



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2022-0095223  
(43) 공개일자 2022년07월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/0783* (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)  
*C12N 15/90* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/0637* (2013.01)  
*A61K 35/17* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7018648
- (22) 출원일자(국제) 2022년11월09일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/059730
- (87) 국제공개번호 WO 2021/092581  
 국제공개일자 2021년05월14일
- (30) 우선권주장  
 62/933,252 2019년11월08일 미국(US)

- (71) 출원인  
**상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드**  
 미국 캘리포니아 94005 브리즈번 마리나 불러바드 7000
- (72) 발명자  
**콘웨이, 안토니**  
 미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 마리나 불러바드 7000 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내  
**퐁, 헬렌**  
 미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 마리나 불러바드 7000 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내  
**광, 조지**  
 미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 마리나 불러바드 7000 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내
- (74) 대리인  
**양영준, 김영**

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 조절 T 세포 생성**

**(57) 요약**

본원에서는 조절 T 세포로 분화되는 잠재능이 증가된 유전자 조작된 포유동물 줄기 및 전구 세포를 제공한다. 그의 제조 방법 및 용도 또한 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 39/0008* (2013.01)  
*A61P 37/06* (2018.01)  
*C07K 14/7051* (2013.01)  
*C12N 15/102* (2013.01)  
*C12N 15/90* (2013.01)  
*C12N 2501/2307* (2013.01)  
*C12N 2501/60* (2013.01)  
*C12N 2506/45* (2013.01)  
*C12N 2510/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

계놈에 이중 서열을 포함하는 유전자 조작된 포유동물 세포이며,

여기서, 이중 서열은 계통 결정 인자를 코딩하는 트랜스진을 포함하고,

여기서, 계통 결정 인자는 세포의 CD4<sup>+</sup> 조절 T 세포 (Treg)로의 분화를 촉진시키거나, 또는 세포를 CD4<sup>+</sup> Treg로서 유지시키는 것을 촉진시키는 것인, 유전자 조작된 포유동물 세포.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 이중 서열이, 트랜스진의 발현이 T 세포 특이적 유전자 유전자좌에서 전사-조절 요소의 제어하에 있도록 상기 유전자 유전자좌 내로 통합되는 것인 세포.

#### 청구항 3

포유동물 세포를 (i) 이중 서열 및 (ii) 이중 서열에 플랭킹하는 제1 상동성 영역 (HR) 및 제2 HR을 포함하는 핵산 구축물과 접촉시키는 단계이며,

여기서, 이중 서열은 트랜스진을 포함하고,

제1 및 제2 HR은 포유동물 세포의 T 세포 특이적 유전자 유전자좌 또는 계놈 세이프 하버(safe harbor) 유전자좌에서 각각 제1 계놈 영역 (GR) 및 제2 GR과 상동성인 것인 단계; 및

T 세포 특이적 유전자 유전자좌 또는 계놈 세이프 하버 유전자좌의 제1 GR과 제2 GR 사이에 이중 서열의 통합을 허용하는 조건하에서 세포를 배양하는 단계

를 포함하는, 유전자 조작된 포유동물 세포를 제조하는 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 통합이 징크 핑거 뉴클레아제 또는 닉카제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 도메인 뉴클레아제 또는 닉카제 (TALEN), 메가뉴클레아제, 인테그라제, 레콤비나제, 트랜스포사제, 또는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 촉진되는 것인 방법.

#### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 핵산 구축물이 렌티바이러스 구축물, 아데노바이러스 구축물, 아데노-연관된 바이러스 구축물, 플라스미드, DNA 구축물, 또는 RNA 구축물인 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 추가 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함하고, 여기서 계통 결정 인자에 대한 코딩 서열 및 추가 폴리펩티드에 대한 코딩 서열이 자가-절단 펩티드에 대한 인-프레임 코딩 서열에 의해, 또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)에 의해 분리되어 있는 것인 세포 또는 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 추가 폴리펩티드가 또 다른 계통 결정 인자, 치료 단백질, 또는 키메라 항원 수용체인 세포 또는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 이중 서열이 T 세포 특이적 유전자 유전자좌 중의 엑손 내로 통합되고,

트랜스진의 바로 상류에 있는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES); 또는

트랜스진의 바로 상류 및 트랜스진과 인-프레임인, 자가-절단 펩티드에 대한 제2 코딩 서열을 포함하는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 이중 서열이 IRES 또는 자가-절단 펩티드에 대한 제2 코딩 서열의 바로 상류에 통합 부위의 하류에 있는 T 세포 특이적 유전자 유전자좌의 모든 엑손 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이에 따라 T 세포 특이적 유전자 유전자좌는 무손상 T 세포 특이적 유전자 생성물을 발현하도록 남아 있을 수 있는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 특이적 유전자 유전자좌가 T 세포 수용체 알파 불변 (*TRAC*) 유전자 유전자좌인 세포 또는 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 이중 서열이 *TRAC* 유전자 유전자좌의 엑손 1, 2, 또는 3 내로 통합되는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 *FOXP3*, *Helios*, 또는 *ThPOK*를 코딩하는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 트랜스진이 *FOXP3*에 대한 코딩 서열 및 *ThPOK*에 대한 코딩 서열을 포함하고, 여기서 이들 두 코딩 서열은 인-프레임으로 존재하며, 자가-절단 펩티드에 대한 인-프레임 코딩 서열에 의해 분리되어 있는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 인간 세포인 세포 또는 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 줄기 또는 전구 세포, 임의적으로 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 중배엽 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 림프성 전구 세포, 또는 전구 T 세포로부터 선택되는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 세포가 T 세포, 임의적으로, *Treg*,  $CD4^+$  T 세포, 또는  $CD8^+$  T 세포로부터 리프로그래밍되는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 17**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 *Treg*인 세포 또는 방법.

**청구항 18**

(i) 저용량의 IL-2, (ii) IL-7Ra (*CD27*) 신호전달 억제제, (iii) *CCR7* 신호전달 억제제를 포함하는 조직 배양 배지 중에서 제15항 또는 제16항의 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 제17항의 *Treg*를 제조하는 방법.

**청구항 19**

제15항 또는 제16항의 세포를 *MS5-DLL1/4* 기질 세포; *OP9* 또는 *OP9-DLL1* 기질 세포; 또는 *EpCAM<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>* 기질 세포와 함께 공동 배양하는 단계를 포함하는, 제17항의 *Treg*를 제조하는 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가  
 클래스 II 구조적합성 복합체 트랜스활성화인자 (CIITA) 유전자,  
 HLA 클래스 I 또는 II 유전자,  
 항원 프로세싱 연관 수송체,  
 부구조적합성 항원 유전자, 및  
 $\beta 2$  마이크로글로불린 (B2M) 유전자  
 로부터 선택되는 유전자에 널(null) 돌연변이를 포함하는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 자살 유전자, 임의적으로 HSV-TK 유전자, 시토신 데아미나제 유전자, 니트로리덕타제 유전자, 시토크롬 P450 유전자, 또는 카스파제-9 유전자로부터 선택되는 것을 포함하는 것인 세포 또는 방법.

**청구항 22**

제18항 또는 제19항의 방법에 의해 제조된 유전자 조작된 포유동물 조절 T 세포 (Treg).

**청구항 23**

면역억제를 필요로 하는 환자에게 제1항, 제2항, 제6항 내지 제17항 및 제20항 내지 제22항 중 어느 한 항의 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 면역억제를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법.

**청구항 24**

면역억제를 필요로 하는 환자를 치료하는 의학의 제조에서의 제1항, 제2항, 제6항 내지 제17항 및 제20항 내지 제22항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

**청구항 25**

제1항, 제2항, 제6항 내지 제17항 및 제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제를 필요로 하는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 세포.

**청구항 26**

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 자가면역 질환을 앓는 것인 방법, 용도, 또는 사용하기 위한 세포.

**청구항 27**

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 조직 이식을 받았거나, 또는 그를 받을 것인 방법, 용도, 또는 사용하기 위한 세포.

**청구항 28**

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 인간인 방법, 용도, 또는 사용하기 위한 세포.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 11월 8일 출원된 미국 가출원 62/933,252로부터 우선권을 주장하고, 상기 출원의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

**배경 기술**

- [0003] 건강한 면역계는 균형을 이루는 것이다. 적응 면역에 관련된 세포는 B 및 T 림프구를 포함한다. T 림프구에는 이펙터 T (Teff) 세포 및 조절 T (Treg) 세포의 2가지 일반적인 유형이 있다. Teff 세포는 CD4+ T 헬퍼 세포 및 CD8+ 세포독성 T 세포를 포함한다. Teff 세포는 항원 펩타이드 후 세포-매개된 면역에서 중심 역할을 한다. Teff 세포 및 다른 면역 세포의 중요한 조절인자는 과도한 면역 반응 및 자가면역을 방지하는 Treg 세포이다 (예컨대, 문헌 [Romano et al., *Front Immunol.* (2019) 10, art. 43] 참조).
- [0004] 일부 Treg는 흉선에서 생성되고; 그들은 천연 Treg (nTreg) 또는 흉선 Treg (tTreg)로 공지되어 있다. 다른 Treg는 항원과의 만남 후 말초에서 또는 세포 배양에서 생성되며, 유도성 Treg (iTreg) 또는 적응성 Treg로 공지되어 있다. Treg는 특정 세포 표면 수용체를 수반하는 세포간 접촉 및 IL-10, TGF-β 및 IL-35와 같은 억제 시토카인의 분비를 통해 관용을 유도하는 것을 포함하여 다른 면역 세포의 증식 및 활성화를 적극적으로 제어한다 (Dominguez-Villar and Hafler, *Nat Immunol.* (2018) 19:665-73). 관용을 유도하지 못하면 자가면역 및 만성 염증이 유발될 수 있다. 관용 상실은 Treg 기능의 결함 또는 Treg 개수의 부족, 또는 Teff의 무반응 또는 과활성화로 인해 발생할 수 있다 (Sadlon et al., *Clin Transl Immunol.* (2018) 7:e1011, doi:10-1002/cti2.1011).
- [0005] 최근 몇 년 동안, 질환을 치료하기 위한 Treg의 사용에 많은 관심이 있어 왔다. 자가면역 질환을 치료하기 위해 Treg 개수 및 기능을 부스팅하기 위해 입양 세포 요법을 포함한 여러 접근법이 탐색되었다. 활성화되고 확장된 Treg 집단을 전달하는 Treg 전달은 예컨대, I형 당뇨병, 피부 홍반성 루푸스 및 크론병과 같은 자가면역 질환을 앓는 환자에서, 및 기관 이식에서 시험되었다 ([Dominguez-Villar, 상기 문헌]; [Safinia et al., *Front Immunol.* (2018) 9:354]).
- [0006] 현재, 세포 요법을 위한 Treg의 유일한 공급원은 성인 또는 청소년 1차 혈액 (예컨대, 전혈 또는 성분채집 생성물) 및 조직 (예컨대, 흉선)이다. 상기 공급원으로부터 Treg를 단리시키는 것은 침습적이고, 시간이 많이 소요되며, 단지 적은 개수의 Treg만을 수득하게 된다. 추가로, 상기 샘플로부터 수득된 Treg는 본질적으로 폴리클로날이며, 그의 잠재적인 면역억제 반응에 가변성을 도입할 수 있다. 또한, 단순히 Treg의 개수를 증가시키는 것만으로는 질환을 제어하기에 충분하지 않을 수 있다는 증거가 있다 (McGovern et al., *Front Immunol.* (2017) 8, art. 1517). 예컨대, CAR 또는 조작된 TCR과 같은 항원 특이적 모이어티가 있는 조작된 모노클로날 Treg는 자가면역 활성 또는 기관 이식 부위에서 면역조정 반응을 증진시킬 수 있다. 유전자 조작된, 모노클로날 Treg 세포를 대량으로 효율적으로 수득하는 것이 여전히 요구되고 있다.

**발명의 내용**

- [0007] 본 개시내용은 유도 만능 줄기 세포 (iPSC) 및 전구 세포를 비롯한 줄기 세포의 조절 T 세포로의 분화를 촉진시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 조절 T 세포는 입양 세포 요법을 위한 것으로 제조된다.
- [0008] 한 측면에서, 본 개시내용은 게놈에 이중 서열을 포함하는 유전자 조작된 포유동물 세포 (예컨대, 인간 세포)이며, 여기서 이중 서열은 계통 결정(lineage commitment) 인자 (본원에서는 또한 계통 유도 인자로도 명명)를 코딩하는 트랜스젠을 포함하고, 여기서 계통 결정 인자는 세포의 CD4<sup>+</sup> 조절 T 세포 (Treg)로의 분화를 촉진시키거나, 또는 세포를 CD4<sup>+</sup> Treg로서 유지시키는 것을 촉진시키는 것인, 유전자 조작된 포유동물 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 이중 서열은 조작된 세포의 게놈 중 셰이프 하버(shape harbor) 부위 (예컨대, AAVS1 유전자 유전자좌) 내로 통합된다. 다른 실시양태에서, 이중 서열은 T 세포 특이적 유전자 유전자좌, 즉, 예컨대, Treg와 같은 T 세포에서 특이적으로 발현되는 유전자를 함유하는 유전자좌 (예컨대, FOXP3 부위 및 Helios 부위) 내로 통합되고; 상기 실시양태에서, 트랜스젠은 유전자 유전자좌에서 전사-조절 요소의 제어하에 있을 수 있다.
- [0009] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 포유동물 세포를 (i) 이중 서열 및 (ii) 이중 서열에 플랭킹하는 제1 상동성 영역 (HR) 및 제2 HR을 포함하는 핵산 구축물과 접촉시키는 단계이며, 여기서 이중 서열은 트랜스젠을 포함하고, 제1 및 제2 HR은 포유동물 세포의 T 세포 특이적 유전자 유전자좌 또는 게놈 셰이프 하버 유전자좌에서 각각 제1 게놈 영역 (GR) 및 제2 GR과 상동성인 단계; 및 T 세포 특이적 유전자 유전자좌 또는 게놈 셰이프 하버의 제1 GR과 제2 GR 사이에 이중 서열의 통합을 허용하는 조건하에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 유전자 조작된 포유동물 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이중 서열 통합은 징크 핑거 뉴클레아제 또는 닉카제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터 도메인 뉴클레아제 또는 닉카제 (TALEN), 메가뉴클레

아제, 인테그라제, 레콤비나제, 트랜스포사제, 또는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 촉진된다. 일부 실시양태에서, 핵산 구축물은 렌티바이러스 구축물, 아데노바이러스 구축물, 아데노-연관된 바이러스 구축물, 플라스미드, DNA 구축물, 또는 RNA 구축물이다.

- [0010] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 추가 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함하고, 여기서 계통 결정 인자에 대한 코딩 서열 및 추가 폴리펩티드에 대한 코딩 서열은 자가-절단 펩티드에 대한 인-프레임 코딩 서열에 의해, 또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)에 의해 분리되어 있다. 특정 실시양태에서, 추가 폴리펩티드는 또 다른 계통 결정 인자, 치료 단백질, 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)이다.
  - [0011] 일부 실시양태에서, 이종 서열은 T 세포 특이적 유전자 유전자좌 중의 엑손 내로 통합되고; 트랜스진의 바로 상류에 있는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES); 또는 트랜스진의 바로 상류 및 트랜스진과 인-프레임인, 자가-절단 펩티드에 대한 제2 코딩 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 이종 서열은 IRES 또는 자가-절단 펩티드에 대한 제2 코딩 서열의 바로 상류에 통합 부위의 하류에 있는 T 세포 특이적 유전자 유전자좌의 모든 엑손 서열을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 이에 따라 T 세포 특이적 유전자 유전자좌는 무손상 T 세포 특이적 유전자 생성물을 발현하도록 남아 있을 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포 특이적 유전자 유전자좌는 T 세포 수용체 알파 불변 (*TRAC*) 유전자 유전자좌이고, 이종 서열은 임의적으로 *TRAC* 유전자 유전자좌의 엑손 1, 2, 또는 3 내로 통합된다.
  - [0012] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 FOXP3, Helios, 또는 ThPOK를 코딩한다. 추가 실시양태에서, 트랜스진은 FOXP3에 대한 코딩 서열 및 ThPOK에 대한 코딩 서열을 포함하고, 여기서 상기 두 코딩 서열은 인-프레임으로 존재하며, 자가-절단 펩티드에 대한 인-프레임 코딩 서열에 의해 분리되어 있다.
  - [0013] 일부 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 추가 실시양태에서, 세포는, 임의적으로 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포, 중배엽 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 림프성 전구 세포, 또는 전구 T 세포로부터 선택되는 줄기 또는 전구 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 T 세포 (예컨대, Treg, CD4<sup>+</sup> T 세포, 또는 CD8<sup>+</sup> T 세포)로부터 리프로그래밍된다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 Treg이다.
  - [0014] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 (i) 저용량의 IL-2, (ii) IL-7Ra (CD27) 신호전달 억제제 (예컨대, 항체), (iii) CCR7 신호전달 억제제 (예컨대, 항체)를 포함하는 조직 배양 배지 중에서 본원의 조작된 줄기 또는 전구 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 조작된 Treg를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원의 조작된 줄기 또는 전구 세포를 MS5-DLL1/4 기질 세포; OP9 또는 OP9-DLL1 기질 세포; 또는 EpCAM<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> 기질 세포와 함께 공동 배양하는 단계를 포함하는, 조작된 Treg를 제조하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 상기 방법에 의해 획득된 Treg 세포 또한 제공한다.
  - [0015] 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 클래스 II 주조직적합성 복합체 트랜스활성화인자 (CIITA) 유전자, HLA 클래스 I 또는 II 유전자, 항원 프로세싱 연관 수송체, 부조직적합성 항원 유전자, 및 β2 마이크로글로불린 (B2M) 유전자로부터 선택되는 유전자에 널(null) 돌연변이를 추가로 포함한다.
  - [0016] 일부 실시양태에서, 조작된 세포는, 임의적으로 HSV-TK 유전자, 시토신 데아미나제 유전자, 니트로리덕타제 유전자, 시토크롬 P450 유전자, 또는 카스파제-9 유전자로부터 선택되는 자살 유전자를 추가로 포함한다.
  - [0017] 본 개시내용은 면역억제를 필요로 하는 환자에게 본원에 제공된 조작된 세포 (예컨대, 조작된 Treg)를 투여하는 단계를 포함하는, 면역억제를 필요로 하는 환자 (예컨대, 인간 환자)를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 면역억제를 필요로 하는 환자 (예컨대, 인간 환자)를 치료하는 의학의 제조에서의 본원의 조작된 세포의 용도 뿐만 아니라, 면역억제를 필요로 하는 환자 (예컨대, 인간 환자)를 치료하는 데 사용하기 위한 본원의 조작된 세포 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 환자는 자가면역 질환을 앓거나, 또는 조직 이식을 받았거나, 또는 그를 받을 환자이다.
  - [0018] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 하기 상세한 설명에서 명백해진다. 그러나, 상세한 설명은 본 발명의 실시양태 및 측면을 나타내면서, 제한이 아니라, 단지 예시로서만 제공된다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명의 범주 내에서 다양한 변경 및 변형은 상세한 설명으로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0019] 도 1은 하나 이상의 Treg 결정 (또는 유도) 인자 ("TF")를 코딩하는 트랜스진을 인간 *TRAC* 유전자의 엑손 2 내

