530에 있어서, 유전체 편집 복합체는 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티를 포함하는, 조작된 세포.

[3100] 구현예 III-532. 구현예 531에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 유전체 편집 복합체를 표적 좌위에 국재화시키고, 임의로 유전체 표적화 엔티티는 핵산 안내 표적화 엔티티인, 조작된 세포.

[3101] 구현예 III-533. 구현예 531 또는 구현예 532에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 전사 활성자 유사 효과기 [TALE] 결합 단백질, 아연 집게[ZF] 결합 단백질, 메가핵산분해효소, Cas 단백질, TnpB 단백질, 귀소 핵산내부분해효소, 핵산내부분해효소 결핍-Cas 단백질, 효소 비활성 Cas 단백질, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, 또는 이들의 기능적 부분을 포함하는, 조작된 세포.

[3102] 구현예 III-534. 구현예 531 내지 533 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB,

dCas(D10A), dCas(H840A), dCas13a, dCas13b, 핵심 Cas 단백질, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, CRISPR-연관 전위효소, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3103] 구현예 III-535. 구현예 531에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 표적 좌위를 절단, 탈아미노화, 틈내기, 중합, 조사, 통합, 절개, 풀기, 끊기, 변경, 메틸화, 탈메틸화하거나 아니면, 조작된 세포.

[3104] 구현예 III-536. 구현예 531 또는 구현예 535에 있어서, 유전체 변형 엔티티는 재조합효소, 통합효소, 전위효소, 핵산내부분해효소, 핵산말단분해효소, 틈내기효소, 나선효소, 중합효소, 역전사효소, 탈아미노효소, 플립파제, 메틸화효소, 탈메틸화효소, 아세틸화효소, 핵산 변형 단백질, RNA 변형 단백질, DNA 변형 단백질, 아르고노트 단백질, 후성적 변형 단백질, 히스톤 변형 단백질, 또는 이들의 기능적 부분을 포함하는, 조작된 세포.

[3105] 구현예 III-537. 구현예 536에 있어서, 여기서 유전체 변형 엔티티는 Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k(C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csd1, Csd2, Cas5d, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Cas5e, Csf1, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csn1, Csn2, Cst1, Cst2, Cas5t, Csh1, Csh2, Cas5h, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5, Cas5a, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3, Csy4, Mad7, SpCas9, SpCas9의 고정확도 변이체인 eSpCas9, SpCas9-HF1, HypaSpCas9, HeFSpCas, 및 evoSpCas9, SaCas9, NmeCas9, CjCas9, StCas9, TdCas9, LbCas12a, AsCas12a, AacCas12b, BhCas12b v4, TnpB, FokI, dCas (D10A), dCas(H840A), dCas13a, dCas13b, 핵심 Cas 단백질, 핵산 프로그램 가능 DNA 결합 단백질, RNA-안내 핵산분해효소, 귀소 핵산내부분해효소, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소, CRISPR-연관 전위효소, APOBEC1, 시티딘 탈아미노효소, 아데노신 탈아미노효소, 우라실 당화효소 억제제[UGI], 아데닌 염기 편집기[ABE], 시토신 염기 편집기[CBE], 역전사효소, 세린 통합효소, 중합효소, 아데닌에서 티민으로, 즉 'ATBE'(또는 티민에서 아데닌으로, 즉 'TABE') 전환 염기 편집기, 10-11 전좌 메틸시토신 이산소화효소[TET], TET1, TET3, TET1CD, 히스톤 아세틸기전달효소 p300, 히스톤 메틸기전달효소 SMYD3, 히스톤 메틸기전달효소 PRDM9, H3K79 메틸기전달효소 DOT1L, 전사 억제자, 또는 이들의 기능적 부분으로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3106] 구현예 III-538. 구현예 531 내지 537 중 어느 하나에 있어서, 유전체 표적화 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 단일 폴리펩티드의 상이한 도메인인, 조작된 세포.

[3107] 구현예 III-539. 구현예 531 내지 538 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 함께 작동 가능한 상태로 연결된 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 조작된 세포.

[3108] 구현예 III-540. 구현예 531 내지 538 중 어느 하나에 있어서, 유전체 편집 엔티티 및 유전체 변형 엔티티는 서로 연결되지 않은 두 개의 상이한 폴리펩티드인, 조작된 세포.

[3109] 구현예 III-541. 구현예 462 내지 469 중 어느 하나에 있어서, 변형은 유전체 변형 단백질에 의한, 조작된 세포.

[3110] 구현예 III-542. 구현예 470에 있어서, 유전체 변형 단백질에 의한 변형은 CRISPR-연관 전위효소, 프라임 편집, 또는 부위 특이적 표적화 요소를 통한 프로그램 가능 첨가[PASTE]에 의한 변형인, 조작된 세포.

[3111] 구현예 III-543. 구현예 470 또는 471에 있어서, 유전체 변형 단백질에 의한 변형은 핵산분해효소-매개 유전자 편집인, 조작된 세포.

[3112] 구현예 III-544. 구현예 472에 있어서, 핵산분해효소-매개 유전자 편집은 B2M 유전자를 표적화하는 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], TAL-효과기 핵산분해효소[TALEN], 또는 CRISPR-Cas 조합에 의한 것이고, 임의로 Cas는 Cas9 또는 Cas12로부터 선택되는, 조작된 세포.

[3113] 구현예 III-545. 구현예 470 내지 472 중 어느 하나에 있어서, 유전체 변형 단백질에 의한 변형은 Cas3, Cas4, Cas5, Cas8a, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas12, Cas12a(Cpf1), Cas12b(C2c1), Cas12c(C2c3), Cas12d(CasY), Cas12e(CasX), Cas12f(C2c10), Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas12k (C2c5), Cas13, Cas13a(C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c4, C2c8, C2c9, Cmr5, Cse1, Cse2, Csf1, Csm2, Csn2, Csx10, Csx11, Csy1, Csy2, Csy3,

Mad7, 아연 집게 핵산분해효소[ZFN], 전사 활성자 유사 효과기 핵산분해효소[TALEN], 메가핵산분해효소 및 CRISPR-연관 전위효소로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질에 의해 수행되는, 조작된 세포.

[3114] 구현예 III-546. 구현예 473에 있어서, 핵산분해효소-매개 유전자 편집은 CRISPR-Cas 조합에 의한 것이고, CRISPR-Cas 조합은 B2M 유전자 내의 적어도 하나의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 안내 RNA[gRNA]를 포함하는, 조작된 세포.

[3115] 구현예 III-547. 구현예 475에 있어서, CRISPR-Cas 조합은 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 리보핵단백질[RNP] 복합체인, 조작된 세포.

[3116] 구현예 III-548. 구현예 1 내지 547 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 인간 세포 또는 동물 세포인 조작된 세포.

[3117] 구현예 III-549. 구현예 548에 있어서, 동물 세포는 돼지 세포, 소 세포, 또는 양 세포인, 조작된 세포.

[3118] 구현예 III-550. 구현예 548에 있어서, 조작된 세포는 인간 세포인 조작된 세포.

[3119] 구현예 III-551. 구현예 388 내지 550 중 어느 하나에 있어서, 줄기 세포 또는 전구세포인 조작된 세포.

[3120] 구현예 III-552. 구현예 551에 있어서, 조작된 세포는 줄기 세포 또는 전구세포에서 유도된 분화된 세포인, 조작된 세포.

[3121] 구현예 III-553. 구현예 551 또는 552에 있어서, 줄기 세포 또는 전구세포는 유도 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 상피 줄기 세포, 지방 줄기 세포, 생식세포계열 줄기 세포, 폐 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 만능 줄기 세포[PSC], 및 다능 줄기 세포로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3122] 구현예 III-554. 구현예 388 내지 550 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 만능 줄기 세포 또는 이의 자손에서 유래한 분화된 세포인 조작된 세포.

[3123] 구현예 III-555. 구현예 554에서, 만능 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포인, 조작된 세포.

[3124] 구현예 III-556. 구현예 388 내지 550 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 공여자 대상으로부터 단리된 일차 세포인, 조작된 세포.

[3125] 구현예 III-557. 구현예 556에 있어서, 공여자 대상은, 공여자 시료가 개별 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 조작된 세포.

[3126] 구현예 III-558. 구현예 388 내지 557 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포는 섬 세포, 베타 섬 세포, 췌장 섬 세포, 면역 세포, B 세포, T 세포, 자연 살해[NK] 세포, 자연 살해 T[NKT] 세포, 대식세포, 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 골격근 세포, 도파민성 신경세포, 망막 색소 상피 세포, 시세포, 간세포, 갑상선 세포, 피부 세포, 신경아교 전구세포, 신경 세포, 심장 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포[iPSC], 중간엽 줄기 세포[MSC], 배아 줄기 세포[ESC], 만능 줄기 세포[PSC], 및 혈액 세포로 이루어진 군에서 선택되는, 조작된 세포.

[3127] 구현예 III-559. 구현예 388 내지 558 중 어느 하나에 있어서, 세포는 ABO 혈액형 O인, 조작된 세포.

[3128] 구현예 III-560. 구현예 388 내지 559 중 어느 하나에 있어서, 세포는 기능성 ABO A 대립유전자 및/또는 기능성 ABO B 대립유전자를 포함하는, 조작된 세포.

[3129] 구현예 III-561. 구현예 388 내지 560 중 어느 하나에 있어서, 세포는 레수스 인자 음성[Rh-]인, 조작된 세포.

[3130] 구현예 III-562. 구현예 388 내지 560 중 어느 하나에 있어서, 세포는 레수스 인자 양성[Rh+]인, 조작된 세포.

[3131] 구현예 III-563. 구현예 388 내지 562 중 어느 하나의 조작된 세포를 생성하는 방법으로서,

[3132] a. 세포를 수득하는 단계, 및

[3133] b. 실시예 388 내지 562 중 임의의 실시예 중 하나 이상의 변형을 도입시키는 단계를 포함하는 방법.

[3134] 구현예 III-564. 구현예 563에 있어서, 하나 이상의 변형의 존재 및/또는 수준을 기준으로, 세포 집단에서 조작된 세포를 선택하는 단계를 더 포함하는 방법.

[3135] 구현예 III-565. 구현예 563 또는 564에 있어서, 세포는 줄기 세포 또는 전구세포이고, 방법은 줄기 세포 또는

전구세포를 분화시키는 단계를 더 포함하는, 방법.

[3136] 구현예 III-566. 구현예 563 또는 564에 있어서, 세포는 만능 줄기 세포 또는 그의 자손이고, 방법은 만능 줄기 세포 또는 그의 자손을 분화시키는 단계를 포함하는, 방법.

[3137] 구현예 III-567. 구현예 563 또는 564에 있어서, 세포는 일차 세포인, 방법.

[3138] 구현예 III-568. 구현예 563 내지 567 중 어느 하나에 있어서, 세포의 유전체 내로 하나 이상의 유전자 편집을 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

[3139] 구현예 III-569. 구현예 568에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집은 비-표적화된 삽입에 의해 세포의 유전체 내로 도입되는, 방법.

[3140] 구현예 III-570. 구현예 568에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집은 표적화된 삽입에 의해 세포의 유전체 내로 도입되는, 방법.

[3141] 구현예 III-571. 구현예 568 또는 570에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집은 구현예 388 내지 561 중 어느 하나의 하나 이상의 분자를 암호화하는 하나 이상의 유전자 내로 도입되는, 방법.

[3142] 구현예 III-572. 구현예 571에 있어서, 조작된 세포는 하나 이상의 편집된 유전자에 의해 암호화된 하나 이상의 분자의 증가된 발현을 갖는, 방법.

[3143] 구현예 III-573. 구현예 571 또는 572에 있어서, 조작된 세포는 하나 이상의 편집된 유전자에 의해 암호화된 하나 이상의 분자의 감소된 발현을 갖는, 방법.

[3144] 구현예 III-574. 구현예 568 내지 185 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집은 구현예 530 내지 547 중 어느 하나의 유전체 편집 복합체 중 적어도 하나를 사용하여 세포의 유전체 내로 도입되는, 방법.