로 통합하기 위한 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 도입된 mRNA로부터 생성된 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN)는 엑손 2 중의 특정 부위 (번개 표시)에서 이중 가닥 파단을 만든다. 아데노 연관 바이러스 (AAV) 6 벡터에 의해 도입된 공여자 서열은 5'에서 3'으로 상동성 영역 1; 자가-절단 펩티드 T2A에 대한 코딩 서열; 제1 TF, 자가-절단 펩티드 P2A, 제2 TF2, 자가-절단 펩티드 E2A 및 제3 TF3의 융합체에 대한 코딩 서열; 폴리-아데닐화 (폴리A) 신호 서열; 및 상동성 영역 2를 함유한다. 상동성 영역은 ZFN 절단 부위에 플랭킹하는 게놈 영역과 상동성이다. 통합 부위의 상류에 있는 TRAC 엑손 2 부분, T2A 코딩 서열, 및 TF 코딩 서열(들)은 서로 인-프레임으로 존재한다. 상기 접근법하에서, TRAC 단백질의 발현은 트랜스진 통합의 결과로 녹아오른다. 통합된 서열의 발현은 내인성 TCR 알파쇄 프로모터에 의해 조절된다.

도 2는 도 1에 도시된 것과 유사하되, 단, 여기서 이중 서열은 통합 부위의 하류에 있는 TRAC 엑손 서열 (즉, 통합 부위에 대해 3' 방향의 엑손 2 서열 및 엑손 3 서열)을 포함하는 부분 TRAC cDNA를 포함하는 것인, 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 상기 부분 TRAC cDNA는 T2A 코딩 서열의 바로 상류, 및 T2A 코딩 서열과 인-프레임으로 배치되고, 이에 따라 조작된 유전자좌는 내인성 TCR 알파쇄 프로모터하에 무손상 TCR 알파쇄 및 TF(들)을 발현한다.

도 3은 하나 이상의 결정 인자를 코딩하는 트랜스진을 통합하기 위한 추가의 또 다른 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 본 접근법에서, 트랜스진은 게놈 셰이프 하버 내로 통합된다. 본 도면에서, 트랜스진은 인간 AAVS1 유전자 유전자좌의 인트론 1 내로 삽입되고, 독시사이클린 (Dox) 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. SA: 스플라이스 수용자. 2A: 자가-절단 펩티드 2A에 대한 코딩 서열. PuroR: 퓨로마이신-저항성 유전자. TI: 표적화된 통합.

도 4는 도 3에 개요된 개략도를 이용하여 편집된 세포로부터 생성된 데이터를 보여주는 그래프 패널이다. 트랜스진은 녹색 형광 단백질 (GFP)을 코딩한다. Puro: 퓨로마이신. Dox: 독시사이클린.

도 5는 하나 이상의 결정 인자를 코딩하는 트랜스진이 인간 AAVS1 유전자의 인트론 1 내로 통합되는 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 게놈 내로 통합된 이중 서열은 CAR-코딩 서열을 포함한다. 일단 Treg 분화가 달성되고 나면, (두 LoxP 부위 사이에 배치된) 결정 인자를 코딩하는 트랜스진은 절제되고, 이에 따라 통합 부위에 CAR 발현 카세트만이 남게 된다.

도 6은 하나 이상의 결정 인자를 코딩하는 트랜스진을 인간 TRAC 유전자의 엑손 2 내로 통합하기 위한 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 본 접근법에서, 게놈 내로 통합된 이중 서열은 CAR-코딩 서열을 포함한다. 일단 Treg 분화가 달성되고 나면, (두 LoxP 부위 사이에 배치된) 결정 인자를 코딩하는 트랜스진은 절제되고, 이에 따라 통합 부위에 CAR 발현 카세트만이 남게 된다.

도 7은 단일 재배열된 TCR을 갖는 성숙한 Treg를 유도성 만능 줄기 세포 (iPSC)로 리프로그래밍하는 프로세스를 도시한 개략도이다. 확장 후, iPSC는 Treg 표현형으로 다시 재분화된다. 여기서 TCR은 동종 항원이 아닌 항원을 표적화한다.

도 8은 iPSC가 Treg로 분화되는 프로세스를 도시한 개략도이다. HSC: 조혈 줄기 세포. 단일 양성: CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>. 이중 양성: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

도 9는 IL-7 수용체의 알파 유닛 (IL-7Ra)에 대한 항체를 조직 배양 배지에 도입하면, iPSC 유래 전구 T 세포의 분화가 CD8 단일 양성 세포 형성 (좌측 상단 사분면)으로부터 CD4 단일 양성 세포 형성 (우측 하단 사분면)으로 편향된다는 것을 입증하는 세포 분류 그래프 패널이다. 항체를 3가지 농도 (저, 중간 및 고)로 조직 배양 배지에 첨가하였다. 이 효과는 별개의 두 실험 (Expt. #1 및 Expt. #2)에서 밝혀졌다.

도 10은 iPSC를 Treg로 분화시키기 위한 다중 프로세스를 도시한 개략도이다. 세포를 림프구 분화 코팅 물질 (피더 비의존적) 상에서, 또는 OP9 기질 세포 또는 OP9-DLL1 기질 세포 (Notch 리간드, 델타-유사 1을 발현하는 OP9 세포) 기질 세포 (피더 의존적)와 함께 배양한다. 이어서, 세포를 도 8에 도시된 바와 같이 추가로 배양하여 Treg로의 분화를 촉진시킨다. 대안 경로에서, 3차원 배아 중배엽 오르가노이드 (EMO)는 iPSC를 MSS-DLL1/4 또는 EpCAM<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 기질 세포와 함께 공동 배양함으로써 형성되고; EMO의 조혈 유도 후, 인공 흉선 오르가노이드 (ATO)가 형성되고, 이는 흉선으로 선택된 Treg와 더 유사한 TCR 레퍼토리를 가진 성숙한 Treg를 생성하도록 유도된다.

도 11은 각각 VPH 활성화 도메인 또는 KRAB 억제 도메인에 융합된 죽은 Cas9 (dCas9)를 포함하는 CRISPR 활성화 (CRISPRa) 또는 억제 (CRISPRi) 라이브러리를 통합하기 위한 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 본 도면

에서, 라이브러리 (트랜스진)는 인간 *AAVS1* 유전자의 인트론 1 내로 통합된다.

**도 12**는 나이브 조절,  $CD4^+$ , 및  $CD8^+$  T 세포로부터 유래된 iPSC (집합적으로 TiPSC) 및  $CD34^+$  세포로부터 유래된 iPSC 사이에서 T 세포를 생성할 수 있는 능력을 비교하는 그래프 패널이다. **패널 a**는 TiPSC 및  $CD34$  유래 iPSC 에서 분화하는 동안 CD3 및 TCR  $\alpha\beta$ 를 공동 발현한 살아있는/단일 세포의 비율(%)을 보여주는 것이다. **패널 b**는 iPSC로부터의 분화 T 세포에서의 CD3 및 TCR  $\alpha\beta$ 의 발현을 도시한 대표적인 유세포 분석법 플롯의 패널이다.  $CD3+TCR\alpha\beta^+$  세포 (**패널 c**) 뿐만 아니라, 각 iPSC 세포주로부터의 살아있는/단일 세포 (**패널 d**)로부터의 세포의 유형 및 분포 또한 조사하였다. CD4sp: CD4 단일 양성. CD8sp: CD8 단일 양성. DN: 이중 음성 ( $CD4^-CD8^-$ ). DP: 이중 양성 ( $CD4^+CD8^+$ ). 통계적 유의도는 웰치 교정(Welch's correction)과 함께 독립표본 t 검정에 의해 결정하였다. 별표 표시는 통계적 유의성을 나타낸다.

**도 13a**는 **도 2**에 도시된 접근법에서 *TRAC* 유전자좌의 엑손 2에서 편집된 iPSC 세포주로부터 유래된 T 세포에서 FOXP3 및 항-HLA-A2 키메라 항원 수용체 (CAR)의 발현을 보여주는 유세포 분석법 플롯의 패널이다. 트랜스진은 FOXP3/Helios/CAR, FOXP3/CAR, FOXP3, 또는 GFP였다.

**도 13b**는 **도 13a**의 연구에서 세포의 시토카인 분비 분석을 보여주는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 만능 줄기 세포 (PSC)는 무한정 확장될 수 있고, 인체 내에서 임의의 세포 유형을 발생시킬 수 있다. PSC (예컨대, 인간 배아 줄기 세포 및 유도 만능 줄기 세포)는 치료 적용을 위해 분화된 세포를 다수 생산하기 위한 이상적인 출발 공급원을 나타낸다. 본 개시내용은 예컨대, 유도 PSC (iPSC)와 같은 PSC로부터 Treg 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 또한 본 개시내용은 다능성 세포, 예컨대, 중배엽 전구 세포, 조혈 줄기 세포, 또는 림프성 전구 세포로부터 Treg 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 다능성 줄기 세포 및 조혈 전구 세포를 포함하는 다능성 세포는 만능 세포와 비교하여 다른 세포 유형으로 분화하는 능력에 있어 더 큰 제한을 받는다.
- [0021] 본 방법에서, 줄기 세포 및/또는 전구 세포는 Treg 계통 결정 인자 (예컨대, FOXP3, Helios, Ikaros) 및/또는  $CD4^+$  헬퍼 T 세포 계통 결정 인자 (예컨대, Gata3 및 ThPOK)를 과다발현하도록 (즉, 세포가 일반적으로 발현하는 것보다 더 높은 수준으로 발현하도록) 유전자 조작된다. 상기 인자는 조작된 줄기 및/또는 전구 세포의 Treg로의 분화를 촉진시킨다. 상기 인자는 Treg 분화 프로세스 전 기간 또는 일부 기간 동안 구성적으로 과다 발현될 수 있거나; 또는 Treg 분화 프로세스 중 특정 기간 동안 (예컨대, 독시사이클린 유도 TetR 매개 유전자 발현을 통해) 유도적으로 발현될 수 있다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 결정 인자는 (예컨대, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 트랜스포존을 사용하여) 줄기 또는 전구 세포의 게놈 내로 무작위로 통합된 트랜스진(들)에 의해 코딩된다.
- [0023] 대안적으로, 결정 인자는 부위-특이적 방식으로 줄기 또는 전구 세포의 게놈 내로 통합된 트랜스진(들)에 의해 코딩된다. 예를 들어, 트랜스진은 T 세포 특이적 유전자, 예컨대, T 세포 수용체 알파 채 불변 영역 (즉, T 세포 수용체 알파 불변 또는 *TRAC*) 유전자의 게놈 세이프 하버 부위에, 또는 게놈 유전자좌에 통합된다. 전자의 접근법에서, 트랜스진은 임의적으로 T 세포 특이적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 전사 제어하에 배치될 수 있다. 후자의 접근법에서, 트랜스진은 T 세포 특이적 유전자에 대한 내인성 프로모터 및 다른 전사-조절 요소 (예컨대, TCR 알파 채 프로모터)의 제어하에 발현될 수 있다. 트랜스진을 T 세포 특이적 프로모터의 제어하에 배치할 때의 이점은 트랜스진이 의도한 대로 T 세포에서만 발현되어 조작된 세포의 임상 안전성을 개선시킨다는 점이다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 본 방법은 이러한 분화를 추가로 촉진시키는 조직 배양 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 조절 T 세포는 면역 항상성을 유지하고, 면역 관용을 부여한다. 자가 또는 동종이계될 수 있는 조작된 Treg 세포는 예컨대, 기관 이식 또는 동종이계 세포 요법을 받는 환자 및 자가면역 질환 환자와 같이 면역 관용 유도 또는 면역 항상성 복원을 필요로 하는 환자를 치료하는 세포 기반 요법에서 사용될 수 있다. 본 Treg 세포는 종래 Treg 요법에서 폴리클론성에 의해 유발되는 가변성을 피하면서, 모노클로날일 수 있기 때문에, 개선된 치료 효능을 가질 것이다. 추가로, Treg 세포는 그의 항원 특이성에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, Treg 세포는 TCR 또는 CAR이 Treg 세포를 해당 부위 (예컨대, 염증 부위)로 이동시켜 세포의 효능을 증진시키도록 Treg가 필요한 생체내 부위에서 T 세포 수용체 (TCR), 또는 항원에 특이적인 편집된 키메라 항원 수용체 (CAR)

를 발현하도록 선택될 수 있다.

[0026] **I. CD4<sup>+</sup> Treg 결정 인자를 코딩하는 트랜스진**

[0027] 예컨대, iPSC와 같은 전구 세포 또는 줄기 세포의 Treg로의 분화를 촉진하기 위해, 세포는 CD4<sup>+</sup> 헬퍼 T 세포 및 궁극적으로는 Treg 세포가 되도록 전구 또는 줄기 세포의 계통 결정을 촉진하는 하나 이상의 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "조절 T 세포," "조절 T 림프구" 및 "Treg"는 면역계를 조절하고, 자가 항원에 대한 관용을 유지하며, 일반적으로 T 이펙터 세포의 유도 및 증식을 억제하거나, 하향조절하는 T 세포의 하위집단을 지칭한다. Treg 표현형은 면역 억제 기능에 필수적인 유전자 네트워크의 발현을 조절하는 마스터 전사 인자 포크헤드 박스 P3(FOXP3)의 발현에 부분적으로 의존한다 (예컨대, 문헌 [Fontenot et al., *Nature Immunology* (2003)4(4):330-6] 참조). Treg는 종종 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>의 표현형으로 표시된다. 일부 실시양태에서, Treg는 또한 CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, Helios<sup>+</sup>, 및/또는 GITR<sup>+</sup>이다. 특정 실시양태에서, Treg는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup> 또는 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>hi</sup>로 표시된다.

[0028] 본 방법에서, 줄기 세포 또는 전구 세포의 Treg로의 분화를 촉진시키기 위해 줄기 세포 또는 전구 세포의 계통에 도입되는 트랜스진은 제한 없이, CD4, CD25, FOXP3, CD4RA, CD62L, Helios, GITR, Ikaros, CTLA4, Gata3, Tox, ETS1, LEF1, RORA, TNFR2, 및 ThPOK 중 하나 이상의 것을 코딩하는 것일 수 있다. 상기 단백질을 코딩하는 cDNA 서열은 진뱅크(GenBank) 및 널리 공지된 다른 유전자 데이터베이스에서 이용가능하다. 이들 단백질 중 하나 이상의 것의 발현은 분화 동안 줄기 또는 전구 세포를 Treg 운명으로 결정하는 데 도움이 될 것이다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 Treg 계통 결정 인자 FOXP3 및/또는 CD4<sup>+</sup> 헬퍼 T 세포 계통 결정 인자 ThPOK를 코딩한다 (He et al., *Nature* (2005) 433(7028):826-33). 일부 실시양태에서, 트랜스진은 Treg의 하위집단에서 발현되는 Helios를 코딩한다 (Thornton et al., *Eur J Immunol.* (2019) 49(3):398-412).

[0029] 일부 실시양태에서, 줄기 또는 전구 세포는 조절 줄기 세포 (HSC) 다분화능을 증진시키는 결정 인자를 과다발현하도록 조작될 수 있다 (문헌 [Sugimura et al., *Nature* (2017) 545(7655):432-38] 참조). 상기 인자로는 제한 없이, HOXA9, ERG, RORA, SOX4, LCOR, HOXA5, RUNX1 및 MYB를 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 줄기 또는 전구 세포는 조작된 부위 특이적 전사 억제 구축물 (예컨대, ZFP-KRAB, CRISPRi 등), shRNA, 또는 siRNA를 통해 EZHI를 하향조절하여 HSC 다분화능을 증진시키도록 조작될 수 있다 (문헌 [Vo et al., *Nature* (2018) 553(7689):506-510] 참조).

[0031] **II. 결정 인자를 코딩하는 트랜스진 통합**

[0032] 줄기 세포 또는 전구 세포를 유전자 조작하기 위해, 관심 트랜스진을 보유하는 이중 뉴클레오티드 서열을 세포 내로 도입한다. 본원에서 "이중"이라는 용어는 본 서열이 자연적으로 발생하지 않는 계놈의 부위에 서열이 삽입되는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 이중 서열은 Treg 세포에서 특이적으로 활성인 계놈 부위로 도입된다. 상기 부위의 예는 T 세포 수용체 쇠 (예컨대, TCR 알파 쇠, 베타 쇠, 감마 쇠, 또는 델타 쇠), CD3 쇠 (예컨대, CD3 제타, 엡실론, 델타, 또는 감마 쇠), FOXP3, Helios, CTLA4, Ikaros, TNFR2, 또는 CD4를 코딩하는 유전자이다.

[0033] 예로서, 이중 서열은 계놈 중의 TRAC 대립유전자 중 하나 또는 둘 모두에 도입된다. TRAC 유전자좌의 계놈 구조는 도 1 및 도 2에 도시되어 있다. TRAC 유전자는 TCR 알파 쇠 V 및 J 유전자의 하류에 있다. TRAC는 TCR 알파 쇠의 불변 영역으로 전사되는 3개의 엑손을 포함한다. 인간 TRAC 유전자의 유전자 서열 및 엑손/인트론 경계는 진뱅크 ID 28755 또는 6955에서 살펴볼 수 있다. 통합을 위한 표적화된 부위는 예를 들어, 인트론 (예컨대, 인트론 1 또는 2)에, TRAC 유전자의 마지막 엑손 하류의 영역에, 엑손 (예컨대, 엑손 1, 2, 또는 3)에, 또는 인트론과 그의 인접 엑손 사이의 연결부에 있을 수 있다.

[0034] 도 1 및 2는 유전자 편집을 통해 인간 TRAC 유전자좌의 엑손 2로 이중 서열을 표적화하는 2가지 상이한 접근법을 도시한 것이다. 두 접근법에서 모두 트랜스진은 자가-절단 펩티드 (예컨대, P2A, E2A, F2A, T2A)에 의해 분리된 하나 이상의 Treg 결정 또는 유도 인자 (예컨대, FOXP3)를 포함하는 폴리펩티드를 코딩한다. 일부 실시양태에서, FOXP3 트랜스진은 Treg 억제 활성을 증진시키기 위해, 아세틸화되는 것으로 알려진 리신 잔기를 아르기닌 잔기로 전환시키도록 조작된다 (예컨대, K31R, K263R, K268R) (문헌 [Kwon et al., *J Immunol.* (2012) 188(6):2712-21] 참조).

- [0035] 도 1에 도시된 접근법에서, 조작된 세포에서 TCR 알파쇄의 발현은 이중 서열의 삽입에 의해 파괴된다. 이 접근법에서, 게놈 내로 통합된 이중 서열은 5'에서 3'으로, (i) 자가-절단 펩티드 T2A에 대한 코딩 서열 (또는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열), (ii) 결정 인자(들)에 대한 코딩 서열, 및 (iii) 폴리아데닐화 (폴리A) 부위를 함유한다. 일단 통합되고 나면, 조작된 *TRAC* 유전자좌는 내인성 프로모터하에 결정 인자(들)를 발현할 것이며, 여기서 T2A 펩티드는 제1 결정 인자로부터 임의의 TCR 알파쇄 서열 (즉, 임의의 TCR 가변 도메인 서열 뿐만 아니라, 통합 부위에 대해 5' 방향의 엑손 1 및 엑손 2의 부분에 의해 코딩되는 임의의 불변 영역 서열)을 제거할 수 있다. *TRAC* 유전자가 파괴되기 때문에, 기능성 TCR 알파쇄 중 어느 것도 조작된 세포에서 생성될 수 없다. 트랜스진에 P2A 코딩 서열을 포함하기 때문에, 조작된 유전자좌는 모든 개별 Treg 유도 인자(들)를 별개의 폴리펩티드로서 발현할 수 있다. 본 접근법에, 줄기 또는 전구 세포는 원하는 항원-인식 수용체 (예컨대, 관심 항원을 표적화하는 TCR 또는 CAR)를 발현하도록 추가로 조작될 수 있다.
- [0036] 도 2에 도시된 접근법에서, 이중 서열은 5'에서 3'으로 (i) 통합 부위에 대해 3' 방향의 *TRAC* 엑손 서열 (즉, 통합 부위 하류의 나머지 엑손 2 서열 및 전체 엑손 3 서열), (ii) T2A에 대한 코딩 서열 (또는 IRES 서열), (iii) 하나 이상의 결정 인자에 대한 코딩 서열, 및 (iv) 폴리A 부위를 함유할 수 있다. 이중 서열에 *TRAC* 엑손 서열 및 T2A를 포함함으로써 무손상 TCR 알파쇄를 생성할 수 있게 될 것이다. P2A를 포함함으로써 결정 인자(들)를 별개의 폴리펩티드로서 발현할 수 있게 될 것이다. TCR 알파쇄, 외인적으로 도입된 결정 인자(들)는 모두 내인성 TCR 알파쇄 프로모터의 제어하에서 발현된다. 본 접근법은 이미 TCR 알파쇄 및 베타쇄 유전자좌를 재배열한 성숙한 Treg로부터 리프로그래밍된 iPSC를 조작하는 데 특히 적합하다 (도 7 및 하기 논의 참조). 상기 유전자 조작된 iPSC로부터 분화된 Treg는 선조 Treg 세포의 항원 특이성을 유지할 것이다. 추가로, TCR 신호전달이 흉선에서 T 세포 및 Treg 발생에 통합적으로 관여하기 때문에, TCR 알파쇄 발현을 보유함에 따라 T 세포 및 Treg 분화는 증진될 수 있다.
- [0037] 대안적 실시양태에서, 트랜스진은 *TRAC* 엑손보다는 *TRAC* 인트론으로 통합될 수 있다. 예를 들어, 트랜스진은 엑손 2 또는 엑손 3 상류의 인트론에 통합된다. 상기 실시양태에서, 트랜스진을 보유하는 이중 서열은 5'에서 3'으로 스플라이스 수용자 (SA) 서열, 하나 이상의 Treg 결정 인자를 코딩하는 트랜스진, 및 폴리A 부위를 함유할 수 있다. 재배열된 TCR 알파쇄 유전자좌의 발현이 필요한 경우, 이중 서열은 5'에서 3'으로 (i) SA 서열, (ii) 이중 서열 통합 부위 하류의 임의의 엑손(들), (iii) 자가-절단 펩티드에 대한 코딩 서열 또는 IRES 서열, (iv) 하나 이상의 결정 인자를 코딩하는 트랜스진, 및 (v) 폴리A 부위를 함유할 수 있다. 일단 통합되고 나면, SA를 통해 무손상 (즉, 전장) TCR 알파쇄, 자가-절단 펩티드, 및 결정 인자(들)를 코딩하는 RNA 전사체가 발현될 수 있을 것이다. 상기 RNA 전사체의 번역으로 2개 (또는 그 이상)의 별개의 폴리펩티드 생성물 - 무손상 TCR 알파쇄 및 하나 이상의 결정 인자가 생성될 것이다. SA 서열의 예로는 *TRAC* 엑손의 것 및 당업계에 공지된 다른 SA 서열이 있다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 조작된 세포의 게놈 세이프 하버 내로 통합된다. 게놈 세이프 하버 부위는 제한 없이, *AAVS1* 유전자좌; *ROSA26* 유전자좌; *CLYBL* 유전자좌; 알부민, *CCR5*, 및 *CXCR4*에 대한 유전자 유전자좌; 및 조작된 세포에서 내인성 유전자가 녹아오된 유전자좌 (예컨대, T 세포 수용체 알파 또는 베타쇄 유전자 유전자좌, HLA 유전자 유전자좌, *CIITA* 유전자좌, 또는  $\beta 2$ -마이크로글로불린 유전자 유전자좌)를 포함한다. 도 3은 상기 접근법을 도시한 것이다. 상기 예에서, 이중 서열은 예컨대, 인트론 1에서 인간 *AAVS1* 유전자 유전자좌 내로 통합된다. 트랜스진을 코딩하는 결정 인자의 발현은 독시사이클린-유도성 프로모터에 의해 제어된다. 독시사이클린-유도성 프로모터는 Tet-반응성 요소의 5-mer 반복부를 포함할 수 있다. 독시사이클린의 조직 배양물로의 도입시, 구성적으로 발현된 유도성 형태의 테트라사이클린-제어 트랜스활성화인자 (rtTA)가 Tet-반응성 요소에 결합하고, 결정 인자(들)의 전사를 개시한다. 도입된 mRNA로부터 생성된 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN)가 인트론 1의 특정 부위 (번개 표시)에서 이중 가닥 파단을 만든다. 플라스미드 DNA 또는 선형화된 이중 가닥 DNA에 의해 도입된 공여자 서열은 5'에서 3'으로 상동성 영역 1, *AAVS1* 엑손 1에 대한 스플라이스에 대한 스플라이스 수용자 (SA), 자가-절단 펩티드 T2A에 대한 코딩 서열, 퓨로마이신-저항성 유전자에 대한 코딩 서열, 폴리A 신호 서열, 5' 게놈 인슐레이터 서열, 독시사이클린-유도성 결정 인자 카세트, CAGG 프로모터로부터 구동되고, 후속하여 폴리A 서열이 이어지는 rtTA 코딩 서열, 3' 게놈 인슐레이터 서열, 및 상동성 영역 2를 함유한다. 게놈 인슐레이터 서열은 그 안의 트랜스진이 확실히 분화 과정 동안 후성적으로 침묵화되지 않게 한다. 상동성 영역은 ZFN 절단 부위에 플랭킹하는 게놈 영역과 상동성이다. 표적화된 통합 (TI)이 성공적으로 이루어진 세포는 퓨로마이신을 배양물에 도입함으로써 표적화된 통합에 대해 양성적으로 선별될 수 있다. 증배, 조혈 또는 림프구 발생 동안 특정 인자가 독성일 수 있으며, 이에 Treg 유도 인자의 유도성 발현은 유용하고, 따라서, 오직 T 세포 발생 동안에만 인자를 작동 개시시켜 분화가 Treg 계통으로 편향되도록 하는 것이 이

롭다.

**[0039]** 일부 실시양태에서, 이중 서열은 예컨대, 키메라 항원 수용체 (CAR)와 같은 항원 결합 수용체에 대한 발현 카세트를 함유한다. **도 5** 및 **6**은 상기 실시양태의 예를 도시한 것이다. **도 5**에서, 이중 서열은 플라스미드 DNA 또는 선형화된 이중 가닥 DNA에 의해 도입되고, 5'에서 3'으로 상동성 영역 1, 그 자신의 프로모터로부터 구동되고, 폴리A 부위를 함유하는 (공여자에 대해 안티센스 방향의) CAR 발현 카세트, 5' LoxP 부위, AAVS1 엑손 1에 대한 스플라이스에 대한 스플라이스 수용자, 자가-절단 펩티드 2A에 대한 코딩 서열, 퓨로마이신-저항성 유전자에 대한 코딩 서열, 자살 유전자 HSV-TK에 대한 코딩 서열, 폴리A 부위, 5' 게놈 인슐레이터 서열, 독시사이클린-유도성 결정 인자 발현 카세트, CAGG 프로모터로부터 구동되는 rtTA 코딩 서열, 2A 펩티드를 통해 rtTA 서열에 연결되고, 후속하여 폴리A 서열이 이어지는, 4-히드록시-타목시펜 (4-OHT)-유도성 형태의 Cre 레코μβ이나제에 대한 코딩 서열, 3' 게놈 인슐레이터 서열, 3' LoxP 부위, 및 상동성 영역 2를 함유한다. 게놈 인슐레이터 서열은 그 안의 트랜스진이 확실히 분화 과정 동안 후성적으로 침묵화되지 않게 한다. 상동성 영역은 ZFN 절단 부위에 플랭킹하는 게놈 영역과 상동성이다. 표적화된 통합이 성공적으로 이루어진 세포는 퓨로마이신을 조직 배양물에 도입함으로써 표적화된 통합에 대해 양성적으로 선별될 수 있다. 구성적으로 발현된 4-OHT-유도성 Cre를 통해 4-OHT의 배양물에서의 첨가 후, LoxP 부위 사이의 전체 카세트가 절제될 수 있다. 레코μβ이나제-매개 절제가 이루어지지 않은 세포는 여전히 HSV-TK를 발현할 것이며, 따라서, 간시클로비르 (GCV)를 조직 배양물에 첨가함으로써 음성적으로 선별 (제거)될 수 있다. GCV는 HSV-TK를 발현하는 임의 세포를 세포 사멸에 이르게 할 것이다. 이 시스템을 통해 Treg 유도 카세트를 완전히 흔적 없이 제거할 수 있으며, 동시에, CAR 카세트는 통합된 상태 그대로 유지되고, 이에 따라 조작된 Treg에서 표적화된 면역억제가 이루어질 수 있다.

**[0040]** **도 6**은 조작된 *TRAC* 유전자로부터의 CAR의 발현을 도시한 것이다. 상기 예에서, 플라스미드 DNA 또는 선형화된 dsDNA에 의해 도입된 이중 서열은 5'에서 3'으로 상동성 영역 1, CAR 코딩 서열에 직접 융합되고, 후속하여 폴리A 부위가 이어지는 2A-코딩 서열, 5' LoxP 부위, 5' 게놈 인슐레이터 서열, AAVS1 엑손 1에 대한 스플라이스에 대한 스플라이스 수용자, 2A 코딩 서열, 이 둘 모두 그 자신의 프로모터로부터 구동되고, 후속하여 폴리A 신호 서열이 이어지는, 퓨로마이신-저항성 유전자에 대한 코딩 서열과 2A 펩티드-연결된, 자살 유전자 HSV-TK에 대한 코딩 서열, 독시사이클린-유도성 Treg 유도 인자 발현 카세트, CAGG 프로모터로부터 구동되는 rtTA 코딩 서열, 2A 펩티드를 통해 rtTA 서열에 연결되고, 후속하여 폴리A 서열이 이어지는, 4-OHT-유도성 형태의 Cre 레코μβ이나제에 대한 코딩 서열, 3' 게놈 인슐레이터 서열, 3' LoxP 부위, 및 상동성 영역 2를 함유한다. 게놈 인슐레이터 서열은 그 안의 트랜스진이 확실히 분화 과정 동안 후성적으로 침묵화되지 않게 한다. 상동성 영역은 ZFN 절단 부위에 플랭킹하는 게놈 영역과 상동성이다. 표적화된 통합이 성공적으로 이루어진 세포는 퓨로마이신을 조직 배양물에 도입함으로써 (임의적으로, 비통합 공여자 에피솜이 희석되도록 1주 이상 기다림으로써) 표적화된 통합에 대해 양성적으로 선별될 수 있다. 구성적으로 발현된 4-OHT-유도성 Cre를 통해 4-OHT의 배양물에서의 첨가 후, LoxP 부위 사이의 전체 카세트가 절제될 수 있다. 레코μβ이나제-매개 절제가 이루어지지 않은 세포는 여전히 HSV-TK를 발현할 것이며, 따라서, GCV를 조직 배양물에 첨가함으로써 제거될 수 있다. 이 시스템을 통해 Treg 유도 카세트를 완전히 흔적 없이 제거할 수 있으며, 동시에, 내인성 *TRAC* 프로모터로부터 구동되는 CAR 카세트는 통합된 상태 그대로 유지되고, 이에 따라 조작된 Treg에서 표적화된 면역억제가 이루어질 수 있다.

**[0041]** **도 11**은 독시사이클린-유도성 프로모터로부터 구동되는, 각각 VPH 활성화 도메인 또는 KRAB 억제 도메인에 융합된 죽은 Cas9 (dCas9)를 포함하는 CRISPR 활성화 (CRISPRa) 또는 억제 (CRISPRi) 라이브러리를 인간 *AAVS1* 유전자의 인트론 1 내로 통합하기 위한 게놈 편집 접근법을 도시한 개략도이다. 독시사이클린의 배양물로의 도입 시, 구성적으로 발현된 유도성 형태의 테트라사이클린-제어 트랜스활성화인자 (rtTA)가 Tet-반응성 요소에 결합하고, 통합된 CRISPRa 또는 CRISPRi 구축물의 전사를 개시한다. 상기 라이브러리는 인간 게놈에서 모든 코딩 유전자로 표적화되는 gRNA를 함유하는 반면, 세포당 최대 1개 또는 2개의 dCas9-gRNA 구축물만 통합될 것이다 (단일- 또는 이중-대립유전자 표적화된 통합). 도입된 mRNA로부터 생성된 ZFN아 인트론 1의 특정 부위 (번개 표시)에서 이중 가닥 과단을 만든다. 플라스미드 DNA 또는 선형화된 dsDNA에 의해 도입된 공여자 서열은 5'에서 3'으로 상동성 영역 1, AAVS1 엑손 1에 대한 스플라이스에 대한 스플라이스 수용자, 자가-절단 펩티드 2A에 대한 코딩 서열, 퓨로마이신-저항성 유전자에 대한 코딩 서열, 폴리A 신호 서열, 5' 게놈 인슐레이터 서열, 독시사이클린-유도성 CRISPRa 또는 CRISPRi 구축물 라이브러리, CAGG 프로모터로부터 구동되고, 후속하여 폴리A 서열이 이어지는 rtTA 코딩 서열, 3' 게놈 인슐레이터 서열, 및 상동성 영역 2를 함유한다. 게놈 인슐레이터 서열은 그 안의 트랜스진이 확실히 분화 과정 동안 후성적으로 침묵화되지 않게 한다. 상동성 영역은 ZFN 절단 부위에 플랭킹하는 게놈 영역과 상동성이다. 표적화된 통합이 성공적으로 이루어진 세포는 퓨로마이신을 배양물에 도입함으로써 표적화된 통합에 대해 양성적으로 선별될 수 있다. 중배엽, 조혈 또는 림프구 발생 동안 라

이브러리 내의 표적화된 특정 유전자의 상향조절 또는 하향조절이 독성일 수 있으며, 이에 CRISPRa 또는 CRISPRi 구축물의 유도성 발현은 유용하고, 따라서, 오직 T 세포 발생 동안 (전구 T 세포 단계 이후)에만 인자를 작동 개시시키거나, 작동 정지시켜 분화가 Treg 계통으로 편향되도록 하는 것이 이롭고, 이를 통해 신규한 Treg 유도 인자 및 경로를 발견할 수 있다.