[3145] 구현예 III-575. 구현예 568 내지 574 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 유전자 편집은 알부민 유전자좌 ABO 유전자좌, B2M 유전자좌, CIITA 유전자좌, CCR5 유전자좌, CD142 유전자좌, CLYBL 유전자좌, CXCR4 유전자좌, F3 유전자좌, FUT1 유전자좌, HMGB1 유전자좌, KDM5D 유전자좌, LRP1 유전자좌, MIC-A 유전자좌, MIC-B 유전자좌, PPP1R12C (AAVS1로도 알려짐) 유전자좌, RHD 유전자좌, ROSA26 유전자좌, 피난항 유전자좌, SHS231 좌위, TAP1 유전자좌, TRAC 유전자좌, 및 TRBC 유전자좌로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 표적 유전체 좌위에서, 세포의 유전체 내로 도입되는, 방법.

[3146] 구현예 III-576. 구현예 563 내지 575 중 어느 하나의 방법에 따라 생성된 조작된 세포.

[3147] 구현예 III-577. 구현예 388 내지 562 및 576 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 NK 세포 매개 세포독성을 회피하는 능력이 증가된, 조작된 세포.

[3148] 구현예 III-578. 구현예 388 내지 562, 576 및 577 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 성숙 NK 세포에 의한 감소된 세포 용해를 겪는, 조작된 세포.

[3149] 구현예 III-579. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 578 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 감소된 면역 반응을 유도하는, 조작된 세포.

[3150] 구현예 III-580. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 579 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 감소된 전신 면역 반응을 유도하는, 조작된 세포.

[3151] 구현예 III-581. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 580 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 동일한 유형의 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 감소된 국소 염증 반응을 유도하는, 조작된 세포.

[3152] 구현예 III-582. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 581 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 [동일한 유형의] 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 감소된 보체 경로 활성화를 유도하는, 조작된 세포.

[3153] 구현예 III-583. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 582 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 대상에게 투여 시 생착 및 작용하는 능력을 보유하는, 조작된 세포.

[3154] 구현예 III-584. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 583 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 또는 조작된 세포에서 유래한 자손 또는 분화된 세포는 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 [동일한 유형의] 세포와 비교하여 대상에게 투여 시 생착 및 작용하는 능력이 증가된, 조작된 세포.

[3155] 구현예 III-585. 구현예 388 내지 562 및 576 내지 584 중 어느 하나의 복수의 조작된 세포를 포함하는, 조작된 세포 집단.

[3156] 구현예 III-586. 구현예 585에 있어서, 집단 내에서 세포의 적어도 약 30% 이상이 복수의 조작된 세포를 포함하는, 조작된 세포 집단.

[3157] 구현예 III-587. 구현예 585 또는 구현예 586에 있어서, 복수의 조작된 세포는 하나 초과의 공여자 대상으로부터 단리된 일차 세포인, 조작된 세포 집단.

[3158] 구현예 III-588. 구현예 587에 있어서, 각각의 공여자 대상은, 공여자 시료가 개별 공여자에게서 수득되는 시점에, 건강하거나 질환 또는 병태가 있는 것으로 의심되지 않는, 조작된 세포 집단.

[3159] 구현예 III-589. 구현예 1 내지 562 및 576 내지 196 중 어느 하나의 조작된 세포 또는 구현예 585 내지 588 중 어느 하나의 조작된 세포 집단을 포함하는 조성물의 제조 방법으로서,

[3160] a. 구현예 548 내지 562 중 어느 하나의 세포를 수득하는 단계,

[3161] b. 구현예 388 내지 562 중 어느 하나의 하나 이상의 변형을 세포 내로 도입시키는 단계

[3162] c. 하나 이상의 변형의 수준을 기준으로, 세포 집단에서 조작된 세포를 선택하거나, 조작된 세포 집단을 선택하는 단계

[3163] d. 선택된 조작된 세포 또는 선택된 조작된 세포 집단을 포함하는 조성물을 제형화하는 단계를 포함하는, 방법.

[3164] 구현예 III-590. 구현예 589에 있어서, 구현예 388 내지 561 중 어느 하나에서의 하나 이상의 변형된 분자의 세포 표면 발현 수준을 기준으로, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단을 선택하는 것을 포함하는 방법.

[3165] 구현예 III-591. 구현예 589 또는 구현예 590에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단에서 감소된 발현을 갖는 하나 이상의 변형된 분자의 수준을 기준으로 선택되는, 방법.

[3166] 구현예 III-592. 구현예 589 내지 591 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단에서 증가된 발현을 갖는 하나 이상의 변형된 분자의 수준을 기준으로 선택되는, 방법.

[3167] 구현예 III-593. 구현예 589 내지 592 중 어느 하나에 있어서, 방법은 조성물을 약학적으로 허용되는 첨가제, 담체, 희석제, 또는 부형제 중에서 제형화하는 것을 포함하는 방법.

[3168] 구현예 III-594. 구현예 593에 있어서, 약학적으로 허용되는 첨가제, 담체, 희석제, 또는 부형제는 약학적으로 허용되는 완충액을 포함하는, 방법.

[3169] 구현예 III-595. 구현예 594에 있어서, 약학적으로 허용되는 완충액은 중성의 완충 식염수 또는 인산염 완충 식염수를 포함하는, 방법.

[3170] 구현예 III-596. 구현예 589 내지 595 중 어느 하나에 있어서, 방법은 조성물을 Plasma-Lyte A®, 덱스트로스, 덱스트란, 염화나트륨, 인간 혈청 알부민[HSA], 디메틸술폭시드(DMSO), 또는 이들의 조합을 이용하여 제형화하는 것을 포함하는 방법.

[3171] 구현예 III-597. 구현예 589 내지 596 중 어느 하나에 있어서, 방법은 조성물을 동결보호제를 이용하여 제형화하는 것을 포함하는 방법.

[3172] 구현예 III-598. 구현예 589 내지 597 중 어느 하나에 있어서, 방법은 조성물을 동결보호제를 포함하는 무혈청 동결보존 배지 중에 제형화하는 것을 포함하는 방법.

[3173] 구현예 III-599. 구현예 597 또는 구현예 598에 있어서, 동결보호제는 DMSO를 포함하는, 방법.

[3174] 구현예 III-600. 구현예 598 또는 구현예 599에 있어서, 무혈청 동결보존 배지는 약 5% 내지 약 10% DMSO (v/v)를 포함하는, 방법.

[3175] 구현예 III-601. 구현예 598 내지 600 중 어느 하나에 있어서, 무혈청 동결보존 배지는 약 10% DMSO (v/v)를 포함하는, 방법.

[3176] 구현예 III-602. 구현예 589 내지 601 중 어느 하나에 있어서, 방법은 조성물을 용기에 저장하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

[3177] 구현예 III-603. 구현예 589 내지 602 중 어느 하나에 있어서, 방법은 단계 (b) 전에 세포를 해동시키는 단계를 더 포함하는 방법.

[3178] 구현예 III-604. 구현예 589 내지 603 중 어느 하나에 있어서, 방법은 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물을 동결시키는 단계를 더 포함하는 방법.

[3179] 구현예 III-605. 구현예 604에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 단계 (b) 후에 동결되는, 방법.

[3180] 구현예 III-606. 구현예 605에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 단계 (c) 전에 해동되는, 방법.

[3181] 구현예 III-607. 구현예 604에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 단계 (c) 후에 해동되는, 방법.

[3182] 구현예 III-608. 구현예 607에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 단계 (d) 전에 해동되는, 방법.

[3183] 구현예 III-609. 구현예 604에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 단계 (c) 후에 해동되는, 방법.

[3184] 구현예 III-610. 구현예 589 내지 609 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 단계 (d) 후에 동결되는, 방법.

[3185] 구현예 III-611. 구현예 1 내지 562 및 576 내지 196 중 어느 하나의 조작된 세포 또는 구현예 585 내지 588 중 어느 하나의 조작된 세포 집단을 포함하는 조성물.

[3186] 구현예 III-612. 구현예 589 내지 610 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 조성물.

[3187] 구현예 III-613. 구현예 611 또는 구현예 612에 있어서, 조성물은 약학적으로 허용되는 첨가제, 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 조성물.

[3188] 구현예 III-614. 구현예 611 내지 613 중 어느 하나에 있어서, 조성물은 멸균된 조성물.

[3189] 구현예 III-615. 구현예 612 내지 614 중 어느 하나의 조성물을 포함하는 용기.

[3190] 구현예 III-616. 구현예 615에 있어서, 용기는 멸균 백인 용기.

[3191] 구현예 III-617. 구현예 616에 있어서, 멸균 백은 동결보존 가능한 백인 용기.

[3192] 구현예 III-618. 구현예 612 내지 614 중 어느 하나의 조성물 또는 구현예 615 내지 617 중 어느 하나의 용기를 포함하는 키트.

[3193] 구현예 III-619. 구현예 618에 있어서, 키트는 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단을 사용하기 위한 설명서를 더 포함하는 키트.

[3194] 구현예 III-620. 구현예 1 내지 562 및 576 내지 196 중 어느 하나의 조작된 세포, 구현예 585 내지 588 중 어느 하나의 조작된 세포 집단, 또는 구현예 611 내지 613 중 어느 하나의 조성물의 유효량을 대상에게 투여하는 단계를 포함하며, 임의로 질환 또는 병태는 세포 결함인, 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상에서 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

[3195] 구현예 III-621. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 당뇨병, 암, 혈관신생 장애, 안구 질환, 갑상선 질환, 피부 질환 및 간 질환으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[3196] 구현예 III-622. 구현예 620 또는 621에 있어서, 병태 또는 질환은 당뇨병과 연관되거나, 당뇨병이고, 임의로 당뇨병은 I형 당뇨병인, 방법.

[3197] 구현예 III-623. 구현예 622에 있어서, 조작된 세포 집단은 베타 섬 세포를 포함하는 섬 세포 집단인, 방법.

[3198] 구현예 III-624. 구현예 623에 있어서, 섬 세포는 섬 전구세포, 미성숙 섬 세포, 및 성숙 섬 세포로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[3199] 구현예 III-625. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 혈관 병태 또는 질환과 연관되거나 혈관 병태 또는 질환인, 방법.

[3200] 구현예 III-626. 구현예 625에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 내피 세포를 포함하는, 방법.

[3201] 구현예 III-627. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 자가면역 갑상선염과 연관되거나 자가면역 갑상선염인, 방법.

[3202] 구현예 III-628. 구현예 627에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 갑상선 전구세포를 포함하는, 방법.

[3203] 구현예 III-629. 실시예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 간 질환과 연관되거나 간 질환인, 방법.

[3204] 구현예 III-630. 구현예 629에 있어서, 간 질환은 간의 경변증을 포함하는, 방법.

[3205] 구현예 III-631. 구현예 629 또는 630에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 간세포 또는 간 전구세포를 포함하는, 방법.

[3206] 구현예 III-632. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 각막 질환과 연관되거나 각막 질환인, 방법.

[3207] 구현예 III-633. 구현예 632에 있어서, 각막 질환은 폭스 이상증 또는 선천적 유전성 내피 이상증인, 방법.

[3208] 구현예 III-634. 구현예 632 또는 633에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 각막 내피 전구세포 또는 각막 내피 세포를 포함하는, 방법.

[3209] 구현예 III-635. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 신장 질환과 연관되거나 신장 질환인, 방법.

[3210] 구현예 III-636. 구현예 635에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 신장 전구세포 또는 신장 세포를 포함하는 것인, 방법.

[3211] 구현예 III-637. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질병은 암과 연관되거나 암인, 방법.

[3212] 구현예 III-638. 구현예 637에 있어서, 암은 B 세포 급성 림프아구성 백혈병[B-ALL], 미만성 거대 B-세포 림프종, 간암, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 급성 골수성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 위암, 위 선암종, 췌장 선암종, 교모세포종, 신경모세포종, 폐 편평 세포 암종, 간세포 암종, 및 방광암으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[3213] 구현예 III-639. 구현예 637 또는 638에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포를 포함하는, 방법.