[0042] 상기 기술된 도면은 단지 본 발명의 일부 실시양태를 예시한 것이다. 예를 들어, 다른 자가-절단 펩티드가 도면에 예시된 T2A 및 P2A 펩티드 대신 사용될 수 있다. 자가-절단 펩티드는 전형적인 길이가 18-22개의 아미노산 길이인 바이러스 유래 펩티드이다. 자가 절단 2A 펩티드는 T2A, P2A, E2A, 및 F2A를 포함한다. 추가로, 코돈 다양화된 버전의 2A 펩티드를 사용하여 하나의 대규모 통합 트랜스진 카세트 상에서 다중 Treg 유도 유전자를 조합할 수 있다. 일부 실시양태에서, IRES는 자가-절단 펩티드 코딩 서열 대신 사용된다. 인트론 및 엑손, 둘 모두 표적화될 수 있다. 추가 요소가 이중 서열에 포함될 수 있다. 예를 들어, 이중 서열은 예컨대, 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소 (WPRE)와 같은 RNA-안정화 요소를 포함할 수 있다.

[0043] **III. 유전자 편집 방법**

[0044] 이중 서열의 특정 게놈 부위 내로의 표적화된 통합을 위한 임의의 유전자 편집 방법이 사용될 수 있다. 트랜스진의 부위 특이적 통합의 정확성을 증진시키기 위해, 이중 서열을 보유하는 구축물은 그의 말단 중 하나 또는 둘 모두에 표적화된 게놈 부위와 상동성인 상동성 영역을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 서열은 T 세포 특이적 유전자 유전자좌 또는 게놈 세이프 하버 유전자 유전자좌에서 표적 게놈 부위와 상동성인 서열을 5' 및 3' 말단 영역 둘 모두에 보유한다. 이중 서열 상의 상동성 영역의 길이는 예를 들어, 50-1,000 염기쌍 길이일 수 있다. 이중 서열의 상동성 영역은 표적화된 게놈 서열과 동일할 수 있지만, 동일할 필요는 없다. 예를 들어, 이중 서열의 상동성 영역은 표적화된 게놈 서열 (예컨대, 이중 서열에서 상동성 영역에 의해 대체되는 서열)과 80% 이상 (예컨대, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상) 상동성이거나, 또는 동일할 수 있다. 추가 실시양태에서, 구축물은 선형화될 때, 한쪽 말단에 상동성 영역 1을 포함하고, 그의 다른 쪽 말단에는 상동성 영역 2를 포함하며, 여기서 상동성 영역 1 및 2는 각각 게놈의 통합 부위에 플랭킹하는 게놈 영역 1 및 게놈 영역 2와 상동성이다.

[0045] 이중 서열을 보유하는 구축물은 화학적 방법 (예컨대, 인산칼슘 형질감염 및 리포펙션), 비-화학적 방법 (예컨대, 전기천공 및 세포 압착), 입자 기반 방법 (예컨대, 마그네토펙션), 및 바이러스 형질도입 (예컨대, 백시니아 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노-연관된 바이러스 (AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터, 및 하이브리드 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 사용)과 같은 임의의 공지된 기술에 의해 표적 세포에 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 구축물은 AAV 바이러스 벡터이며, 곤충 세포/백로바이러스 생산 시스템 또는 포유동물 세포 생산 시스템과 같은 생산 시스템에서 AAV 비리온의 생성을 허용하도록 양 말단에 AAV 역위된 말단 반복 (ITR) 서열을 갖는 것을 포함하여, 게놈이 구축물을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 의해 표적 인간 세포에 도입된다. AAV는 임의의 혈청형, 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV8.2, AAV9, 또는 AAVrh10, 또는 AAV2/8, AAV2/5, 또는 AAV2/6과 같은 슈도타입일 수 있다.

[0046] 이중 서열은 임의의 부위-특이적 유전자 녹인 기술에 의해 TRAC 게놈 유전자좌에 통합될 수 있다. 상기 기술은 제한 없이, 상동성 재조합, 징크 핑거 뉴클레아제 또는 닉카제 (본원에서 집합적으로 "ZFN"), 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 또는 닉카제 (본원에서 집합적으로 "TALEN"), 클러스터링된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복 시스템 (Cas9 또는 cpf1을 사용하는 것과 같은 CRISPR), 메가뉴클레아제, 인테그라제, 레콤비나제, 및 트랜스포즈에 기반한 유전자 편집 기술을 포함한다. 하기 실험 실시예에 예시되는 바와 같이, 부위-특이적 유전자 편집을 위해, 편집 뉴클레아제는 전형적으로 표적화된 게놈 서열에서 DNA 파단 (예컨대, 단일- 또는 이중-가닥 DNA 파단)을 생성하여 표적화된 게놈 서열과 상동성을 갖는 공여자 폴리뉴클레오티드 (예컨대, 본원에 기술된 구축물)가 DNA 파단의 수복을 위한 주형으로서 사용되어 게놈 부위에 공여자 폴리뉴클레오티드가 도입된다.

[0047] 유전자 편집 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. CRISPR 유전자 편집 기술에 대해, 예컨대, 미국 특허 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,865,406, 8,871,445, 8,889,356, 8,895,308, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233, 8,999,641, 9,790,490, 10,000,772, 10,113,167, 및 10,113,167을 참조한다. ZFN 기술 및 T 세포 및 줄기 세포 편집에서 그의 적용에 대해, 예컨대, 미국 특허 8,735,153, 8,771,985, 8,772,008, 8,772,453, 8,921,112, 8,936,936, 8,945,868, 8,956,828, 9,234,187, 9,234,188, 9,238,803, 9,394,545, 9,428,756, 9,567,609, 9,597,357, 9,616,090, 9,717,759, 9,757,420, 9,765,360, 9,834,787, 9,957,526, 10,072,062, 10,081,661, 10,117,899, 10,155,011, 및 10,260,062를 참조한다. 상기 언급된 특허의 개시내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0048] 유전자 편집 기술에서, 유전자 편집 복합체는 복합체의 DNA 결합 특이성을 변경함으로써 특정 게놈 부위를 표적화하도록 적합화될 수 있다. 예를 들어, CRISPR 기술에서, 가이드 RNA 서열은 특정 게놈 영역에 결합하도록 디자인될 수 있고; ZFN 기술에서, ZFN의 징크 핑거 단백질 도메인은 ZFN의 뉴클레아제 또는 니카제 도메인이 부위-특이적 방식으로 게놈 DNA를 절단할 수 있도록 특정 게놈 영역에 특이적인 징크 핑거를 갖도록 디자인될 수 있다. 원하는 게놈 표적 부위에 따라, 유전자 편집 복합체는 그에 맞게 디자인될 수 있다.

[0049] 유전자 편집 복합체의 성분은 예컨대, 전기천공, 리포펙션, 미세주사, 유전자총, 비로솜, 리포솜, 지질 나노입자, 면역리포솜, 다중양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA 또는 mRNA, 및 인공 비리온과 같은 널리 공지된 방법에 의해 트랜스진 구축물과 공동으로 또는 순차적으로 표적 세포로 전달될 수 있다. 예컨대, 소니트론(Sonitron) 2000 시스템(리치-마르 (Rich-Mar))을 사용하는 소노포레이션 또한 핵산 전달에 이용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제 또는 니카제를 포함하는 유전자 편집 복합체의 하나 이상의 성분은 편집하고자 하는 세포에 mRNA로서 전달된다.

[0050] **IV. Treg의 항원 특이성**

[0051] 일부 실시양태에서, 줄기 세포 또는 전구 세포는 예컨대, TCR 또는 CAR과 같은 항원 인식 수용체를 코딩하는 트랜스진을 포함하도록 (예컨대, 본원에 기술된 유전자 편집 방법을 사용하여) 추가로 조작될 수 있다. 대안적으로, 줄기 세포 또는 전구 세포는 이미 재배열된 그의 TCR 알파/베타 (또는 델타/감마) 유전자좌를 갖는 성숙한 Treg로부터 리프로그래밍된 세포이고, 상기 줄기 또는 전구 세포로부터 재분화된 Treg는 그의 선조 Treg의 항원 특이성을 유지할 것이다. 어떤 경우에도, Treg는 특정 치료 목표에 대한 관심 항원에 대한 그의 특이성에 대해 선택될 수 있다.

[0052] 일부 실시양태에서, 관심 항원은 고형 기관 이식편에서 세포에 의해 또는 세포 기반 요법 (예컨대, 골수 이식, 암 CAR T 요법, 또는 세포 기반 재생 요법)에서 세포에 의해 발현되는 것과 같은 다형 동종이계 MHC 분자이다. 이렇게 표적화된 MHC 분자는 제한 없이, HLA-A, HLA-B, 또는 HLA-C; HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, 또는 HLA-DR을 포함한다. 예로서, 관심 항원은 클래스 I 분자 HLA-A2이다. HLA-A2는 이식시 일반적으로 불일치된 조직적합성 항원이다. HLA-A 불일치는 이식 후 불량한 결과와 연관이 있다. MHC 클래스 I 분자는 모든 조직에서 광범위하게 발현되기 때문에, MHC 클래스 I 분자에 특이적인 CAR을 발현하는 조작된 Treg가 이롭고, 따라서, Treg는 이식편의 조직 유형과 상관없이 기관 이식에 사용될 수 있다. HLA-A2에 대한 Treg는 HLA-A2가 상당부의 인구에 의해 발현되고, 따라서, 많은 공여자 기관에서 발현된다는 추가적인 이점을 제공한다. Treg 세포에서 HLA-A2 CAR의 발현이 이식편 거부를 방지하는 Treg 세포의 효능을 증진시킬 수 있다는 것을 보여주는 증거가 있다 (예컨대, 문헌 [Boardman, 상기 문헌 동일]; 문헌 [MacDonald et al., *J Clin Invest.* (2016) 126(4):1413-24]; 및 문헌 [Dawson, 상기 문헌 동일] 참조).

[0053] 일부 실시양태에서, 관심 항원은 자가항원, 즉, 신체의 특정 조직의 자가면역 염증 부위에서 우세하게 또는 고유하게 발현되는 내인성 항원이다. 상기 항원에 특이적인 Treg는 염증이 있는 조직으로 귀소할 수 있고, 국소 면역억제를 유발함으로써 조직-특이적 활성을 발휘할 수 있다. 자가항원의 예로는 아쿠아포린 수로 (예컨대, 아쿠아포린-4 수로), 부신생물 항원 Ma2, 암피피신, 전암-개폐 칼륨 채널, N-메틸-d-아스파르테이트 수용체 (NMDAR), α-아미노-3-히드록시-5-메틸-4-이속사졸프로피온산 수용체 (AMPA), 감상선 퍼옥시다제, 티로글로불린, 항-N-메틸-D-아스파르테이트 수용체 (NR1 서브유닛), Rh 혈액형 항원, 테스모글레인 1 또는 3 (Dsg1/3), BP180, BP230, 아세틸콜린 니코틴성 시냅스후 수용체, 티로트로핀 수용체, 혈소판 인테그린, 당단백질 IIb/IIIa, 칼파스타틴, 시트룰린화 단백질, 알파-베타-크리스탈린, 위벽 세포의 내재 인자, 포스포리파제 A2 수용체 1 (PLA2R1), 및 트롬보스폰딘 1형 도메인-함유 7A (THSD7A)이다. 자가항원의 추가 예는 다발성 경화증-연관된 항원 (예컨대, 수초 염기성 단백질 (MBP), 수초 연관된 당단백질 (MAG), 수초 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG), 단백질질 단백질 (PLP), 희소돌기아교세포 수초 올리고단백질 (OMGP), 수초 연관된 희소돌기아교세포 염기성 단백질 (MOBP), 희소돌기아교세포 특이적 단백질 (OSP/클라우딘 11), 희소돌기아교세포 특이적 단백질 (OSP), 수초-연관된 신경돌기 증식 억제제 NOGO A, 당단백질 Po, 말초 수초 단백질 22 (PMP22), 2'3'-환형 뉴클레오타이드 3'-포스포디에스테라제 (CNPase), 및 그의 단편); 관절 연관된 항원 (예컨대, 시트룰린-치환된 환형 및 선형 펩타이드, II형 콜라겐 펩타이드, 인간 연골 당단백질 39 펩타이드, 케라틴, 비멘틴, 피브리노젠, 및 I, III, IV 및 V형 콜라겐 펩타이드); 및 눈 연관된 항원 (예컨대, 망막 에레스틴, S-에레스틴, 광수용체간 레티노이드-결합 단백질, 베타-크리스탈린 B1, 망막 단백질, 맥락막 단백질, 및 그의 단편)이다. 일부 실시양태에서, Treg 세포에 의해 표적화된 자가항원은 IL23-R (예컨대, 크론병, 염증성 장 질환 또는 류마티스 관절염 치료용), MOG (다발성 경화증 치료용), 또는 MBP (다발성 경화증 치료용)이다. 일부 실시양태에서, Treg는 다

른 관심 항원 (예컨대, B 세포 마커 CD19 및 CD20)을 표적화할 수 있다.

[0054] 일부 실시양태에서, 동종 항원보다 외래 펩티드 (예컨대, CMV, EBV, 및 HSV)를 인식하는 Treg는 TCR 발현의 높아짐을 필요로 하지 않으면서, 동종 항원을 인식함으로써 지속적으로 활성화되는 위험 없이 동종이계 입양 세포 전달 환경에서 사용될 수 있다.

[0055] **V. 게놈 편집을 위해 사용되는 세포**

[0056] 본 개시내용의 조작된 세포는 포유동물 세포, 예컨대, 인간 세포, 농장 동물 (예컨대, 소, 돼지 또는 말)로부터의 세포, 및 애완동물 (예컨대, 고양이 또는 개)로부터의 세포이다. 공급원 세포, 즉, 게놈 편집이 수행되는 세포는 만능 줄기 세포 (PSC)일 수 있다. PSC는 신체에서 임의 유형의 세포를 생성할 수 있는 세포이며, 예를 들어, 배아 줄기 세포 (ESC), 체세포 핵 이식에 의해 유도된 PSC 및 유도된 PSC(iPSC)를 포함한다. iPSC의 T 세포로의 분화에 대해 예컨대, 문헌 [Iriguchi and Kaneko, *Cancer Sci.* (2019) 110(1):16-22]를 참조한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "배아 줄기 세포"는 초기 배아로부터 획득된 만능 줄기 세포를 지칭하고; 일부 실시양태에서, 상기 용어는 이전에 확립된 배아 줄기 세포주로부터 획득된 ESC를 지칭하고, 인간 배아의 최근 파괴에 의해 획득된 줄기 세포는 제외한다.

[0057] 다른 실시양태에서, 게놈 편집을 위한 공급원 세포는 다능성 세포, 예컨대, 중배엽 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 조혈 줄기 세포 (예컨대, 골수 또는 제대혈로부터 단리된 것), 또는 조혈 전구 세포 (예컨대, 림프성 전구 세포)이다. 다능성 세포는 1 초과개의 세포 유형으로 발생할 수 있지만, 세포 유형 잠재능에 있어 만능 세포보다 더 제한적이다. 다능성 세포는 확립된 세포주로부터 유래되거나, 또는 인간 골수 또는 제대로부터 단리될 수 있다. 예로서, 조혈 줄기 세포 (HSC)는 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)-유도 동원, 플렉타사포르-유도 동원, 또는 그의 조합 후에 환자 또는 건강한 공여자로부터 단리될 수 있다. 혈액 또는 골수로부터 HSC를 단리시키기 위해, CD4 및 CD8 (T 세포), CD45 (B 세포), GR-1 (과립구), 및 Iad (분화된 항원-제시 세포)에 대한 항체와 같이, 원치않는 세포에 결합하는 항체에 의해 혈액 또는 골수 중 세포를 패닝할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Inaba, *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 176:1693-1702] 참조). HSC는 CD34에 대한 항체에 의해 양성적으로 선별될 수 있다.

[0058] 일부 실시양태에서, 조작하고자 하는 세포는 비-동종이계 항원을 표적화하는 TCR을 발현하는 성숙한 Treg와 같은 성숙한 Treg로부터 리프로그래밍된 iPSC이다 (문헌 [Takahashi *et al.* (2007) *Cell* 131(5):861-72]). 도 7 및 하기의 추가 논의를 참조한다.

[0059] 편집된 줄기 세포 및/또는 전구 세포는 하기에 추가로 논의되는 바와 같이, 환자에게 이식되기 전에 시험관내에서 Treg 세포로 분화될 수 있다. 대안적으로, 줄기 세포 및/또는 편집된 전구 세포는 환자에게 이식된 이후에 Treg 세포로 분화하도록 유도될 수 있다.