[3214] 구현예 III-640. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 조혈 질환 또는 장애와 연관되거나 조혈 질환 또는 장애인, 방법.

[3215] 구현예 III-641. 구현예 640에 있어서, 조혈 질환 또는 장애는 골수이형성증, 무형성 빈혈, 판코니(Fanconi) 빈혈, 발작성 야간 혜모글로빈뇨, 낫세포병, 다이아몬드 블랙판 빈혈, 샤크만 다이아몬드 장애, 코스트만 증후군, 만성 육아종성 질환, 부신백질이영양증, 백혈구 부착 결핍, 혈우병, 지중해 빈혈, 베타-지중해 빈혈, 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병[ALL], 급성 골수성(골수) 백혈병[AML], 성인 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병[CLL], B-세포 만성 림프구성 백혈병[B-CLL], 만성 골수성 백혈병[CML], 소아 만성 골수성 백혈병[CML], 및 소아 골수성 백혈병[JMML], 중증 복합 면역결핍 질환[SCID], X-연관 중증 복합 면역결핍, 비스코트-올드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군[WAS], 아데노신-탈아미노효소[ADA] 결핍, 만성 육아종증, 체디악-히가시 증후군, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종[NHL] 또는 AIDS인, 방법.

[3216] 구현예 III-642. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 백혈병 또는 골수종과 연관되거나 백혈병 또는 골수종인, 방법.

[3217] 구현예 III-643. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 자가면역 질환 또는 병태와 연관되거나 자가면역 질환 또는 병태인, 방법.

[3218] 구현예 III-644. 구현예 643에 있어서, 자가면역 질환은 급성 파종성 뇌척수염, 급성 출혈성 백질뇌염, 애디슨병, 무감마글로불린혈증, 원형 탈모증, 근위축성 측삭 경화증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 항합성효소 증후군, 아토피성 알레르기, 자가면역 무형성 빈혈, 자가면역 심근병증, 자가면역 장질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환, 자가면역 림프증식 증후군, 자가면역 말초 신경병증, 자가면역 췌장염, 자

가면역 다내분비 증후군, 자가면역 프로게스테론 피부염, 자가면역 혈소판감소성 자반증, 자가면역 두드러기, 자가면역 포도막염, 발로병, 발로 동심성 경화증, 베체트 증후군, 베르거병, 비커스태프 뇌염, 블라우 증후군, 물집유사천포창, 암, 캐슬맨병, 셀리악병, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 만성 재발성 다초점 골수염, 처그-스트라우스(Churg-Strauss) 증후군, 흉터유사천포창, 코간 증후군, 한랭 응집소 질환, 보체 성분 2 결핍, 두개골 동맥염, CREST 증후군, 크론병, 쿠싱 증후군, 피부 백혈구 파괴성 혈관염, 데고병, 델컴병, 피부병, 포진성 피부염, 피부근염, 1형 당뇨병, 미만성 피부 전신 경화증, 드레슬러 증후군, 원반성 홍반성 루푸스, 습진, 부착부염 관련 관절염, 호산구성 근막염, 호산구성 위장염, 후천성 수포성 표피박리증, 결절성 홍반, 본태성 혼합형 한랭글로불린혈증, 에반 증후군, 진행성 골화섬유형성이상, 섬유성 폐포염, 위염, 위장관 천포창, 거대 세포 동맥염, 사구체신염, 굿파스처(good pasture's) 증후군, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군[GBS], 하시모토 뇌염, 하시모토 갑상선염, 용혈성 빈혈, 헤노흐-쇤라인 자반병, 임신성 헤르페스, 저감마글로불린혈증, 특발성 염증성 탈수초 질환, 특발성 폐섬유증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, IgA 신병증, 봉입체 근염, 염증성 탈수초 다발신경병증, 간질성 방광염, 소아 특발성 관절염, 소아 류마티스성 관절염, 카와사키병, 램버트-이튼 근무력 증후군, 백혈구 파괴성 혈관염, 편평 태선, 공막 태선, 선형 IgA 질환[LAD], 루게릭병, 루포이드 간염, 홍반루푸스, 마지드 증후군, 메니에르병, 현미경적 다발혈관염, 밀러-피셔 증후군, 혼합형 결합 조직질환, 국소피부경화증, 무차-하버만병, 다발성 경화증, 중증근무력증, 근육염, 시신경 신우신염, 신경근긴장증, 안구 흉터유사천포창, 안구간대경련 근간대경련 증후군, 오드 갑상선염, 회귀성 류마티즘, 방종양성 소뇌 변성, 발작성 야간 혈색소뇨증[PNH], 패리 롬베르그 증후군, 파슨나주-터너 증후군, 평면부염, 천포창, 심상성천포창, 악성 빈혈, 정맥성 뇌척수염, POEMS 증후군, 결절성다발동맥염, 류마티스성 다발근통, 다발성근염, 원발성 담즙성 간경변, 원발성 경화성 담관염, 진행성 염증성 신경병증, 건선, 건선성 관절염, 괴저성 농피증, 순수 적혈구 무형성증, 라스무센 뇌염, 레이노 현상, 재발성 다발연골염, 라이터 증후군, 하지불안 증후군, 후복막 섬유증, 류마티스성 관절염, 류마티스열, 사르코이드증, 슈미트 증후군, 슈니츨러 증후군, 공막염, 경피증, 쇼그렌 증후군, 척추 관절 병증, 스틸병, 강직 인간 증후군, 아급성 세균성 심내막염, 수삭 증후군, 스위트 증후군, 시덴함 무도병, 교감 안염, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염, 톨로사-헌트 증후군, 횡단 척수염, 궤양성 결장염 미분화 결합 조직질환, 미분화 척추 관절 병증, 혈관염, 백반증 또는 베게너 육아종증인, 방법.

[3219] 구현예 III-645. 구현예 640 내지 644 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 조혈 줄기세포[HSC] 또는 이의 유도체를 포함하는, 방법.

[3220] 구현예 III-646. 구현예 620에 있어서, 병태 또는 질환은 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 신경퇴행성 질환 또는 병태, 주의력 결핍 과잉행동 장애[ADHD], 뚜렛 증후군[TS], 정신분열증, 정신병, 우울증, 신경정신 장애 뇌졸중, 또는 근위축성 측삭 경화증[ALS]과 연관되거나, 또는 질환 또는 병태는 파킨슨병, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 신경퇴행성 질환 또는 병태, 주의력 결핍 과잉행동 장애[ADHD], 뚜렛 증후군[TS], 정신분열증, 정신병, 우울증, 신경정신 장애 뇌졸중, 또는 근위축성 측삭 경화증[ALS]인, 방법.

[3221] 구현예 III-647. 구현예 646에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 신경 세포 또는 신경아교 세포를 포함하는, 방법.

[3222] 구현예 III-648. 구현예 620 내지 647 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단은 투여 전에 확장되고 동결보존되는 것인, 방법.

[3223] 구현예 III-649. 구현예 620 내지 648 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 정맥내 주사, 근육내 주사, 혈관내 주사, 또는 이식을 포함하는, 방법.

[3224] 구현예 III-650. 구현예 649에 있어서, 이식은 혈관내 주사 또는 근육내 주사를 포함하는, 방법.

[3225] 구현예 III-651. 구현예 620 내지 650 중 어느 하나에 있어서, 대상에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

[3226] 구현예 III-652. 구현예 620 내지 651 중 어느 하나에 있어서, 대상은 하나 이상의 면역억제제를 투여받은, 방법.

[3227] 구현예 III-653. 구현예 651 또는 652에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 소분자 또는 항체인, 방법.

[3228] 구현예 III-654. 구현예 651 내지 653 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 시클로스포린, 아자티오프린, 미코페놀산, 미코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드, 프레드니손, 메토트렉세이트, 금염, 설파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노미드, 미조리빈, 15-데옥시스퍼구알린, 6-메르캅토푸린, 시클로포스파미드, 라파마이신, 타크롤리무스(FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로불린, 티모펜틴 (티모신-α), 면역조절제,

및 면역억제제 항체로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[3229] 구현예 III-655. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 시클로스포린을 포함하는, 방법.

[3230] 구현예 III-656. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 미코페놀레이트 모페틸을 포함하는, 방법.

[3231] 구현예 III-657. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 코르티코스테로이드를 포함하는, 방법.

[3232] 구현예 III-658. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 시클로포스파미드를 포함하는, 방법.

[3233] 구현예 III-659. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 라파마이신을 포함하는, 방법.

[3234] 구현예 III-660. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 타크롤리무스(FK-506)를 포함하는, 방법.

[3235] 구현예 III-661. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 항-흉선세포 글로불린을 포함하는, 방법.

[3236] 구현예 III-662. 구현예 651 내지 654 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 하나 이상의 면역조절제인, 방법.

[3237] 구현예 III-663. 구현예 662에 있어서, 하나 이상의 면역조절제는 소분자 또는 항체인, 방법.

[3238] 구현예 III-664. 구현예 662 또는 663에 있어서, 항체는 IL-2 수용체의 p75, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-감마, TNF-알파, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD58, 및 이들의 임의의 리간드에 결합하는 항체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 수용체 또는 리간드에 결합하는 것인, 방법.

[3239] 구현예 III-665. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 투여 전에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3240] 구현예 III-666. 구현예 651 내지 665 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물을 투여하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3241] 구현예 III-667. 구현예 651 내지 666 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 대상에게 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물을 투여하기 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 전에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3242] 구현예 III-668. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 투여 후에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3243] 구현예 III-669. 구현예 651 내지 664 및 668 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물을 투여한지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3244] 구현예 III-670. 구현예 651 내지 664, 668 및 669 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물을 투여한지 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 후에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3245] 구현예 III-671. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여와 동일한 날에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3246] 구현예 III-672. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여 및/또는 제2 투여 후에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3247] 구현예 III-673. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된

세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여 및/또는 제2 투여 전에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3248] 구현예 III-674. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여 및/또는 제2 투여를 수행하기 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 전에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3249] 구현예 III-675. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여 및/또는 제2 투여를 수행하고 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 전에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3250] 구현예 III-676. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여 및/또는 제2 투여를 수행하고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3251] 구현예 III-677. 구현예 651 내지 664 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 제1 투여 및/또는 제2 투여를 수행하고 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주 이상 후에 대상에게 투여되거나 투여된 것인, 방법.

[3252] 구현예 III-678. 구현예 651 내지 677 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역억제제는 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단의 하나 이상의 변형을 포함하지 않는 세포의 면역 거부를 감소시키기 위해 투여되는 투여량과 비교하여 더 낮은 투여량으로 투여되는 것인 방법.

[3253] 구현예 III-679. 구현예 620 내지 678 중 어느 하나에 있어서, 대상에게 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물을 투여한 후에 제어된 세포 사멸을 유도하기 위해 안전 스위치를 활성화시키는 단계를 더 포함하는, 방법.

[3254] 구현예 III-680. 구현예 620 내지 679 중 어느 하나에 있어서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 대상에게 하나 이상의 면역억제제를 투여한 후 제어된 세포 사멸을 유도하기 위해 활성화되는, 방법.

[3255] 구현예 III-681. 구현예 620 내지 679 중 어느 하나에 있어서, 자살 유전자 또는 자살 스위치는 대상에게 하나 이상의 면역억제제를 투여하기 전에 제어된 세포 사멸을 유도하기 위해 활성화되는, 방법.

[3256] 구현예 III-682. 구현예 620 내지 681 중 어느 하나에 있어서, 안전 스위치는 대상에게 세포독성 또는 다른 부정적인 결과의 발생시 제어된 세포 사멸을 유도하기 위해 활성화되는, 방법.

[3257] 구현예 III-683. 구현예 620 내지 682 중 어느 하나에 있어서, 조작된 세포, 조작된 세포 집단, 또는 조성물의 고갈을 허용하는 작용제를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[3258] 구현예 III-684. 구현예 683에 있어서, 조작된 세포의 고갈을 허용하는 작용제는 세포 표면상에 발현된 단백질을 인식하는 항체인, 방법.