[0060] **1. 추가 게놈 편집**

[0061] 본 발명의 조작된 세포는 상기 기술된 게놈 편집 이전 또는 이후에 추가로 유전자 조작되어 세포를 더 많은 환자 집단에서 더 효과적이고/거나, 더 사용가능하고/거나, 더 안전하게 만들 수 있다. 유전자 조작은 예컨대, 관심 이종 서열의 무작위 삽입 (예컨대, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 또는 트랜스포존을 사용하여 수행), 또는 표적화된 게놈 통합 (예컨대, ZFN, TALEN, CRISPR, 부위 특이적 조작된 레콤비나제, 또는 메가뉴클레아제에 의해 매개되는 게놈 편집을 사용하여 수행)에 의해 수행될 수 있다.

[0062] 예를 들어, 세포는 CAR 또는 TCR 트랜스젠의 세포 게놈 내로의 부위 특이적 통합을 통해 하나 이상의 외인성 CAR 또는 TCR을 발현하도록 조작될 수 있다. 외인성 CAR 또는 TCR은 상기 기술된 바와 같이 관심 항원을 표적화할 수 있다.

[0063] 세포는 또한 Treg의 면역억제 활성을 촉진하기 위해 하나 이상의 치료제를 코딩하도록 편집될 수 있다. 치료제의 예로는 시토카인 (예컨대, IL-10), 케모카인 (예컨대, CCR7), 성장 인자 (예컨대, 다발성 경화증 치료를 위한 재수초화 인자) 및 신호전달 인자 (예컨대, 암피레굴린)를 포함한다.

[0064] 추가 실시양태에서, 세포는 예컨대, 시토카인 방출 증후군 (CRS) 및/또는 신경독성 (예컨대, 항-IL-6 scFv 또는 분비성 IL-12)과 같은 세포 요법의 심각한 부작용 및/또는 독성을 감소시키는 인자를 발현하도록 추가로 조작된다 (예컨대, 문헌 [Chmielewski *et al.*, *Immunol Rev.* (2014) 257(1):83-90] 참조).

[0065] 일부 실시양태에서, EZH1 신호전달은 조작된 세포에서 파괴되어 그의 림프성 결정을 증진시킨다 (예컨대, [Vo

et al., *Nature* (2018) 553(7689):506-10] 참조).

[0066] 일부 실시양태에서, 편집된 세포는 환자에 대해 동종이계 세포일 수 있다. 상기 경우에, 세포는 이들 세포에 대한 숙주 거부 (이식편 거부) 및/또는 숙주에 대한 이들 세포의 잠재적 공격 (이식편 대 숙주 질환)을 감소시키도록 추가로 조작될 수 있다. 추가로 조작된 동종이계 세포는 적합성 문제없이 다수의 환자에서 사용될 수 있기 때문에 특히 유용하다. 따라서, 동종이계 세포는 "범용"으로 불릴 수 있고, "기성품"으로 사용될 수 있다. "범용" 세포를 사용하면 효율이 크게 개선되고, 입양 세포 요법의 비용이 절감된다.

[0067] "범용" 동종이계 세포를 생성하기 위해, 세포는 예를 들어, 하기 중 하나 이상의 것에 대해 널 유전자형을 갖도록 조작될 수 있다: (i) T 세포 수용체 (TCR 알파 쇄 또는 베타 쇄); (ii) 다형성 주조직적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 또는 II 분자 (예컨대, HLA-A, HLA-B, 또는 HLA-C; HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, 또는 HLA-DR; 또는  $\beta$ 2-마이크로글로불린 (B2M)); (iii) 항원 프로세싱 연관 수송체 (예컨대, TAP-1 또는 TAP-2); (iv) 클래스 II MHC 트랜스활성화인자 (CIITA); (v) 부조직적합성 항원 (MiHA; 예컨대, HA-1/A2, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1H, 또는 HB-1Y); (vi) 면역 체크포인트 억제제, 예컨대, PD-1 및 CTLA-4; (vii) VIM; 및 (vi) 그의 임의의 조합.

[0068] 동종이계 조작된 세포는 또한 숙주의 자연 살해 세포 및 항-이식편 거부에 관여하는 다른 면역 세포에 대한 조작된 세포 (특히 HLA 클래스 I이 녹아웃 또는 녹다운된 것)의 내성을 증가시키기 위해 불변 HLA 또는 CD47을 발현할 수 있다. 예를 들어, 결정 인자 트랜스진을 보유하는 이중 서열은 불변 HLA (예컨대, HLA-G, HLA-E, 및 HLA-F) 또는 CD47에 대한 코딩 서열을 추가로 포함할 수 있다. 불변 HLA 또는 CD47 코딩 서열은 자가-절단 펩티드 또는 IRES 서열에 대한 코딩 서열을 통해 이중 서열의 1차 트랜스진에 연결될 수 있다.

[0069] **2. 조작된 세포에서 세이프티 스위치**

[0070] 세포 요법에서, 환자에서 세포의 존재가 더 이상 바람직하지 않을 때, 세포의 증식이 중단될 수 있도록 이식된 세포는 그의 게놈에 "세이프티 스위치"를 함유하는 것이 바람직할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Hartmann et al., *EMBO Mol Med.* (2017) 9:1183-97] 참조). 세이프티 스위치는, 예를 들어, 환자에게 제약 화합물을 투여할 때, 세포가 아포토시스에 들어가도록 활성화되거나, 불활성화되는 자살 유전자일 수 있다. 자살 유전자는 무해한 물질을 인간 세포에서 독성 대사산물로 전환시키는 인간에서 발견되지 않는 효소 (예컨대, 박테리아 또는 바이러스 효소)를 코딩할 수 있다.

[0071] 일부 실시양태에서, 자살 유전자는 단순 포진 바이러스 (HSV)로부터의 티미딘 키나제 (TK) 유전자일 수 있다. TK는 간시클로비르, 발간시클로비르, 팜시클로비르, 또는 또 다른 유사한 항바이러스 약물을, DNA 복제를 방해하고, 세포 아포토시스를 초래하는 독성 화합물로 대사할 수 있다. 따라서, 숙주 세포에서 HSV-TK 유전자는 상기 항바이러스 약물 중 하나를 환자에게 투여함으로써 세포를 사멸시키는 작동을 개시할 수 있다.

[0072] 다른 실시양태에서, 자살 유전자는 예를 들어, 또 다른 티미딘 키나제, 시토신 데아미나제 (또는 우라실 포스포리보실트랜스퍼라제; 항진균성 약물 5-플루오로시토신을 5-플루오로우라실로 변환시키는 것), 니트로리덕타제 (CB1954 ([5-(아지리딘-1-일)-2,4-디니트로벤즈아미드]의 경우)를 독성 화합물로 변환), 4-히드록실아민) 및 시토크롬 P450 (이포스파미드를 아크롤레인 (질소 겨자)으로 변환) (Rouanet et al., *Int J Mol Sci.* (2017) 18(6):E1231), 또는 유도성 카스파제-9 (Jones et al., *Front Pharmacol.* (2014) 5:254)를 코딩한다. 추가 실시양태에서, 자살 유전자는 세포내 항체, 텔로머라제, 또 다른 카스파제, 또는 DNAase를 코딩할 수 있다. 예컨대, 문헌 [Zarogoulidis et al., *J Genet Syndr Gene Ther.* (2013) doi:10.4172/2157-7412.1000139]를 참조한다.

[0073] 세이프티 스위치는 또한 "작동 개시" 또는 "가속기" 스위치, 세포 생존에 중요한 세포 단백질의 발현을 간섭하는 작은 간섭 RNA, shRNA, 또는 안티센스를 코딩하는 유전자일 수 있다.

[0074] 세이프티 스위치는 임의의 적합한 포유동물 및 다른 필요한 전사 조절 서열을 사용할 수 있다. 세이프티 스위치는 본원에 기술된 유전자 편집 기술 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 기술을 이용하여 무작위 통합 또는 부위 특이적 통합을 통해 세포로 도입될 수 있다. 조작된 세포의 유전적 안정성 및 임상적 안전성이 유지되도록 게놈 세이프 하버에 세이프티 스위치를 통합시키는 것이 바람직할 수 있다. 본 개시내용에서 사용되는 바, 세이프 하버의 예는 AAVS1 유전자좌; ROSA26 유전자좌; CLYBL 유전자좌; 알부민, CCR5, 및 CXCR4에 대한 유전자 유전자좌; 및 조작된 세포에서 내인성 유전자가 녹아웃된 유전자좌 (예컨대, T 세포 수용체 알파 또는 베타 쇄 유전자 유전자좌, the HLA 유전자 유전자좌, CIITA 유전자좌, 또는  $\beta$ 2-마이크로글로불린 유전자 유전자좌)이다.

[0075] **VI. 시험관내에서의 세포 리프로그래밍 및 분화**

[0076] 본 개시내용의 세포는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 조직 배양물에서 성숙한 Treg 세포로부터 리프로그래밍되고/거나, Treg 세포로 분화될 수 있다. 하기 기술되는 방법은 단지 예시적인 것일 뿐이며, 제한적이지 않다.

[0077] **1. Treg 세포의 iPSC로의 리프로그래밍**

[0078] 특정 실시양태에서, 유전자 조작을 위한 공급원 세포는 성인, 청소년 또는 태아 Treg 세포로부터 리프로그래밍된 유도 만능 줄기 세포이다 (Takahashi et al., *Cell* (2007) 131(5):861-72). 이러한 실시양태에서, 리프로그래밍된 줄기 세포는 그의 원 Treg 표현형의 후성 유전적 기억을 유지할 것이고 (Kim et al., *Nature* (2010) 467(7313):285-90), 따라서, 예컨대, 상이한 세포 유형으로부터 리프로그래밍된 것과 같은 다른 줄기 세포보다 더 높은 효율로 Treg로 다시 재분화될 수 있다. Treg로부터 리프로그래밍된 줄기 세포는 또한 V(D)J 재배열된 TCR 유전자좌를 유지할 것이며, 이는 V(D)J 재조합이 T 세포 개체 발생 동안의 발생 장애물이기 때문에, 줄기 세포의 Treg 분화 잠재능을 추가로 증진시킬 수 있다 (예컨대, 문헌 [Nishimura et al., *Cell Stem Cell* (2013) 12(1):114-26] 참조).

[0079] 리프로그래밍을 위해 사용되는 Treg 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직 또는 비장 조직을 포함하는 다수의 공급원으로부터 단리될 수 있다. 예를 들어, Treg는 예컨대, 피콜 (Ficoll)<sup>TM</sup> 분리, 적혈구 용해 및 단핵구 고갈 후 퍼콜(PERCOLL)<sup>TM</sup> 구배를 통한 원심분리, 역류 원심 용출, 백혈구성분체집 및 후속 세포 표면 마커 기반 자기 또는 유세포 분석적 단리와 같은 널리 공지된 기술을 이용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 단리될 수 있다.

[0080] 단리된 백혈구로부터의 Treg 세포의 추가 농축은 예컨대, 유세포 분석법 세포 분류 및/또는 접합된 비드를 수반하는 자기 면역부착과 같은 기술을 이용하여 고유한 표면 마커에 대한 항체의 조합을 사용한 양성 및/또는 음성 선별에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 음성 선별에 의해 CD4<sup>+</sup> 세포를 농축시키기 위해, 모노클로날 항체 카테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함할 수 있다. Treg를 농축시키거나, 또는 양성적으로 선별하기 위해, CD4, CD25, CD45RA, CD62L, GITR, 및/또는 CD127에 대한 항체를 사용할 수 있다.

[0081] 예시적이고 비제한적인 프로토콜에서, Treg 세포는 하기와 같이 수득될 수 있다 (문헌 [Dawson et al., *JCI Insight*. (2019) 4(6):e123672] 참조). CD4<sup>+</sup> T 세포는 로제트셋(RosetteSep) (스텝셀 테크놀로지스(STEMCELL Technologies), 15062)를 통해 인간 공여자로부터 단리되고, CD25<sup>+</sup> 세포 (밀테니이 바이오테크(Miltenyi Biotec), 130-092-983)에 대해 농축된 후, 모플로 아스트리오스(MoFlo Astrios) (벡크만 쿨터(Beckman Coulter)) 또는 FACSAria II (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 사용하여 살아있는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>CD127<sup>hi</sup> Treg 또는 CD4<sup>+</sup>CD127<sup>hi</sup>CD25<sup>lo</sup>CD45RA<sup>+</sup>Treg를 분류한다. 분류된 Treg는 문헌 [MacDonald et al., *J Clin Invest*. (2016) 126(4):1413-24]에 기술된 바와 같이 1000 U/ml IL-2 (프로류킨(Proleukin)를 포함하는 이뮤노컬트-XF(ImmunoCult-XF) T 세포 확장 배지 (스텝셀 테크놀로지스, 10981) 중에서 L 세포 및 항-CD3 모노클로날 항체 (예컨대, OKT3, UBC AbLab; 100 ng/ml)로 자극시킬 수 있다. 1일 이상의 시간이 경과한 후, Treg 세포를 하기 기술되는 바와 같이 줄기 세포로 리프로그래밍 (탈분화)할 수 있다. 표현형 분석을 위해, 세포를 고정가능한 생존성 염료 (FVD, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 65-0865-14; 바이오레전드(BioLegend), 423102)로 염색하고, 고정화 및 투과화 이전 표면 마커에 대해 e바이오사이언스(eBioscience) FOXP3/전사 인자 염색 완충제 세트(Transcription Factor Staining Buffer Set) (써모 피셔 사이언티픽, 00-5523-00)을 사용하여 및 세포내 단백질에 대해 염색할 수 있다. CytoFLEX (벡크만 쿨터)를 사용하여 샘플을 판독하였다.

[0082] 이어서, 리프로그래밍 인자, 예컨대, OCT3/4, SOX2, KLF4, 및 c-MYC (또는 L-MYC)를 사용하여 Treg를 iPSC로 리프로그래밍할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Nishino et al., *Regen Ther*. (2018) 9:71-8] 참조). 리프로그래밍 인자는 비통합 방법 (예컨대, 센다이 바이러스, 플라스미드, RNA, 미니서클, AAV, IDLV 등) 또는 통합 방법 (예컨대, 렌티바이러스, 레트로바이러스 및 뉴클레아제 매개 표적화된 통합)을 통해 전달될 수 있다.

[0083] 도 7은 성숙한 Treg를 iPSC로 리프로그래밍한 후, 이어서, 확장되고, 고효율로 Treg 세포로 재분화되는 프로세스를 도시한 것이다. 상기 프로세스는 단일 Treg 세포로부터 확장된 "회춘된" Treg 세포 풀을 제공한다.

[0084] **2. CD4<sup>+</sup> Treg 계통으로의 줄기 세포 분화의 편향**

[0085] 조작된 줄기 세포는 그의 계통내 결정 인자 코딩 트랜스진의 존재에 기인하여 증가된 Treg 분화 잠재능을 갖는다. 도 8은 iPSC가 Treg 세포로 분화되는 단계적 분화 프로세스를 도시한 것이다: iPSC, 중배엽 줄기 (전구) 세포, HSC, 림프성 전구 세포, 전구 T 세포, 미성숙 단일 양성 (CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>) T 세포, 이중 양성 T 세포 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), 성숙한 CD4<sup>+</sup> T 세포, 및 마지막으로, Treg 세포. 상기 줄기 세포가 CD4<sup>+</sup> T 세포 및 궁극적으로 Treg 세포가 되도록 그의 분화를 편향시키기 위해, 조직 배양 기술을 사용할 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, CD4<sup>+</sup> T 세포 및 Treg 계통으로 분화를 편향시키기 위해, T 세포 발생의 후기 단계 동안 줄기 세포에 대해 IL-7Ra(CD127) 신호전달 차단을 수행한다 (문헌 [Singer et al., *Nat Rev Immunol.* (2008) 8(10):788-801] 참조; 도 8 및 도 9). 다른 실시양태에서, CCR7 신호전달은 T 세포 발생 동안 차단된다. CCR7은 CD4<sup>+</sup> T 세포와 비교하여 CD8<sup>+</sup> T 세포에서 상향조절되고, 전구 T 세포의 CD8<sup>+</sup> 운명으로의 결정을 촉진시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Yin et al., *J Immunol.* (2007) 179(11):7358-64] 참조). 특정 실시양태에서, IL-2 농도는 높은 수준의 고친화성 IL-2 수용체 (CD25)를 발현하는 Treg에 증식성 성장 이점을 제공하기 위해 낮아진다 (문헌 [Singer, 상기 문헌 동일]; 도 8). 특정 실시양태에서, Treg 증식을 우선적으로 촉진시키는 활성화 비드를 사용하여 이펙터 T 세포와 비교하여 Treg를 우선적으로 활성화 및 확장시킨다 (예컨대, 써모 피셔 사이언티픽으로부터의 Treg X판더(Treg Xpander) 비드).

[0087] 도 10은 이용될 수 있는 추가의 조직 배양 기술을 도시한 것이다. 본 도면에서 예시된 일부 실시양태에서, 조작된 줄기 세포를 중간엽 기질 세포와 함께 공동 배양한다 (문헌 [Di Ianni et al., *Exp Hematol.* (2008) 36(3):309-18] 참조). 상기 기질 세포의 예는 림프성 결절을 촉진시키는 OP9 또는 OP9-DLL1 기질 세포를 포함한다 (문헌 [Hutton et al., *J Leukocyte Biology* (2009) 85(3):445-51]; 도 10 참조). 다른 실시양태에서, 배아 중배엽 전구체는 만능 줄기 세포로부터 형성되고, MS5-DLL1/4 세포 또는 EpCAM<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> 기질 세포 상에서의 공동 배양을 통해 3차원 배아 중배엽 오르가노이드에서 배양된다 (도 10). 이어서, 상기 배아 중배엽 전구체는 흥선 발생 프로세스를 더욱 정확하게 복제하기 위해 인공 흥선 오르가노이드로 분화된다 ([Montel-Hagen et al., *Cell Stem Cell* (2019) 24(3):376-89.e8]; [Seet et al., *Nat Methods* (2017) 14(5): 521-30]).

[0088] **3. Treg 표현형 유지**

[0089] 유연성은 거의 모든 유형의 면역 세포에 고유한 특성이다. Treg 세포는 염증 및 환경 조건하에 Teff 세포로 전환 ("드리프트")될 수 있는 것으로 보인다 (문헌 [Sadlon et al., *Clin Transl Immunol.* (2018) 7(2):e1011] 참조). Treg 표현형을 유지하고/거나, 조작된 Treg 세포에서 트랜스진(들) (예컨대, FOXP3, Helios, 및/또는 ThPOK)의 발현을 증가시키기 위해, 세포를 라파마이신 및/또는 고농도의 IL-2를 함유하는 조직 배양 배지에서 배양할 수 있다 (예컨대, 문헌 [MacDonald et al., *Clin Exp Immunol.* (2019) doi: 10.1111/cei.13297] 참조). 일부 실시양태에서, Teff와 비교하여 Treg를 우선적으로 확장시키기 위해, 세포를 저용량의 IL-2를 함유하는 조직 배양 배지 중에서 배양할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Congxiu et al., *Signal Transduct Targ Ther.* (2018) 3(2):1-10] 참조).

[0090] **VII. 조작된 Treg 세포의 용도**

[0091] 본 개시내용의 유전자 조작된 Treg 세포는 면역 관용의 유도 또는 면역 항상성의 복원을 필요로 하는 환자 (예컨대, 인간 환자)를 치료하기 위한 세포 요법에서 사용될 수 있다. 용어 "치료하는" 및 "치료"는 치료되는 병태의 하나 이상의 증상의 경감 또는 제거, 증상의 발생 또는 재발의 예방, 조직 손상의 역전 또는 개선, 및/또는 질환 진행의 둔화를 지칭한다.

[0092] 본원에서 환자는 예컨대, 자가면역 질환과 같은 원치않는 염증 병태를 앓거나, 또는 그를 앓을 위험이 있는 환자일 수 있다. 자가면역 질환의 예는 에디슨 질환, AIDS, 강직성 척추염, 항-사구체 기저막 질환, 자가면역, 간염, 피부염, 굿파스처 증후군(Goodpasture's syndrome), 다발혈관염을 동반한 육아종증, 그레이브스 질환(Graves' disease), 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 용혈성 빈혈, 헤노흐-쇤라인 자반병(Henoch-Schonlein purpura: HSP), 소아 관절염, 소아 근염, 가와사키 질환(Kawasaki disease), 염증성 장 질환 (예컨대, 크론병 및 궤양성 대장염 등), 다발근염, 폐포 단백증, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 시신경 척수염, PANDAS, 건선, 건선 관절염, 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 전신 경피증, 전신 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 혈소판 감소성 자반병 (TTP), I형 진성 당뇨병, 포도막염, 혈관염, 백반증, 및 보고트-고야나기-하라다 질환(Vogt-Koyanagi-Harada Disease)이다.

- [0093] 일부 실시양태에서, Treg는 자가면역 질환과 연관된 자가항원, 예컨대, 수초 회소돌기아교세포 당단백질 (다발성 경화증), 수초 단백질 제로 (자가면역 말초 신경병증), HIV env 또는 gag 단백질 (AIDS), 수초 염기성 단백질 (다발성 경화증), CD37 (전신 홍반성 루푸스), CD20 (B-세포 매개된 자가면역 질환), 및 IL-23R (예컨대, 크론병 또는 궤양성 대장염과 같은 염증성 장 질환)을 표적화하는 항원 결합 수용체 (예컨대, TCR 또는 CAR)를 발현한다.
- [0094] 본원에서 환자는 동종이계 이식편, 예컨대, 동종이계 조직 또는 고형 기관 이식 또는 동종이계 세포 요법을 필요로 하는 환자일 수 있다. 하나 이상의 동종이계 MHC 클래스 I 또는 II 분자를 표적화하는 CAR을 발현하는 것과 같은 본 개시내용의 Treg는 환자에게 도입될 수 있으며, 여기서 Treg는 이식편으로 귀소하여 숙주 면역계에 의해 유발되는 동종이식편 거부 및/또는 이식편 대 숙주 거부를 억제시킬 것이다. 조직 또는 기관 이식 또는 동종이계 세포 요법을 필요로 하는 환자는, 예컨대, 신장 이식, 심장 이식, 간 이식, 췌장 이식, 장 이식, 정맥 이식, 골수 이식, 및 피부 이식을 필요로 하는 환자; 재생 세포 요법을 필요로 하는 환자; 유전자 요법 (AAV 기반 유전자 요법)을 필요로 하는 환자; 및 암 CAR T 요법을 필요로 하는 환자를 포함한다.
- [0095] 원하는 경우, (생체내에서 Treg로 분화되는 조작된 만능성 또는 다능성 세포를 받는 환자를 포함하여) 본원에서 조작된 Treg를 받는 환자는 세포 이식편의 도입 전에 약한 골수절제 기술 또는 강력한 골수절제 컨디셔닝 요법으로 치료된다.
- [0096] 본 개시내용의 조작된 세포는 세포 및 제약상 허용되는 담체를 함유하는 제약 조성물에 제공될 수 있다. 예를 들어, 제약 조성물은 멸균수, 생리 식염수 또는 중성 완충처리된 염수 (예컨대, 포스페이트 완충처리된 염수), 염, 항생제, 등장제, 및 다른 부형제 (예컨대, 글루코스, 만노스, 수크로스, 텍스트란, 만니톨; 단백질 (예컨대, 인간 혈청 알부민); 아미노산 (예컨대, 글리신 및 아르기닌); 항산화제 (예컨대, 글루타티온); 킬레이트제 (예컨대, EDTA); 및 보존제를 포함한다. 제약 조성물은 Treg 표현형 및 성장을 지지하는 인자 (예컨대, IL-2 및 라파마이신 또는 그의 유도체), 항-염증성 시토카인 (예컨대, IL-10, TGF- $\beta$  및 IL-35), 및 세포 요법을 위한 다른 세포 (예컨대, 암 요법을 위한 CAR T 이펙터 세포 또는 재생 요법을 위한 세포)를 추가로 포함할 수 있다. 보관 및 운송을 위해, 세포를 임의적으로 동결보존시킬 수 있다. 사용 전, 세포를 해동시키고, 제약상 허용되는 담체 중에 희석시킬 수 있다.
- [0097] 본 개시내용의 제약 조성물은 (예컨대, 정맥내 주사 또는 주입을 통한) 전신 투여 또는 관심 조직에의 국소 주사 또는 주입 (예컨대, 간동맥을 통한 주입, 및 뇌, 심장, 또는 근육으로의 주사)을 통해 치료 유효량으로 환자에게 투여된다. 용어 "치료 유효량"은 환자에게 투여될 때, 치료를 발휘하기에 충분한 제약 조성물의 양, 또는 세포의 개수를 지칭한다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 제약 조성물의 단일 투약 단위는  $10^4$ 개 초과인 세포 (예컨대, 약  $10^5$  내지 약  $10^6$ 개 세포, 약  $10^6$  내지 약  $10^{10}$ 개, 약  $10^6$  내지  $10^7$ 개, 약  $10^6$  내지  $10^8$ 개, 약  $10^7$  내지  $10^8$ 개, 약  $10^7$  내지  $10^9$ 개, 또는 약  $10^8$  내지  $10^9$ 개 세포)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물의 단일 투약 단위는 약  $10^6$ 개, 약  $10^7$ 개, 약  $10^8$ 개, 약  $10^9$ 개, 또는 약  $10^{10}$ 개 또는 그 초과인 세포를 포함한다. 환자는 제약 조성물로 2일에 1회, 3일에 1회, 4일에 1회, 1주일에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 1개월에 1회, 또는 환자에서 충분한 조작된 Treg 세포 집단을 확립하는 데 필요한 또 다른 빈도로 투여될 수 있다.
- [0099] 본원에 기술된 바와 같은 징크 핑거 뉴클레아제 또는 다른 뉴클레아제 및 폴리뉴클레오티드 중 임의의 것을 포함하는 제약 조성물 또한 제공한다.
- [0100] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 예시적인 방법 및 물질이 하기에 기술되지만, 본원에 기재된 것과 유사하거나, 등가인 방법 및 물질 또한 본 개시내용의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다. 상충하는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다. 일반적으로, 본원에 기술된 심장학, 의학, 의약 및 제약 화학, 및 세포 생물학과 관련하여 사용되는 명명법 및 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 일반적으로 사용되는 것이다. 효소 반응 및 정제 기술은 관련 기술분야에서 일반적으로 달성되거나, 또는 본원에 기술된 바와 같이 제조사의 설명서에 따라 수행된다. 추가로, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하여야 하고, 복수 용어는 단수를 포함하여야 한다. 본 명세서 및 실시양태 전반에 걸쳐, 단어 "갖다 (have)" 및 "포함하다(comprise)," 또는 예컨대, "갖다(has)," "갖는," "포함하다(comprises)," 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 정수 군을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 정수 군을 배제하지

않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 본원에서 언급된 모든 공개문헌 및 다른 참조문헌은 그 전문이 참조로 포함된다. 많은 문서가 본원에서 인용되었지만, 이러한 인용은 상기 문서들 중 임의의 것이 관련 기술분야의 공통된 일반 지식의 일부를 형성한다는 것을 인정하는 것은 아니다. 본원에서 사용되는 바, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 용어 "대략" 또는 "약"은 언급된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본 용어는 달리 언급되거나, 문맥으로부터 달리 명백해지지 않는 한, 언급된 참조 값의 (보다 크거나 보다 작은) 어느 방향으로든 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만에 속하는 값의 범위를 지칭한다.

[0101] 본 발명이 더욱 잘 이해될 수 있도록 하기 위해, 하기 실시예를 기술한다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 어느 방식으로도 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0102] 실시예

[0103] **실시예 1: iPSC의 AAVS1 유전자 유전자좌 내로의 트랜스진 통합**

[0104] 본 실시예는 도 3에 도시된 바와 같이, 녹색 형광 단백질 발현 카세트를 AAVS1 유전자 유전자좌 내로 통합시킨 실험을 기술한다. -7일째 전기천공을 통해 AAVS1 ZFN mRNA 및 공여자 플라스미드를 iPSC로 전달하였다. 1주일 후 (0일째), 푸로마이신 (0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 조직 배양물에 첨가하여 표적화된 통합이 이루어진 세포에 대한 양성 선별을 시작하였다. 15일째 독시사이클린을 첨가하고, 3가지 상이한 용량 (0.3, 1 및 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )으로 배양물에서 유지하여 dox-유도성 GFP 발현 카세트의 발현을 유도하였다. 대조군 세포는 배양물 중에 독시사이클린을 첨가하지 않았다. 13일 동안 독시사이클린의 존재하에서 세포를 유지시켰다. 상기 기간 동안, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  용량의 독시사이클린하에서 최고 수준의 유도성 GFP 트랜스진 발현을 얻었다 (94%; 도 4). 독시사이클린이 배양물 중에 존재하는 동안, 상기 고수준의 발현이 유지되었다. 15일째부터 28일째까지 푸로마이신 뿐만 아니라, 독시사이클린 중에서 세포를 유지시키고, 추가로 양성적으로 선별하였다 (표적화된 통합이 이루어진 대립유전자 ~50%에서 ~70%로 증가).

[0105] **실시예 2: CD4<sup>+</sup> Treg 계통으로의 iPSC 분화의 편향**

[0106] iPSC가 CD4<sup>+</sup> T 세포 및 궁극적으로 Treg 세포가 되도록 그의 분화를 편향시키기 위해, IL-7 수용체의 알파 유닛 (IL-7Ra)을 표적화하는 항체를 사용하여 줄기 세포에 대해 IL-7 수용체를 통한 신호전달 차단을 수행하였다. T 세포 발생의 후기 단계 동안 항-IL-7Ra 항체를 농도를 증가시키면서 세포 배양 배지에 첨가하였다. 2회의 이중 실험 (Expt. 1 및 Expt. 2), 둘 모두, 항-IL-7Ra 항체 첨가는 CD8<sup>+</sup> 단일 양성 세포의 비율(%)은 감소시키면서 (좌측 상단 사분면), CD4<sup>+</sup> 단일 양성 세포의 비율(%)은 비처리된 세포의 경우, 2.81% 또는 4.78%인 것과 비교하였을 때, 6.9% (Expt. 1) 또는 7.7% (Expt. #2)에 도달하였으며, 상기 비율을 증가시켰다는 것을 보여준다 (우측 하단 사분면) (도 9).

[0107] **실시예 3: TiPSC 및 CD34 유래 iPSC로부터의 T 세포 생성**

[0108] 본 실시예는 CD34<sup>+</sup> HSPC로부터 리프로그래밍된 iPSC 대비 성숙한 T 세포 (Treg, CD4<sup>+</sup>, 및 CD8<sup>+</sup> 세포)로부터 리프로그래밍된 iPSC (본원에서 "TiPSC"로 명명)로부터 분화된 T 세포를 획득하는 효율을 비교하는 연구를 기술한다.

[0109] T 세포 및 CD34<sup>+</sup> HSPC를 리프로그래밍하기 위해, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 백혈구성분채집을 통해 건강한 인간 공여자로부터 획득하였다. CliniMACS®(밀테니이 바이오테크)를 통해 별크 T 세포에 대한 사전 자기 항체 매개 농축 후 유세포 분석기 (소니(Sony) SH800)에서 T 세포 서브셋을 분류하여 나이브 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>lo</sup>CD127<sup>hi</sup>CD45RA<sup>+</sup> Treg, 별크 CD4<sup>+</sup> T 세포, 및 별크 CD8<sup>+</sup> T 세포를 획득하였다. 센다이 바이러스 기반 리프로그래밍 키트 (썬코 피셔 사이언티픽)를 사용하여 상기 T 세포 하위집단을 리프로그래밍하였다. CliniMACS®를 통해 PBMC로부터 CD34<sup>+</sup> 세포를 농축시켰다.

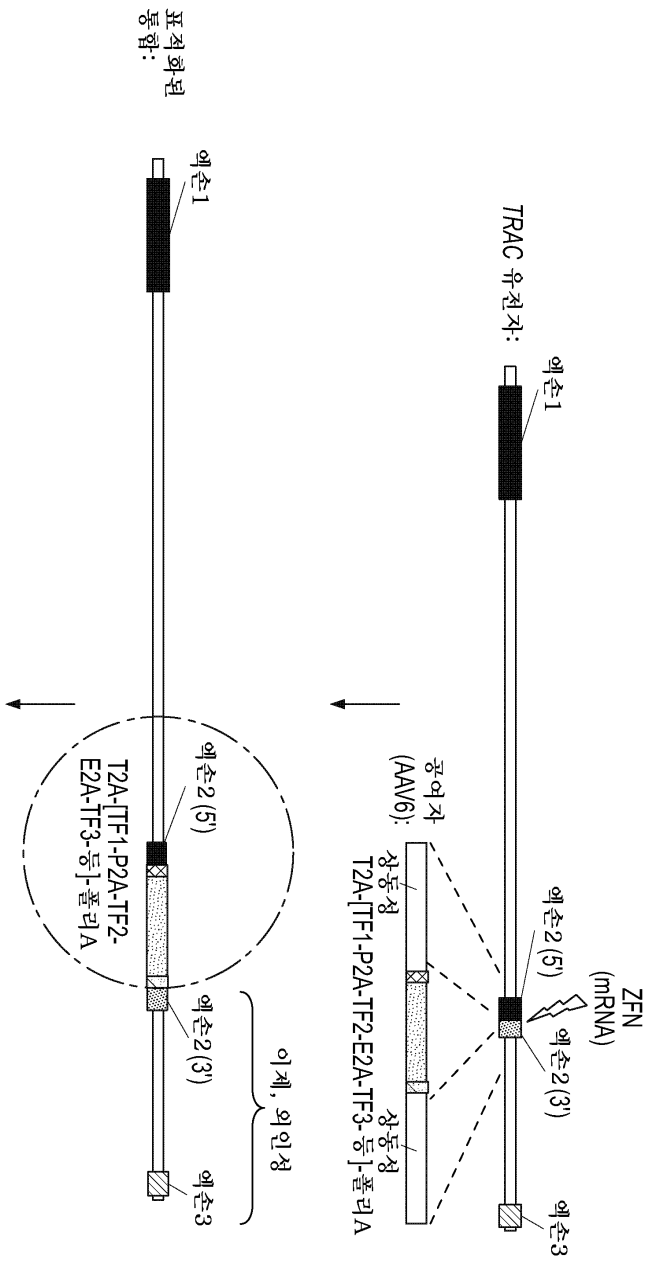
[0110] 적어도 2개의 실험에서 나이브 Treg, CD4<sup>+</sup> T 세포, CD8<sup>+</sup> T 세포, 또는 CD34<sup>+</sup> 줄기 세포로부터 유래된 적어도 2개의 상이한 클론에서 분석을 수행하였다. 56일 동안에 걸쳐 iPSC가 T 세포로 분화되도록 하였다.