[3259] 구현예 III-685. 구현예 684에 있어서, 항체는 CCR4, CD16, CD19, CD20, CD30, EGFR, GD2, HER1, HER2, MUC1, PSMA, 및 RQR8을 인식하는 항체로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[3260] 구현예 III-686. 구현예 684 또는 685에 있어서, 항체는 모가물리주맙, AFM13, MOR208, 오비누투주맙, 우블리툭시맙, 오카라투주맙, 리툭시맙, 리툭시맙-R11b, 토무조툭시맙, RO5083945 (GA201), 세툭시맙, Hu14.18K322A, Hu14.18-IL2, Hu3F8, 디니툭시맙, c.60C3-R11c, 및 그의 동등생물의약품으로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

[3261] 구현예 III-687. 구현예 620 내지 684 중 어느 하나에 있어서, 방법은 세포 표면상에 하나 이상의 관용원성 인자 또는 하나 이상의 추가의 관용원성 인자를 인식하는 작용제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[3262] 구현예 III-688. 구현예 620 내지 687 중 어느 하나에 있어서, 방법은 대상에게 하나 이상의 추가적인 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

[3263] 구현예 III-689. 구현예 620 내지 687 중 어느 하나에 있어서, 대상은 하나 이상의 추가적인 치료제를 투여받은, 방법.

[3264] 구현예 III-690. 구현예 620 내지 689 중 어느 하나에 있어서, 방법은 방법의 치료 효능을 모니터링하는 단계를 더 포함하는 방법.

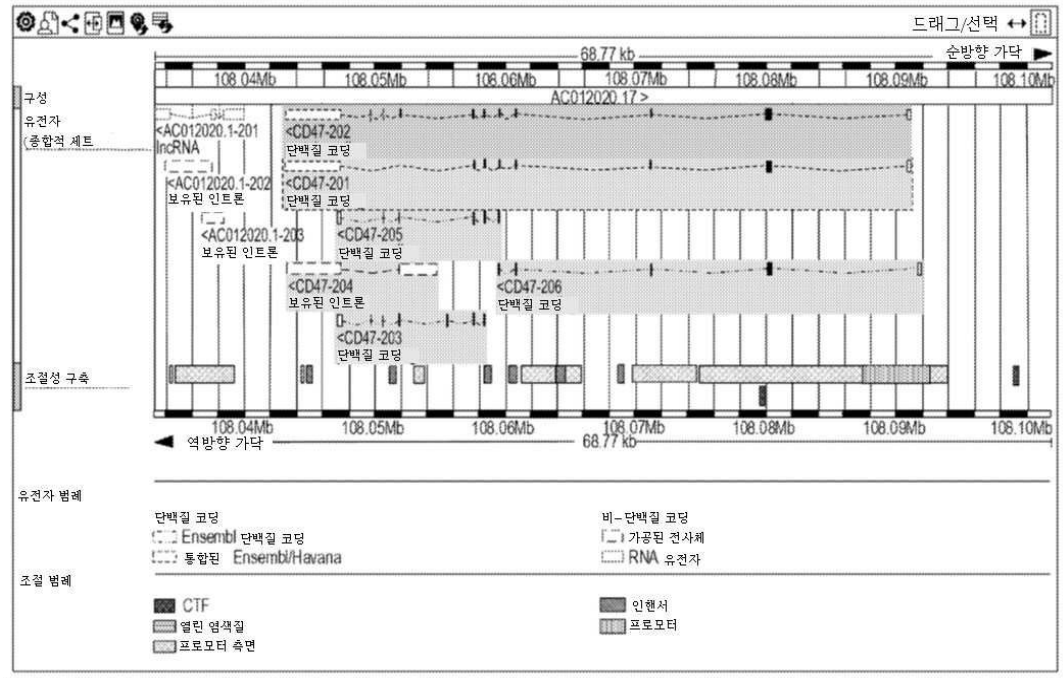
[3265] 구현예 III-691. 구현예 620 내지 690 중 어느 하나에 있어서, 방법의 예방 효능을 모니터링하는 단계를 더 포

함하는 방법.

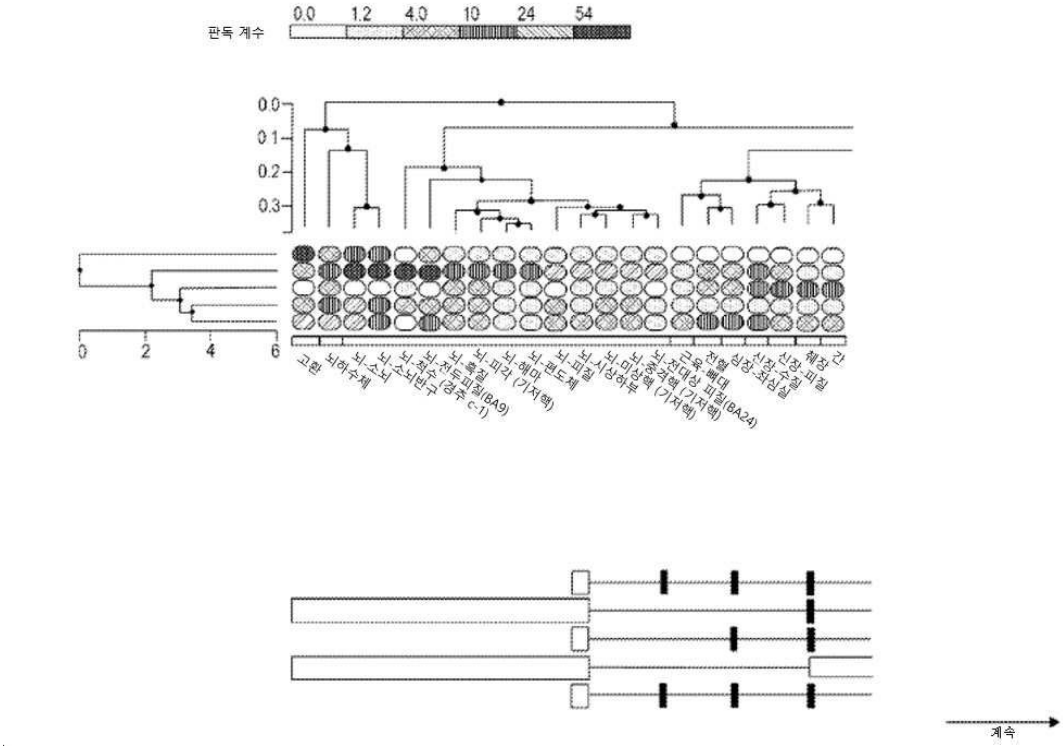
[3266] 구현예 III-692. 구현예 690 또는 691에 있어서, 방법은 하나 이상의 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 반복되는 방법.

도면

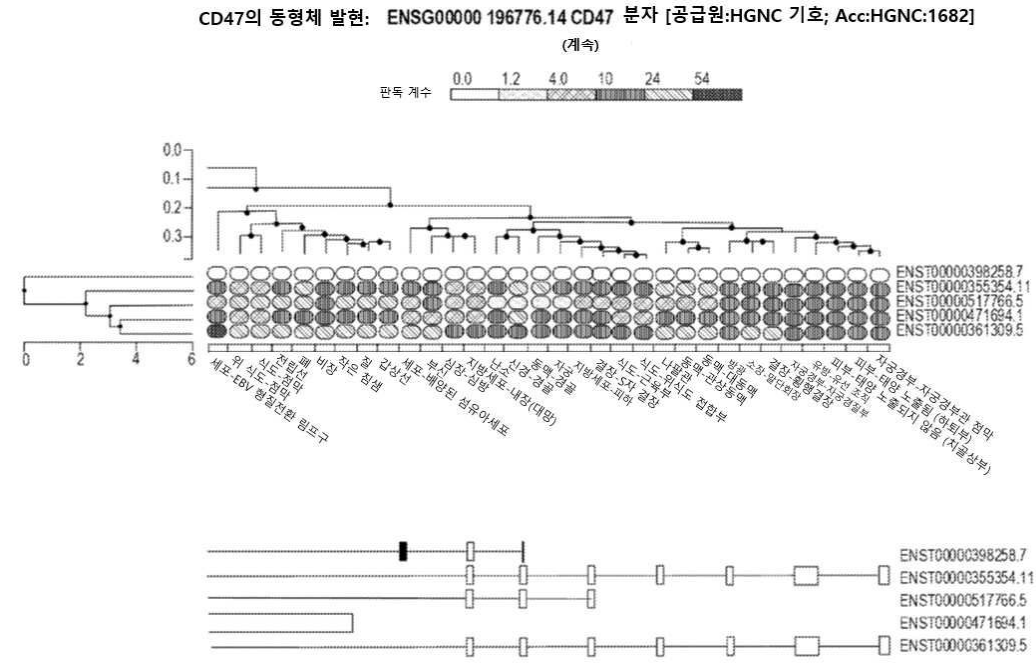
도면1



도면2a


CD47의 동형체 발현: ENSG00000 196776.14 CD47 분자 [공급원:HGNC 기호; Acc:HGNC:1682]
판독 계수
0.0
1.2
4.0
10
24
54
계속

도면2b


CD47의 동형체 발현: ENSG00000 196776.14 CD47 분자 [공급원:HGNC 기호; Acc:HGNC:1682]
(계속)
판독 계수
ENST00000398258.7
ENST00000355354.11
ENST00000517766.5
ENST00000471694.1
ENST00000361309.5

도면3

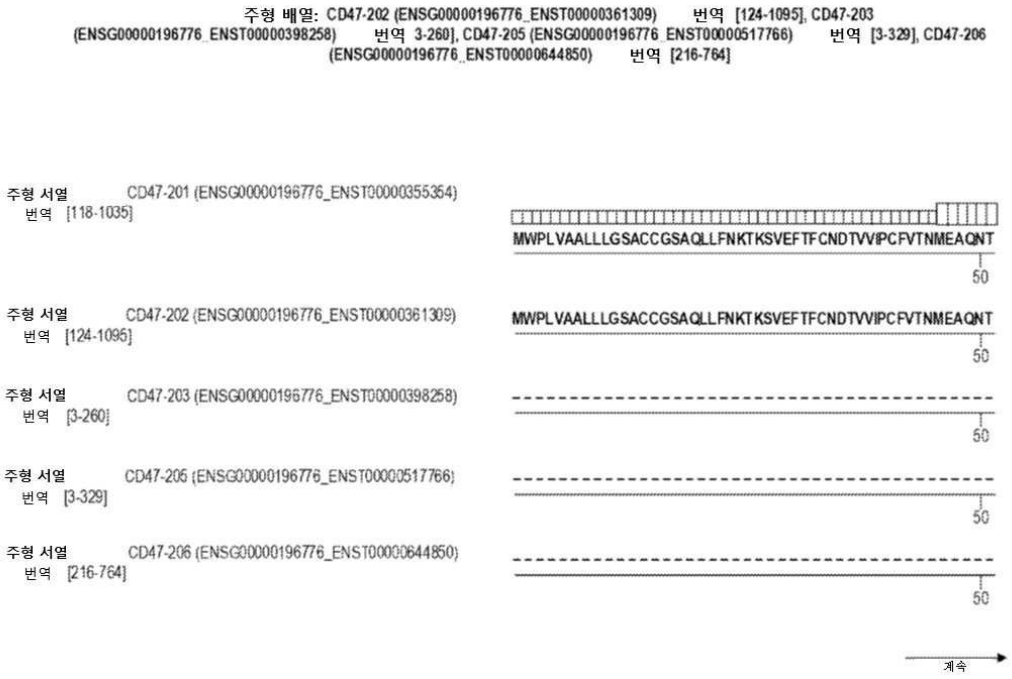
위상

주요 특징	위치(들)	설명	작동	그래프 도시	길이
위상 도메인	19 - 141	세포외 서열분석	추가 BLAST		123
막관통	142 - 162	나선 서열분석	추가 BLAST		21
위상 도메인	163 - 176	세포질 서열분석	추가 BLAST		14
막관통	177 - 197	나선 서열분석	추가 BLAST		21
위상 도메인	198 - 207	세포외 서열분석			10
막관통	208 - 228	나선 서열분석	추가 BLAST		21
위상 도메인	229 - 235	세포질 서열분석			7
막관통	236 - 256	나선 서열분석	추가 BLAST		21
위상 도메인	257 - 268	세포외 서열분석	추가 BLAST		12
막관통	269 - 289	나선 서열분석	추가 BLAST		21
위상 도메인	290 - 323	세포질 서열분석	추가 BLAST		34