[0111] 도 12의 데이터는 TiPSC가 CD3 및 TCR  $\alpha\beta$ , 둘 모두 발현하는 세포로 효율적으로 분화된다는 것을 입증한다 (패널 a 및 b). 두 T 세포 마커, 둘 모두의 공동 발현은 TiPSC 세포주에서 20%를 초과하였다. 그에 반해, CD34 유래 iPSC 세포주로부터 분화된 세포 중 단 5%만이 CD3 및 TCR  $\alpha\beta$ 를 발현하였다. P 값은 하기와 같다: 나이브

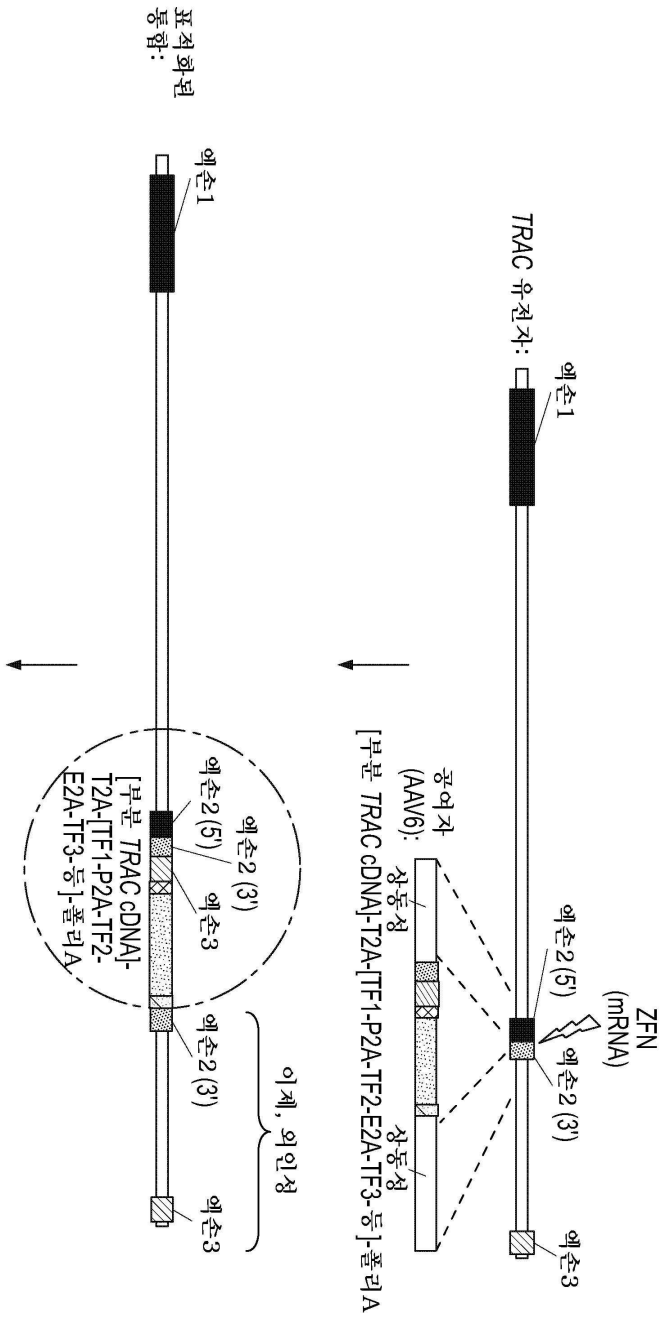
Treg = 0.03, CD4=0.48, CD8=0.02.

- [0112] 분화된 iPSCs는 살아있는/단일 세포로부터 게이팅될 때, T 세포의 다양한 하위집단을 생성하였다 (도 12, 패널 c). T 세포의 하위집단은 CD3<sup>+</sup>TCR α β<sup>+</sup> 세포였고, CD4<sup>sp</sup>, CD8<sup>sp</sup>, 이중 양성 (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), 및 이중 음성 세포를 포함하였다. 데이터는 오직 나이브 Treg<sup>-</sup> 및 CD8 유래 iPSC만이 CD34 유래 iPSC보다 유의적으로 더 적은 이중 음성 세포를 생성하였다는 것을 보여준다. P 값은 하기와 같다: 나이브 Treg=0.004, CD8=0.03.
- [0113] 그에 반해, CD34 유래 iPSC로부터 CD3 및 TCR α β를 발현하는 하위집단은 생성될 수 없었다 (도 12, 패널 d). 본 데이터는 CD4 유래 iPSC가 CD3<sup>+</sup>TCR α β<sup>+</sup>이기도 한 CD8<sup>sp</sup> 세포를 CD34 유래 iPSC보다 훨씬 더 많이 생성하였다는 것을 보여준다 (P 값=0.02).
- [0114] **실시예 4: iPSC 유래 T 세포에서의 FOXP3 및 항-HLA-A2 CAR 발현**
- [0115] 본 실시예는 도 2에 도시된 접근법을 사용한 유전자 편집 연구에 대한 데이터를 제시한다. 본 연구에서, 편집된 iPSC *TRAC* 유전자좌는 5'에서 3'으로, (i) 통합 부위에 대해 3' 방향의 *TRAC* 엑손 서열 (즉, 통합 부위 하위의 나머지 엑손 2 서열 및 전체 엑손 3 서열), (ii) T2A에 대한 코딩 서열; (iii) (a) FOXP3/Helios/CAR, (b) FOXP3/CAR, (c) FOXP3, 또는 (d) GFP에 대한 코딩 서열; 및 (iv) 폴리A 부위를 함유하였다. TCR 알파 쇠 및 트랜스진은 모두 내인성 TCR 알파 쇠 프로모터의 제어하에서 발현되었다. 명확성을 위해, 모든 트랜스진 코딩 서열은 폴리시스트론 발현을 허용하기 위해 이웃 트랜스진들 사이에 인-프레임 2A 자가-절단 펩티드 코딩 서열을 함유하였다.
- [0116] 편집된 iPSC를 배아체 방법을 사용하여 CD34<sup>+</sup> 조혈 줄기 전구 세포 (HSPC) 로 분화시킨 후, 스템스판™ T 세포 생성 키트(StemSpan™ T Cell Generation kit)(스템셀 테크놀로지즈)를 사용하여 DP T 세포로 분화시켰다 (LDCM에서 2주 확장 및 1주 성숙화). 가용성 CD3/CD28/CD2 활성화제로 자극시켜 DP T 세포를 추가로 분화시켰다. 형광 태깅부착된 HLA-A2 텍스트라머와 함께 세포를 인큐베이션시켜 CAR 발현을 분석하였다.
- [0117] 본 데이터는 *TRAC* 유전자좌에서 편집된 iPSC 유래 T 세포에서 트랜스진 구축물에 의해 도입된 부분 TCR 코딩 서열이 TCR α β 발현을 유지할 수 있었고, FOXP3 및 CAR 트랜스진은 이들 세포에서도 과다발현되었다는 것을 보여준다 (도 13a).
- [0118] iPSC 유래 T 세포를 그의 시토카인 생산 프로파일에 대해 추가로 평가하였다. 루미넥스 FLEXMAP 3D(Luminex FLEXMAP 3D)® 기기에서 시토카인 분비(IL-10, IFN-γ, TNF-α, 및 IL-2)를 분석하기 전에 세포를 200 μl X-VIVO™ 배지 론자(Lonza))에서 3일 동안 배양하였다. 시토카인 농도를 배양물에 시딩된 전체 생 세포로 정규화하였다. 본 데이터는 편집된 FOXP3 또는 FOXP3-2A-CAR 트랜스진 구축물을 함유하는 iPSC 유래 T 세포에서, 이펙터 T 세포의 분화/활성화의 억제력을 통한 조절 T 세포의 억제 기능과 연관된 면역억제 시토카인인 IL-10의 분비가 증가하였다는 것을 보여준다 (도 13b). TNF-α 분비에서 어떤 주요 차이도 관찰되지 않았지만, IL-2 및 IFN-γ 분비는 FOXP3 및 FOXP3-2A-CAR 트랜스진 구축물을 포함하는 세포에서 감소하였다. IL-2는 이펙터 T 세포의 생존과 증식을 촉진시키는 데 중요하며, IL-2의 고갈은 조절 T 세포가 그의 억제 기능을 달성하게 하는 한 기전이다. 활성화된 T 세포에 의한 IFN-γ 생산은 조절 T 세포에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 따라서, 본 결과는 내인성 *TRAC* 유전자좌로 편집된 FOXP3 트랜스진으로부터의 FOXP3 과다발현이 편집된 T 세포에 Treg-유사 표현형을 부여할 수 있다는 것을 입증한다. 편집된 세포는 내인성 TCR 뿐만 아니라, CAR (여기서, CAR은 트랜스진 구축물의 일부였다), 둘 모두 발현할 수 있다.

도면  
1면도



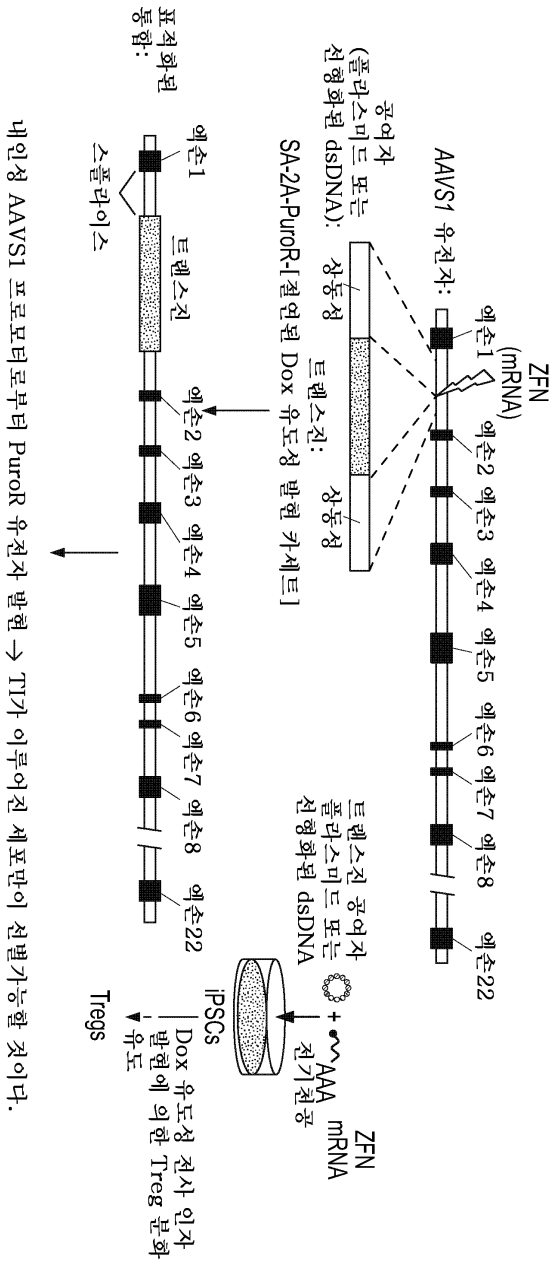
- TRAC 발현 녹아웃
- 트랜스젠 (하나 이상의 T<sub>reg</sub>-유도 인자 - “TF”) 발현은 내인성 TRAC 프로모터에 의해 조절.



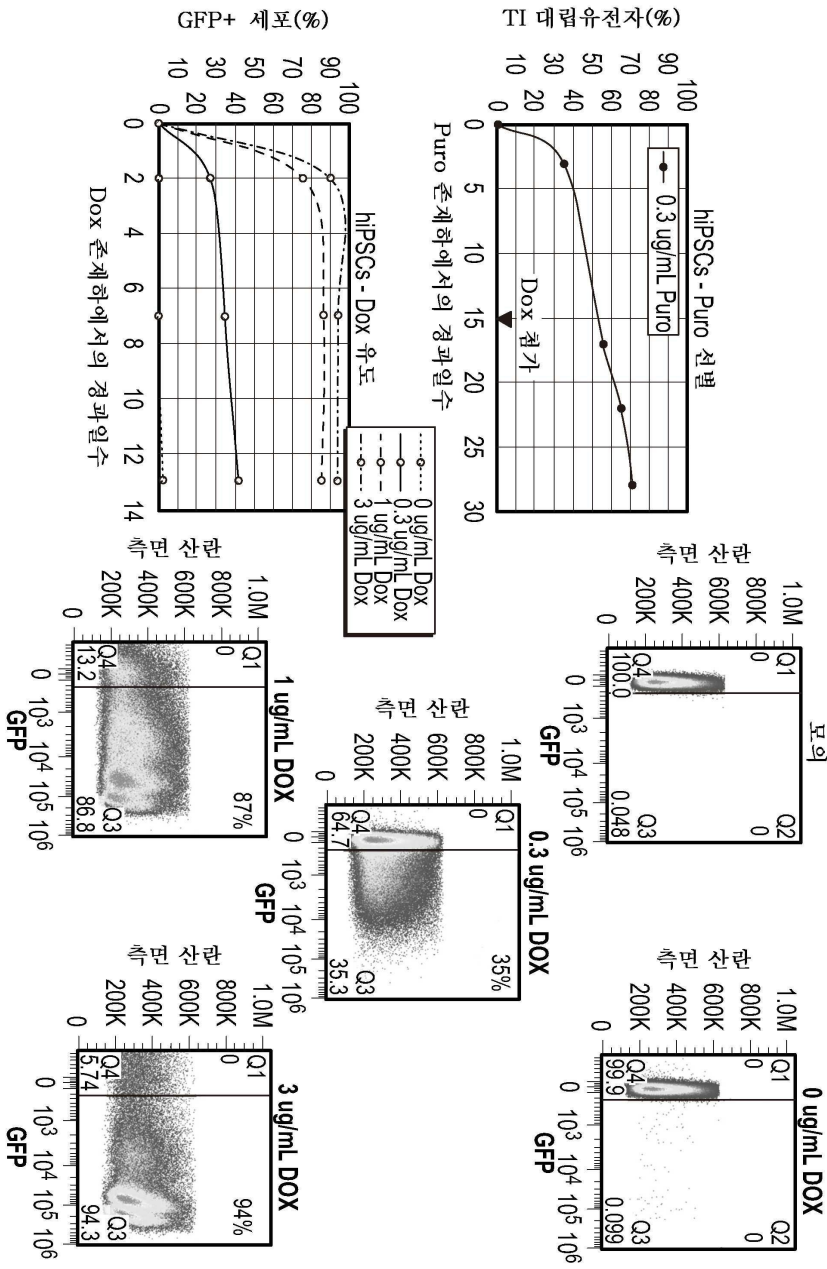
도면2

- TRAC 발현 유자
- 트랜스진 (하나 이상의 Treg-유도 인자 - “TF”) 발현은 내인성 TRAC 프로모터에 의해 조절.

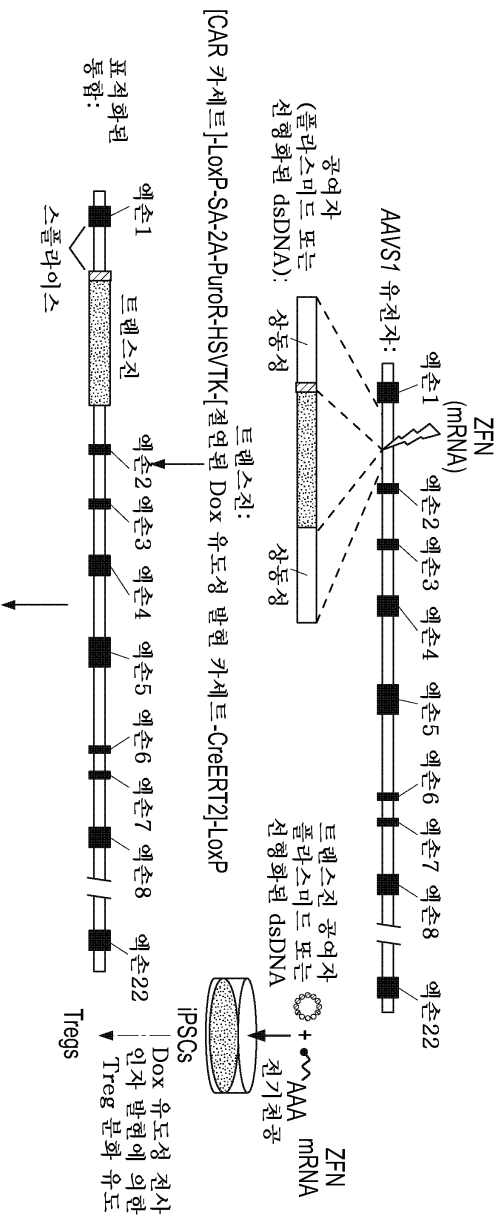
도면3



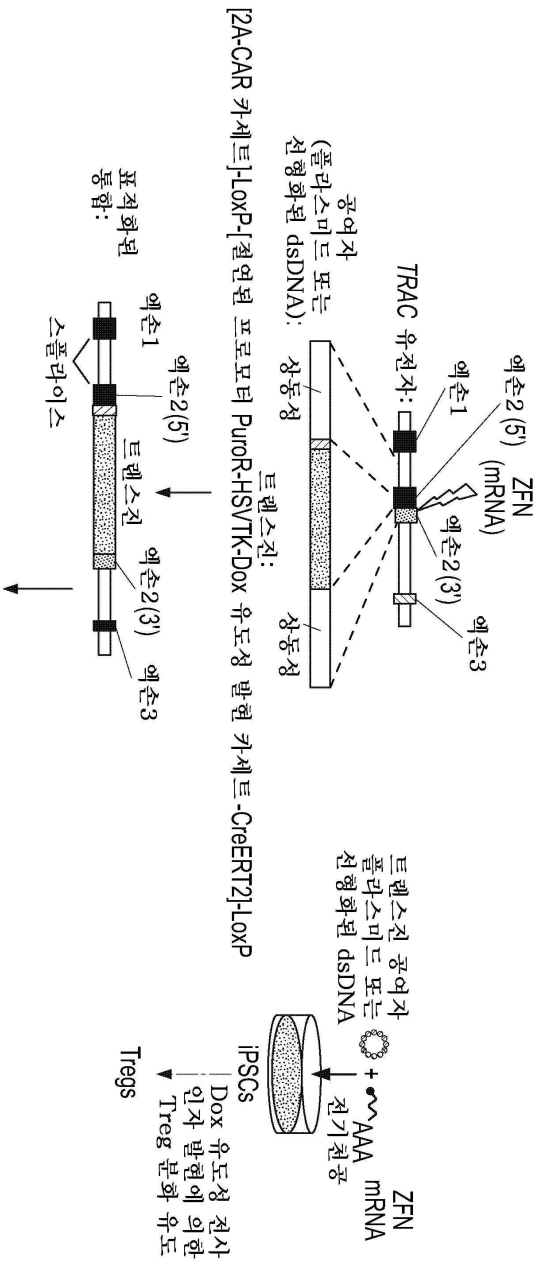
도면4



도면5



내인성 AAVS1 프로모터로부터 PuroR 유전자 발현 → T1가 이루어진 세포만이 선별가능할 것이다.  
 4-OH-타목시펜-유도성 Cre 레플리나제 → Cre 형성 후, 선별/Dox-유도 카세트를 절제할 수 있다.  
 간시클로비르 유도성 자살 유전자 (HSVTK)를 이용하는 음성적 선별을 통해 Cre 전제가 이루어지지 않은 세포를 제거할 수 있다.  
 CAR 또는 구성적 발현이 요구되는 다른 트랜스진은 그대로 유지되고, Treg 분화를 유도하는 카세트는 흔적 없이 제거된다.