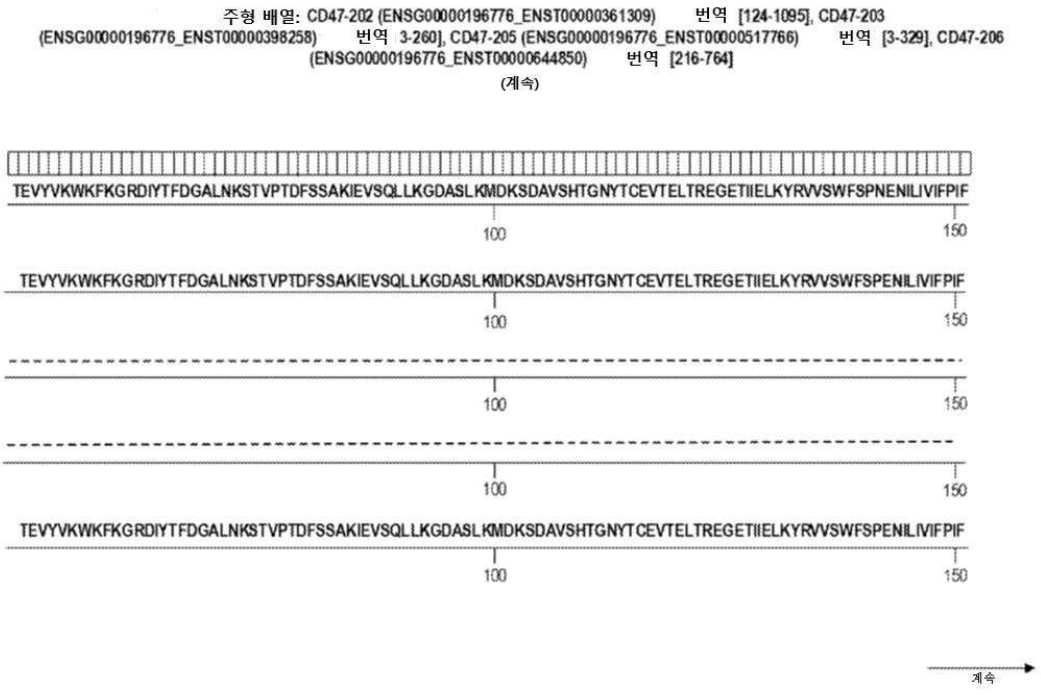
도면4



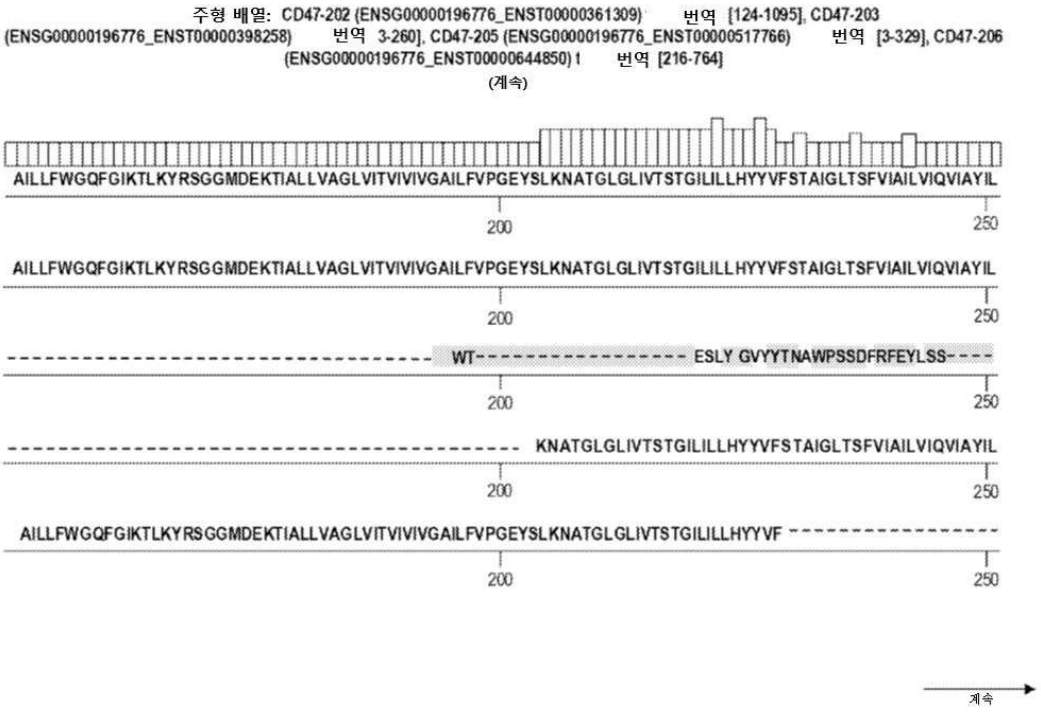
도면5a


주형 배열: CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309) 번역 [124-1095], CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258) 번역 3-260], CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766) 번역 [3-329], CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850) 번역 [216-764]
주형 서열 CD47-201 (ENSG00000196776_ENST00000355354)
번역 [118-1035]
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
50
주형 서열 CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309)
번역 [124-1095]
MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNT
50
주형 서열 CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258)
번역 [3-260]
50
주형 서열 CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766)
번역 [3-329]
50
주형 서열 CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850)
번역 [216-764]
50
계속

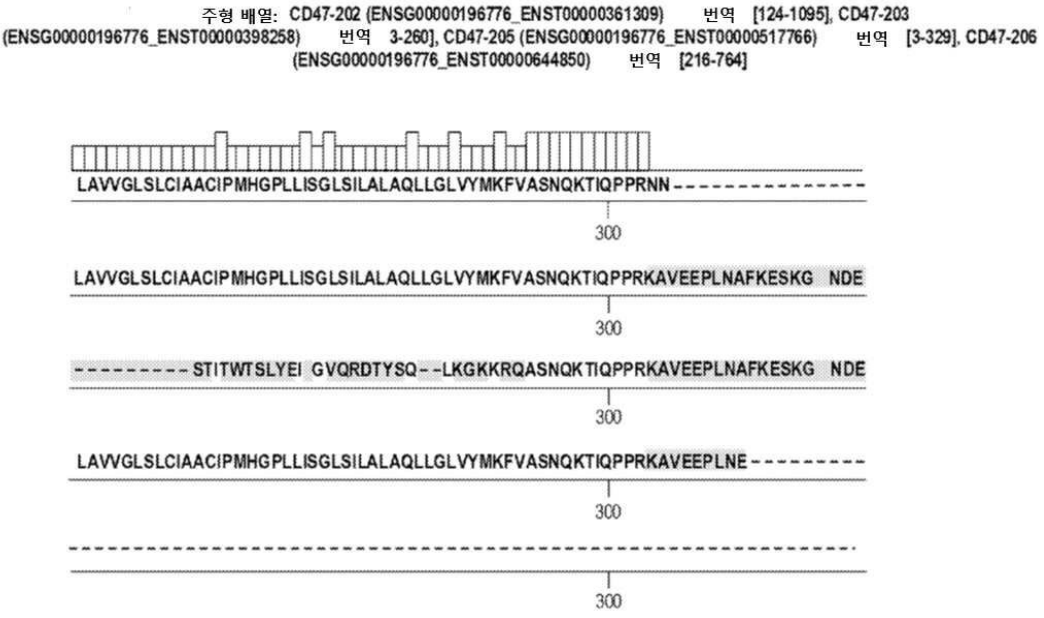
도면5b


주형 배열: CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309) 번역 [124-1095], CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258) 번역 3-260], CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766) 번역 [3-329], CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850) 번역 [216-764]
(계속)
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIF
100
150
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPENILIVIFPIF
100
150
100
150
100
150
TEVYVKWKFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREGETIIELKYRVVSWFSPENILIVIFPIF
100
150
계속

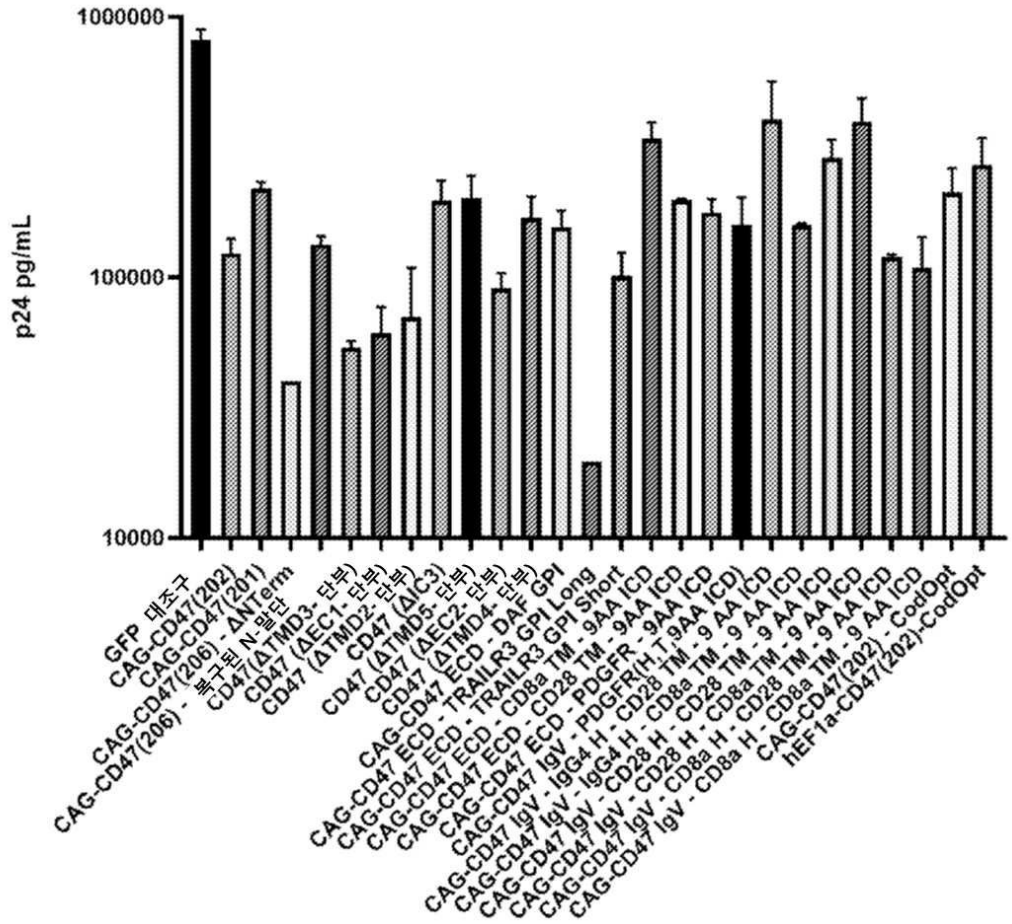
도면5c


주형 배열: CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309) 번역 [124-1095], CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258) 번역 3-260], CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766) 번역 [3-329], CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850) 1 번역 [216-764]
(계속)
AILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL
200
250
AILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL
200
250
WT
ESLY GVYYTNAWPSSDFRFEYLSS
200
250
KNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAYIL
200
250
AILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVF
200
250
계속

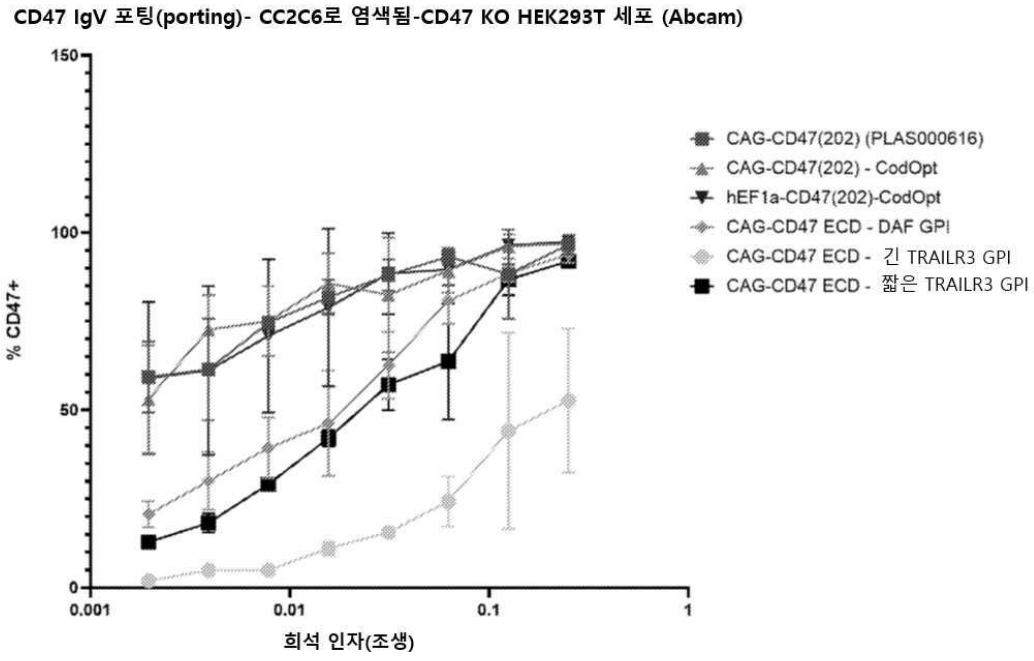
도면5d


주형 배열: CD47-202 (ENSG00000196776_ENST00000361309) 번역 [124-1095], CD47-203 (ENSG00000196776_ENST00000398258) 번역 3-260], CD47-205 (ENSG00000196776_ENST00000517766) 번역 [3-329], CD47-206 (ENSG00000196776_ENST00000644850) 번역 [216-764]
LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRNN
300
LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKG NDE
300
STITWTSLYEI GVQRDTYSQ LKGKKRQASNQKTIQPPRKAVEEPLNAFKESKG NDE
300
LAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNE
300
300

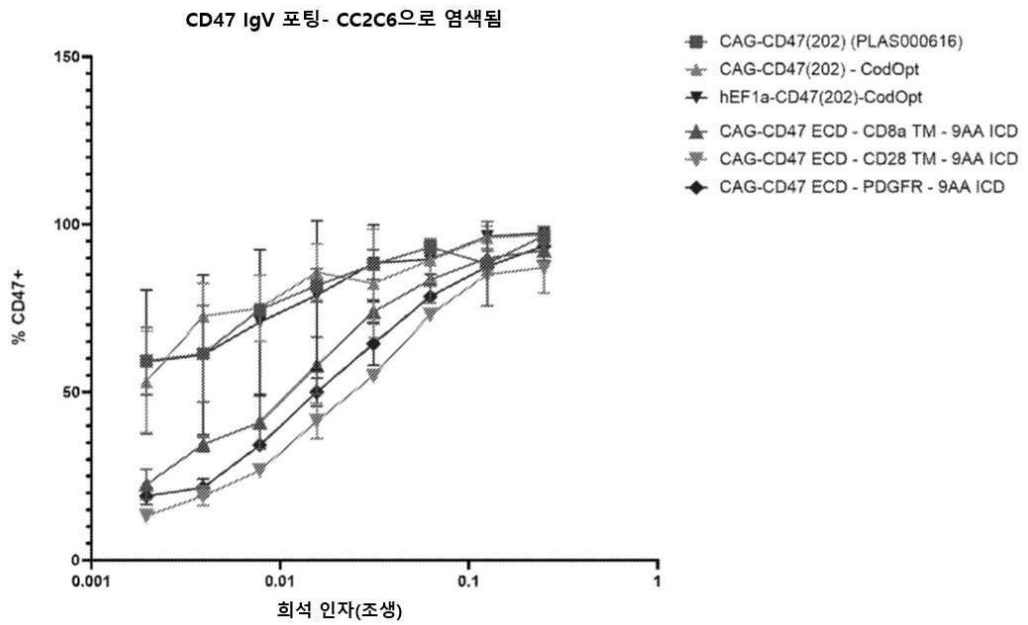
도면6


p24 pg/mL
1000000
100000
10000
GFP 대조구
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(201)
CAG-CD47(206) - ΔNTerm
CAG-CD47(206) - 복구된 N-말단
CD47(ΔTMD3- 단부)
CD47 (ΔEC1- 단부)
CD47 (ΔTMD2- 단부)
CD47 (ΔIC3)
CD47 (ΔTMD5- 단부)
CD47 (ΔEC2- 단부)
CD47 (ΔTMD4- 단부)
CAG-CD47 ECD - DAF GPI
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI Long
CAG-CD47 ECD - TRAILR3 GPI Short
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR(H,T,9AA ICD)
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt

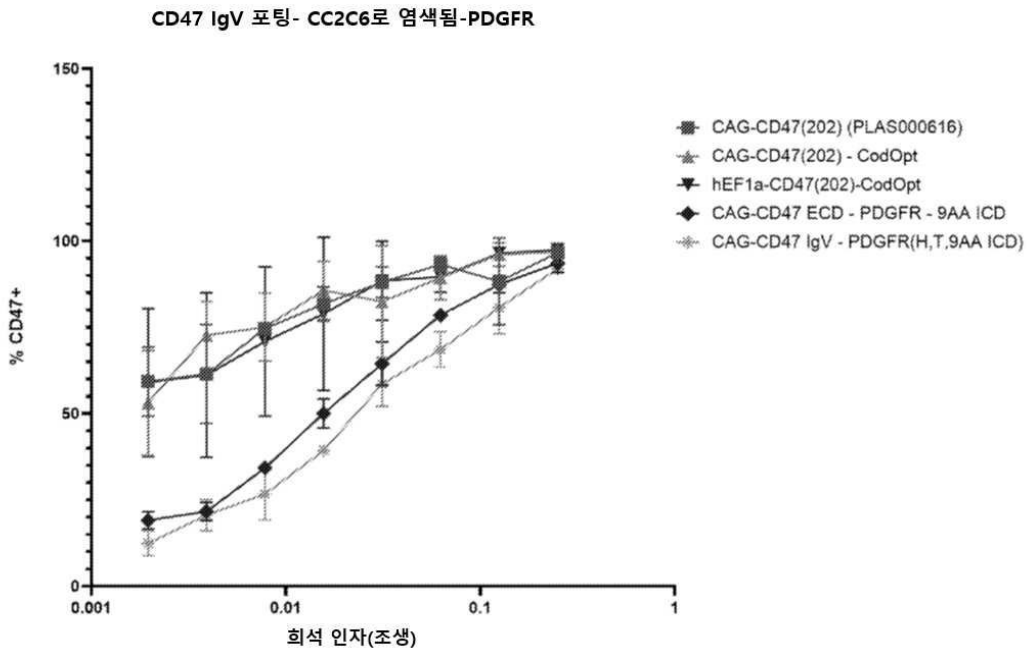
도면7


CD47 IgV 포팅(porting)- CC2C6로 염색됨-CD47 KO HEK293T 세포 (Abcam)
% CD47+
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
희석 인자(조생)
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - DAF GPI
CAG-CD47 ECD - 긴 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD - 짧은 TRAILR3 GPI

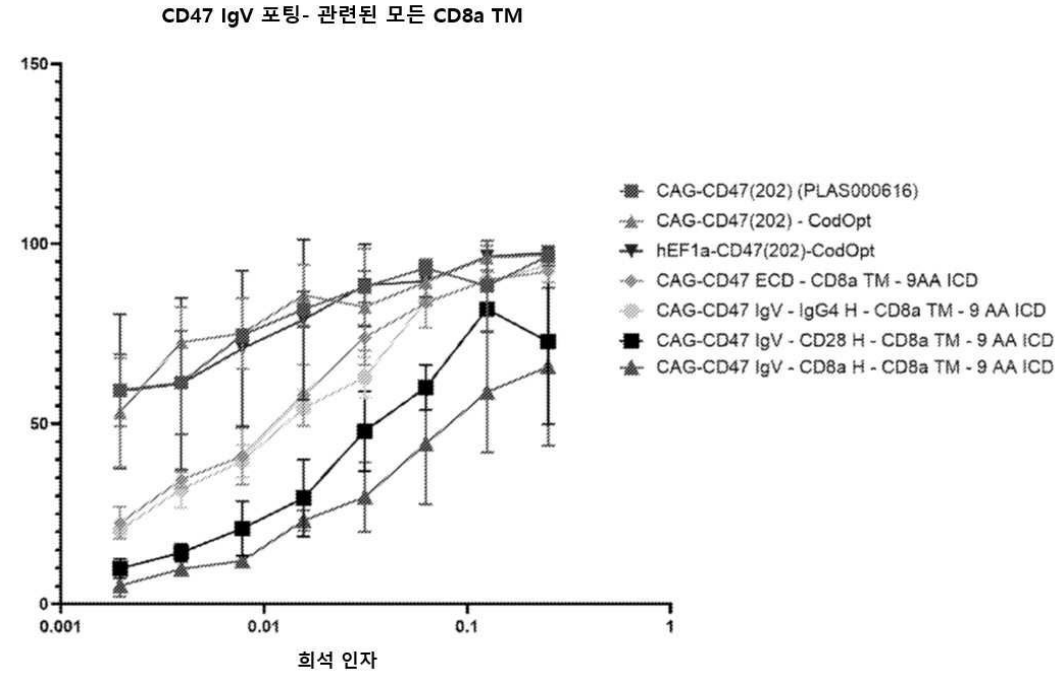
도면8


CD47 IgV 포팅- CC2C6으로 염색됨
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
% CD47+
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
희석 인자(조생)

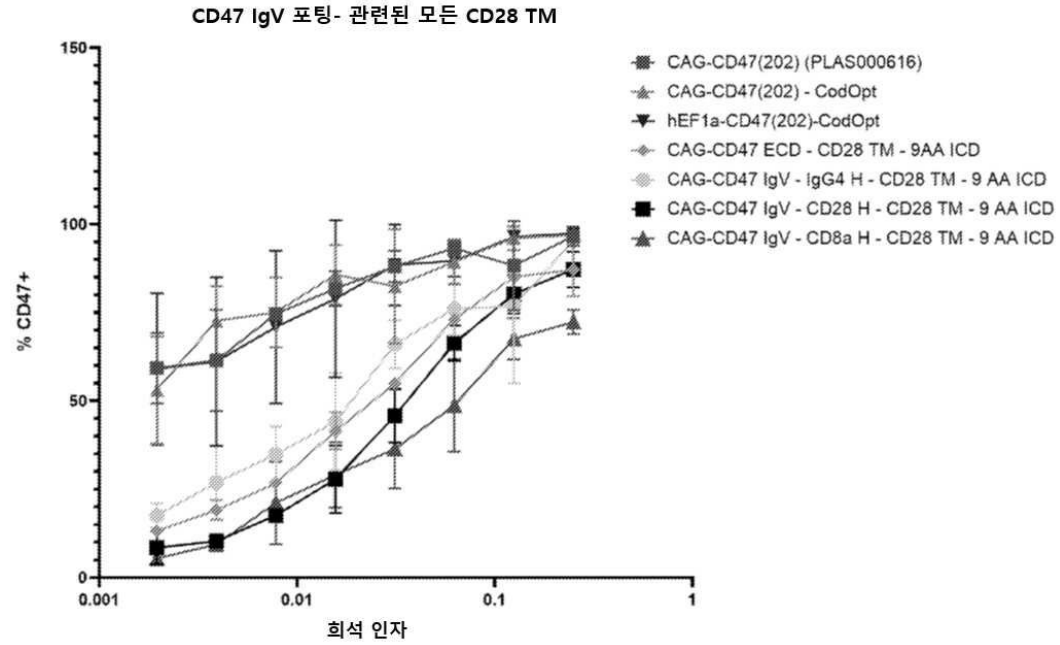
도면9


CD47 IgV 포팅- CC2C6로 염색됨-PDGFR
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - PDGFR(H,T,9AA ICD)
% CD47+
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
희석 인자(조생)

도면10


CD47 IgV 포팅- 관련된 모든 CD8a TM
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
희석 인자
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD8a TM - 9 AA ICD

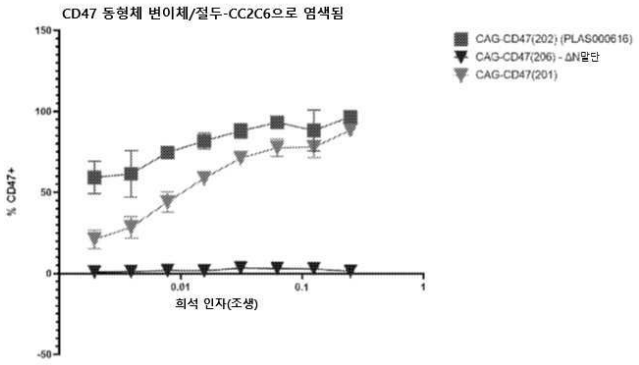
도면11


CD47 IgV 포팅- 관련된 모든 CD28 TM
% CD47+
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
희석 인자
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD28 TM - 9 AA ICD

도면12a

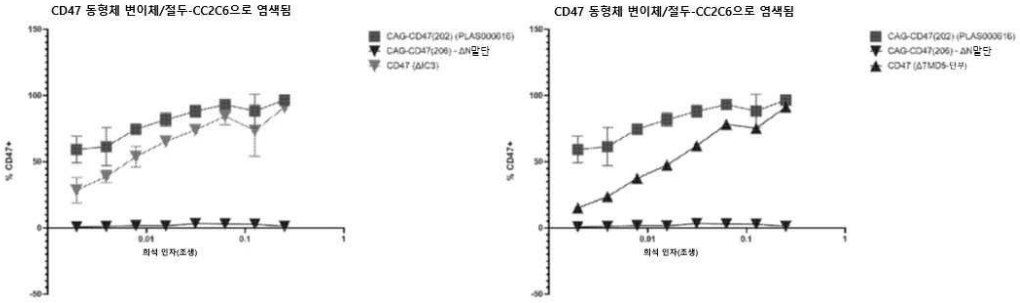
WT CD47(202)	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	IC3
WT CD47(201)	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	IC3

CD47(202) 및 CD47(201) 은, 몇 개의 아미노산에 있어서, 상이한 IC3을 가지며 더 짧다.



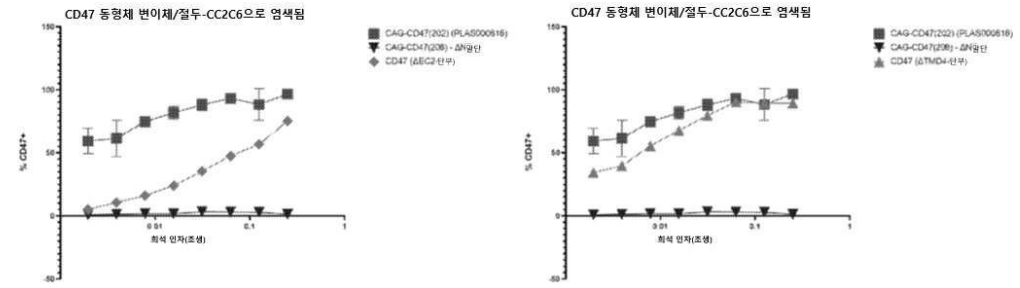
도면12b

WT CD47	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	IC3
CD47 ΔICD3	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	
CD47Δ TMD5-단부	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2		

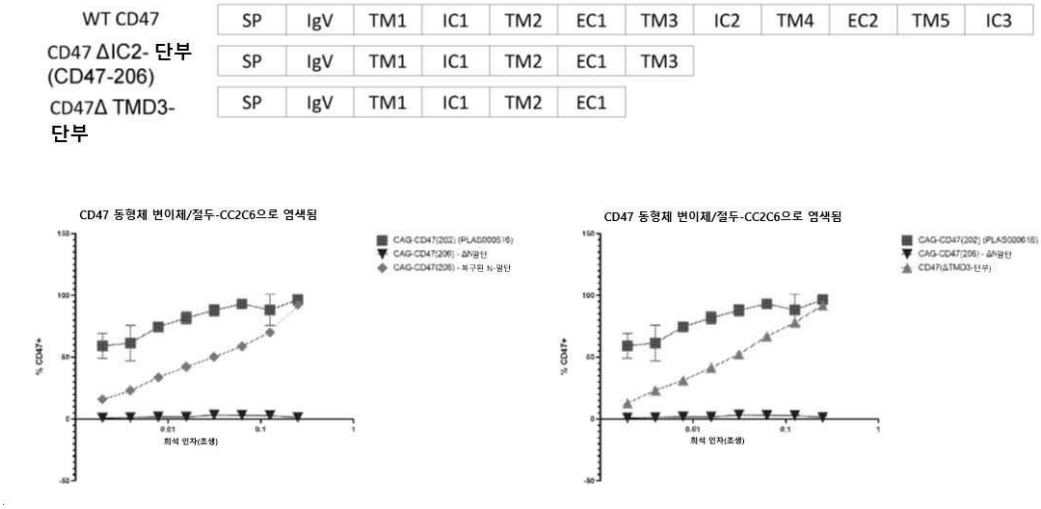


도면12c

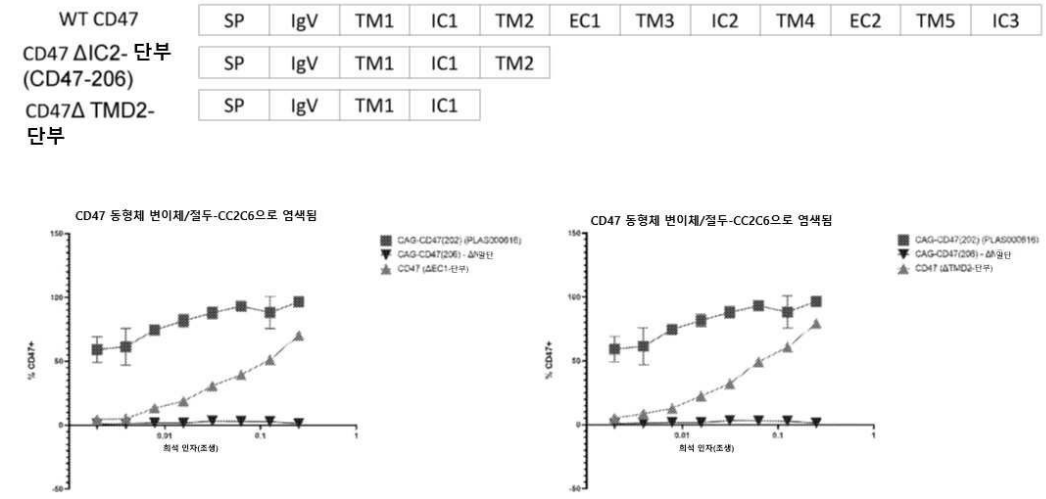
WT CD47	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4	EC2	TM5	IC3
CD47 ΔEC2- 단부	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2	TM4			
CD47Δ TMD4-단부	SP	IgV	TM1	IC1	TM2	EC1	TM3	IC2				



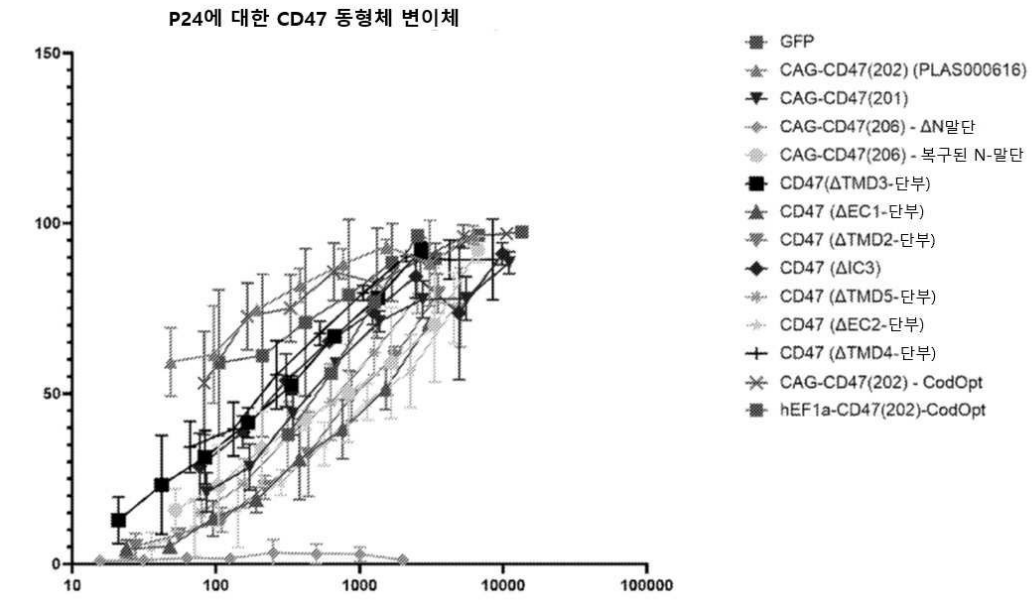
도면12d


WT CD47
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
TM3
IC2
TM4
EC2
TM5
IC3
CD47 ΔIC2- 단부 (CD47-206)
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
TM3
CD47Δ TMD3- 단부
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
CD47 동형체 변이체/절두-CC2C6으로 염색됨
CD47 동형체 변이체/절두-CC2C6으로 염색됨

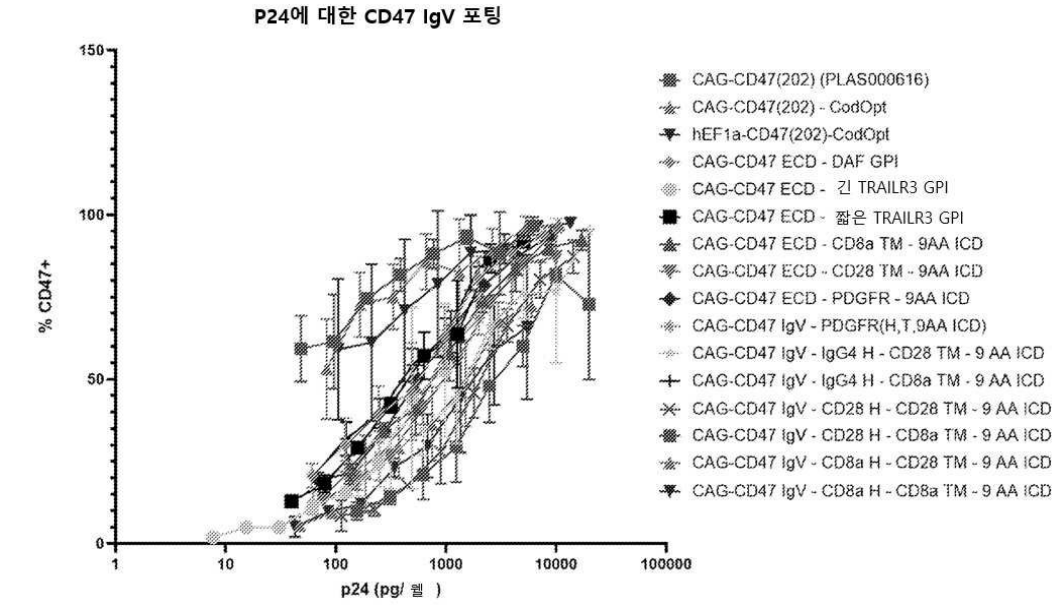
도면12e


WT CD47
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
EC1
TM3
IC2
TM4
EC2
TM5
IC3
CD47 ΔIC2- 단부 (CD47-206)
SP
IgV
TM1
IC1
TM2
CD47Δ TMD2- 단부
SP
IgV
TM1
IC1
CD47 동형체 변이체/절두-CC2C6으로 염색됨
CD47 동형체 변이체/절두-CC2C6으로 염색됨

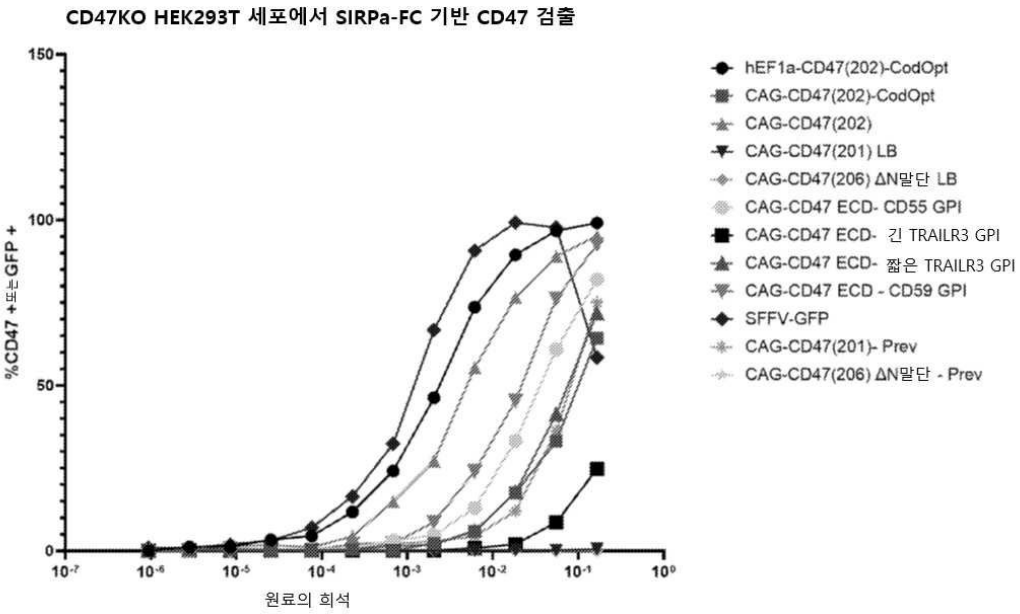
도면13


P24에 대한 CD47 동형체 변이체
150
100
50
0
10
100
1000
10000
100000
GFP
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(201)
CAG-CD47(206) - ΔN말단
CAG-CD47(206) - 복구된 N-말단
CD47(ΔTMD3-단부)
CD47 (ΔEC1-단부)
CD47 (ΔTMD2-단부)
CD47 (ΔIC3)
CD47 (ΔTMD5-단부)
CD47 (ΔEC2-단부)
CD47 (ΔTMD4-단부)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt

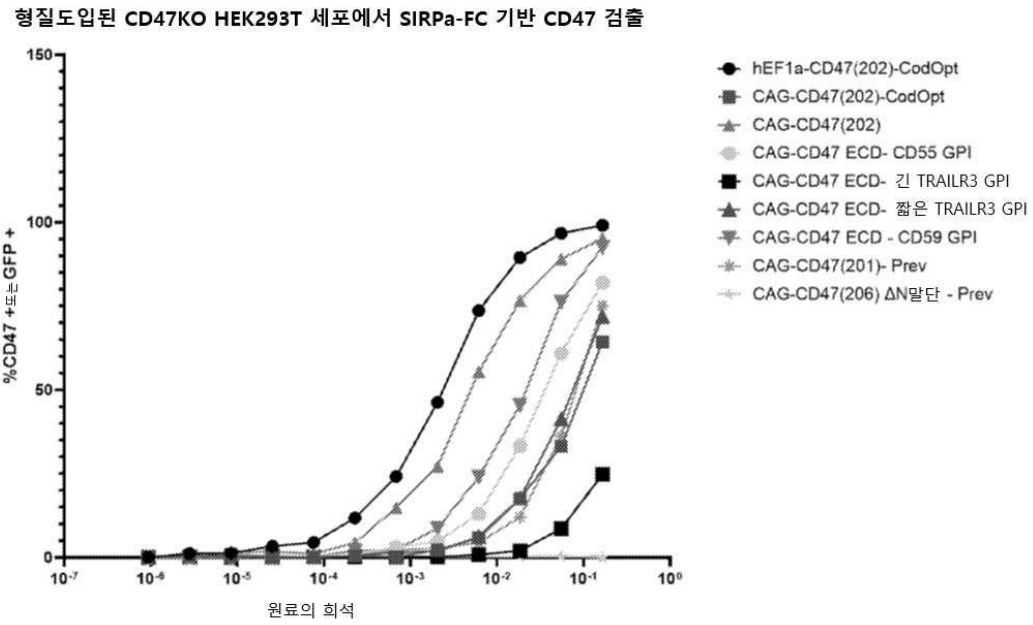
도면14


P24에 대한 CD47 IgV 포팅
% CD47+
150
100
50
0
1
10
100
1000
10000
100000
p24 (pg/웰)
CAG-CD47(202) (PLAS000616)
CAG-CD47(202) - CodOpt
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47 ECD - DAF GPI
CAG-CD47 ECD - 긴 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD - 짧은 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD - CD8a TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - CD28 TM - 9AA ICD
CAG-CD47 ECD - PDGFR - 9AA ICD
CAG-CD47 IgV - PDGFR(H,T,9AA ICD)
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - IgG4 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD28 H - CD8a TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD28 TM - 9 AA ICD
CAG-CD47 IgV - CD8a H - CD8a TM - 9 AA ICD

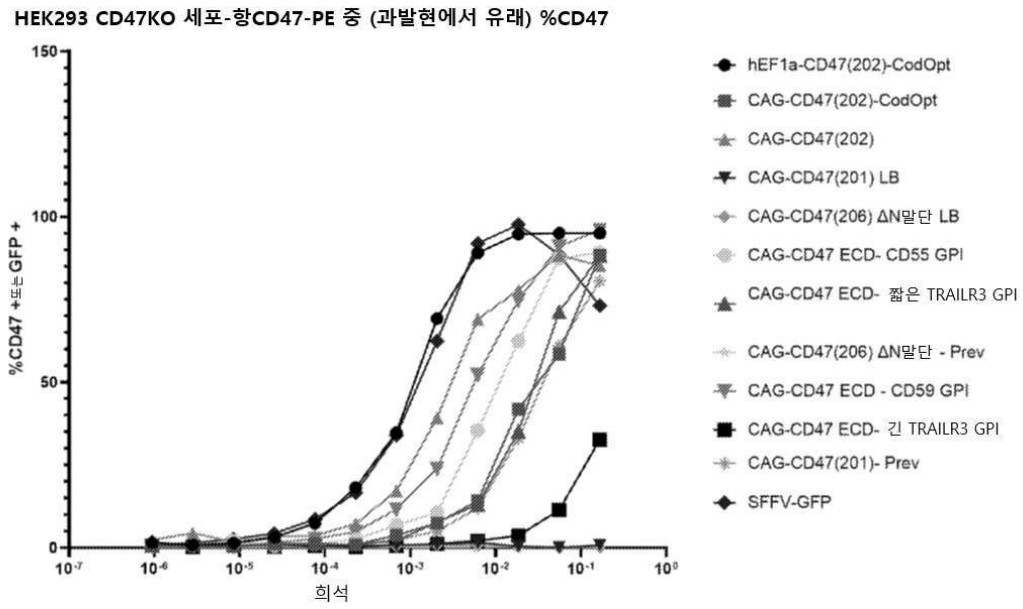
도면15


CD47KO HEK293T 세포에서 SIRPa-FC 기반 CD47 검출
%CD47 +또는GFP +
150
100
50
0
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
원료의 희석
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47(201) LB
CAG-CD47(206) ΔN말단 LB
CAG-CD47 ECD- CD55 GPI
CAG-CD47 ECD- 긴 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD- 짧은 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI
SFFV-GFP
CAG-CD47(201)- Prev
CAG-CD47(206) ΔN말단 - Prev

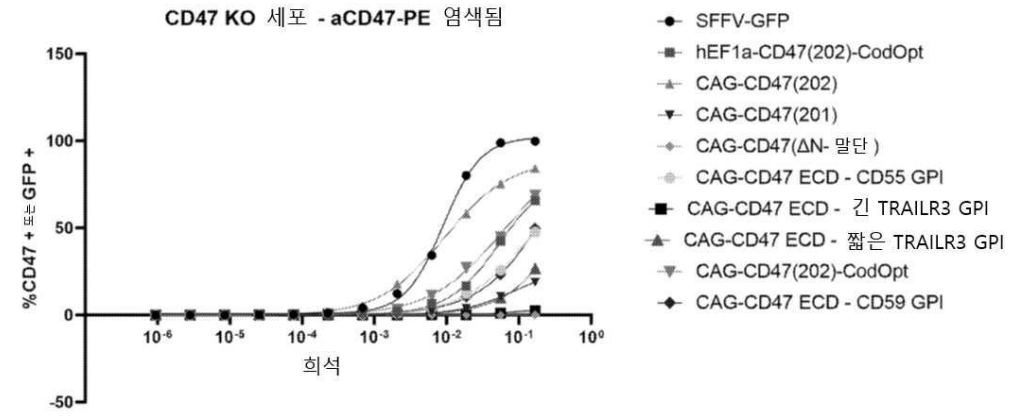
도면16


형질도입된 CD47KO HEK293T 세포에서 SIRPa-FC 기반 CD47 검출
%CD47 +또는GFP +
150
100
50
0
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
원료의 희석
hEF1a-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)-CodOpt
CAG-CD47(202)
CAG-CD47 ECD- CD55 GPI
CAG-CD47 ECD- 긴 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD- 짧은 TRAILR3 GPI
CAG-CD47 ECD - CD59 GPI
CAG-CD47(201)- Prev
CAG-CD47(206) ΔN말단 - Prev

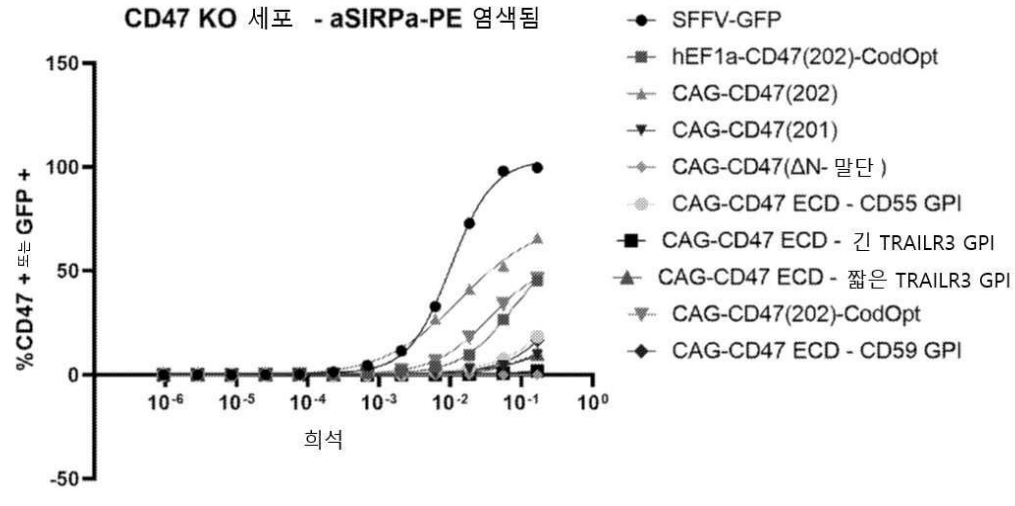
도면17



도면18a



도면18b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.