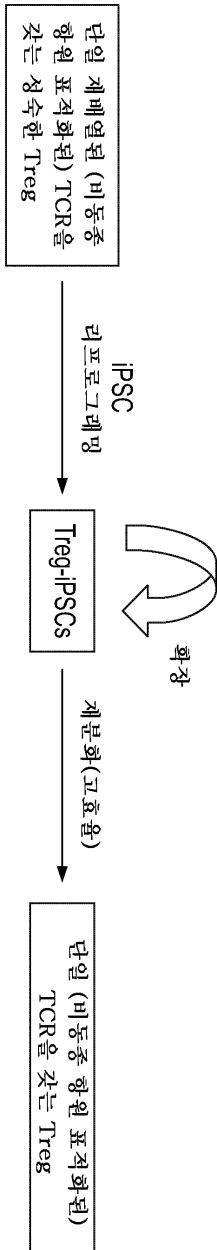


[2A-CAR 카세트]-LoxP-결연된 프로모터 PuroR-HSVTK-Dox 유도성 발현 카세트-CreERT2]-LoxP

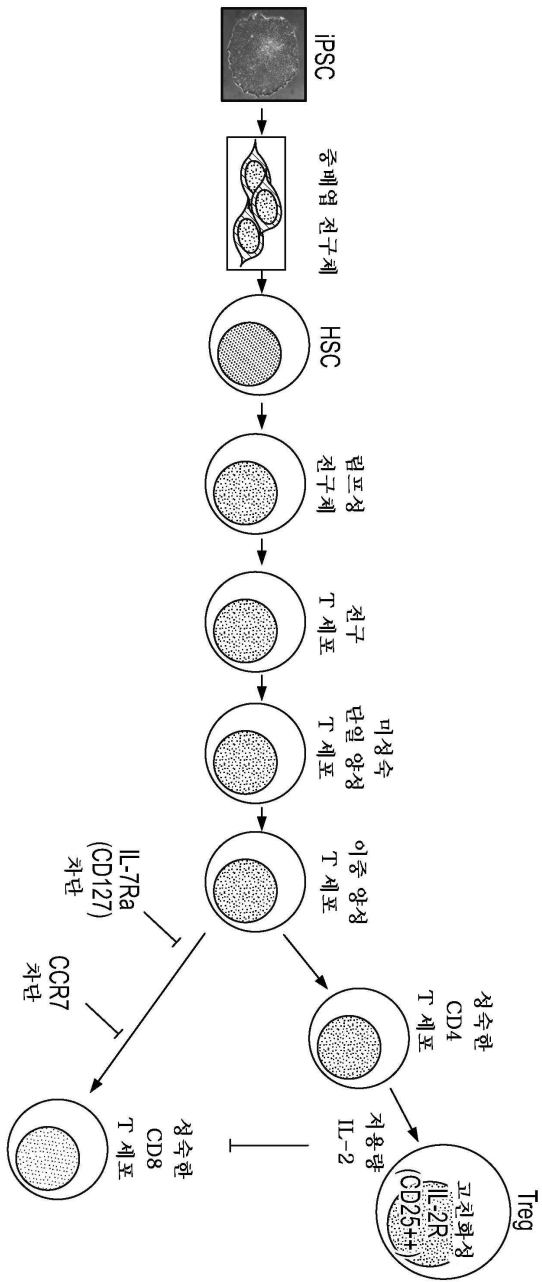
PuroR 유전자는 공여자 구축물 내에서 그 자신의 프로모터로부터 구동  
 → TT가 이루어진 세포만이 수회에 걸친 세포 분열 후 에피솜 공여자 DNA 회색 이후에 저항성이 될 것이다.

4-OH-타목시펜-유도성 Cre 레콤비나제 → Treg 형성 후, 선별/Dox-유도 카세트를 절제할 수 있다.  
 간시클로비르 유도성 자살 유전자 (HSVTK)를 이용하는 음성적 선별을 통해 Cre 절제가 이루어지지 않은 세포를 제거할 수 있다.  
 CAR 또는 내인성 TRAC 프로모터로부터 구동되는 다른 트랜스진은 그대로 유지되고,  
 Treg 분화를 유도하는 카세트는 흔적 없이 제거된다.

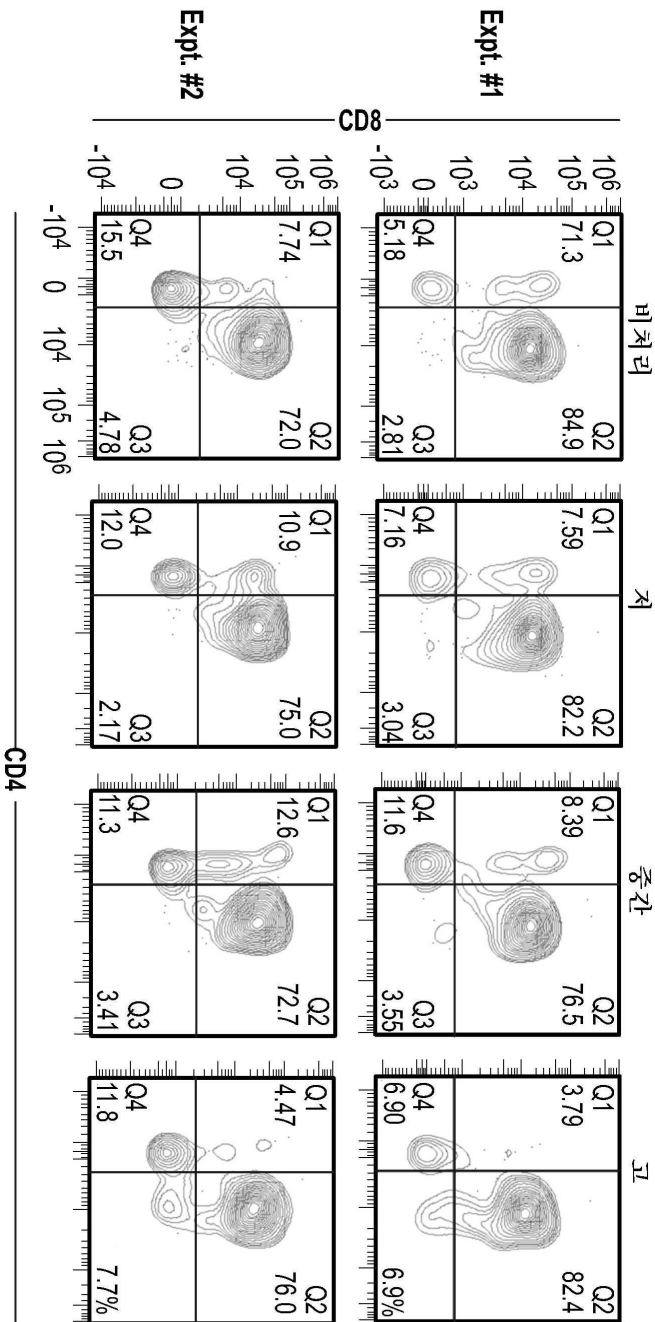
도면7



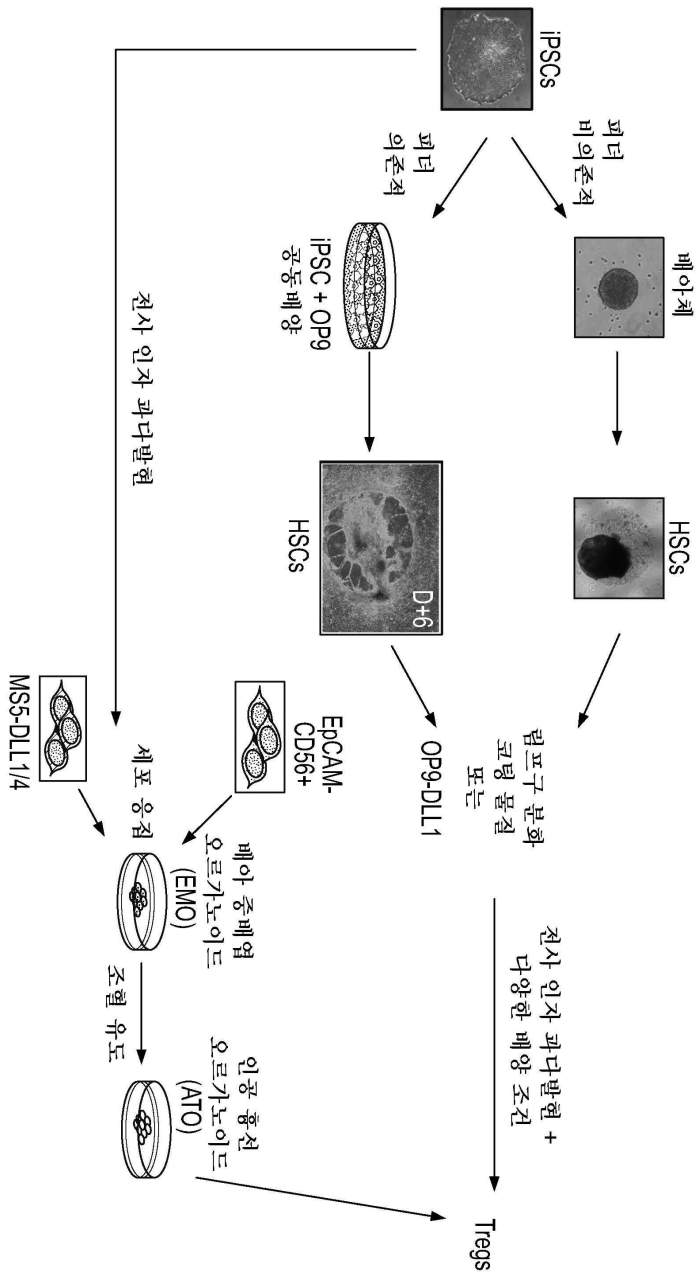
도면8



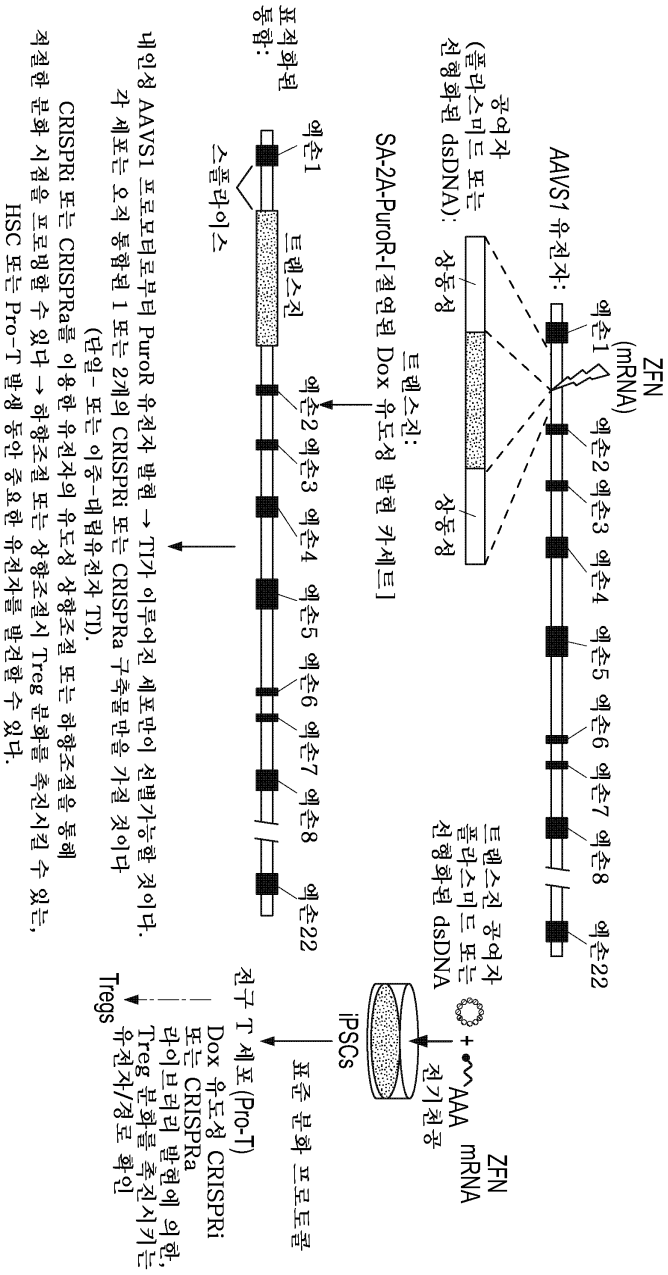
도면9



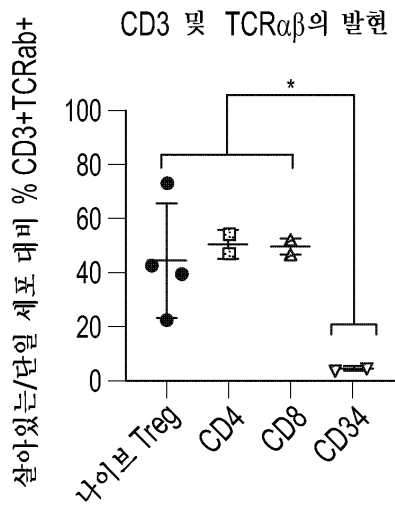
도면10



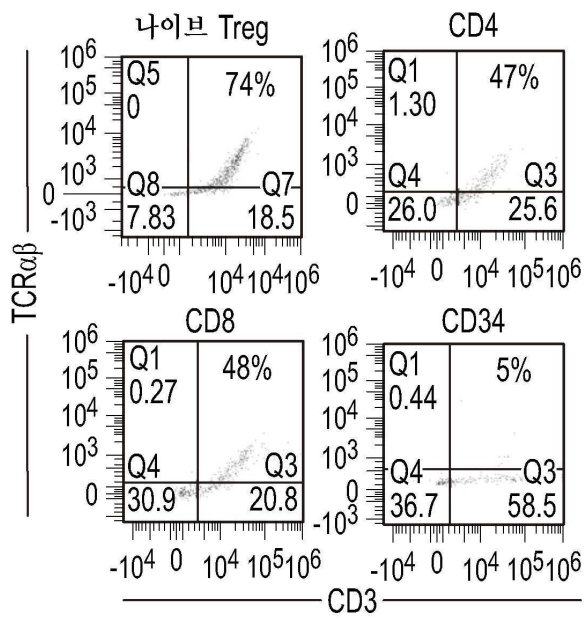
도면11



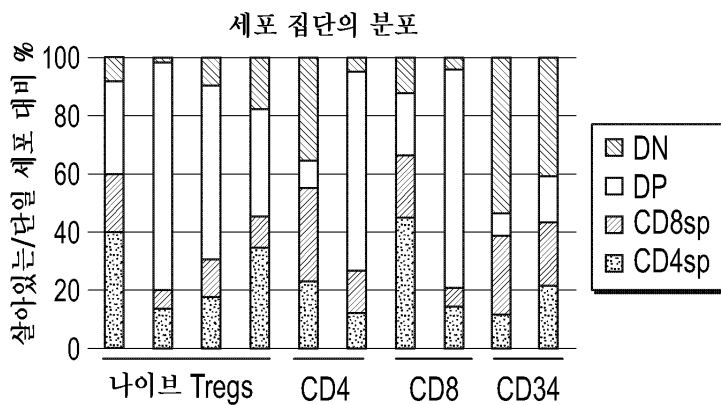
도면12a



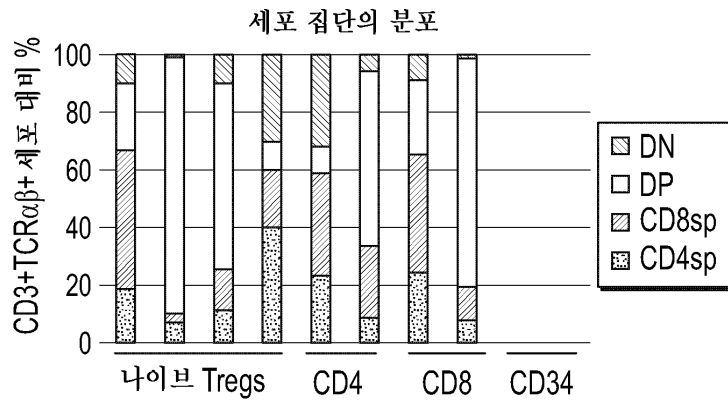
도면12b



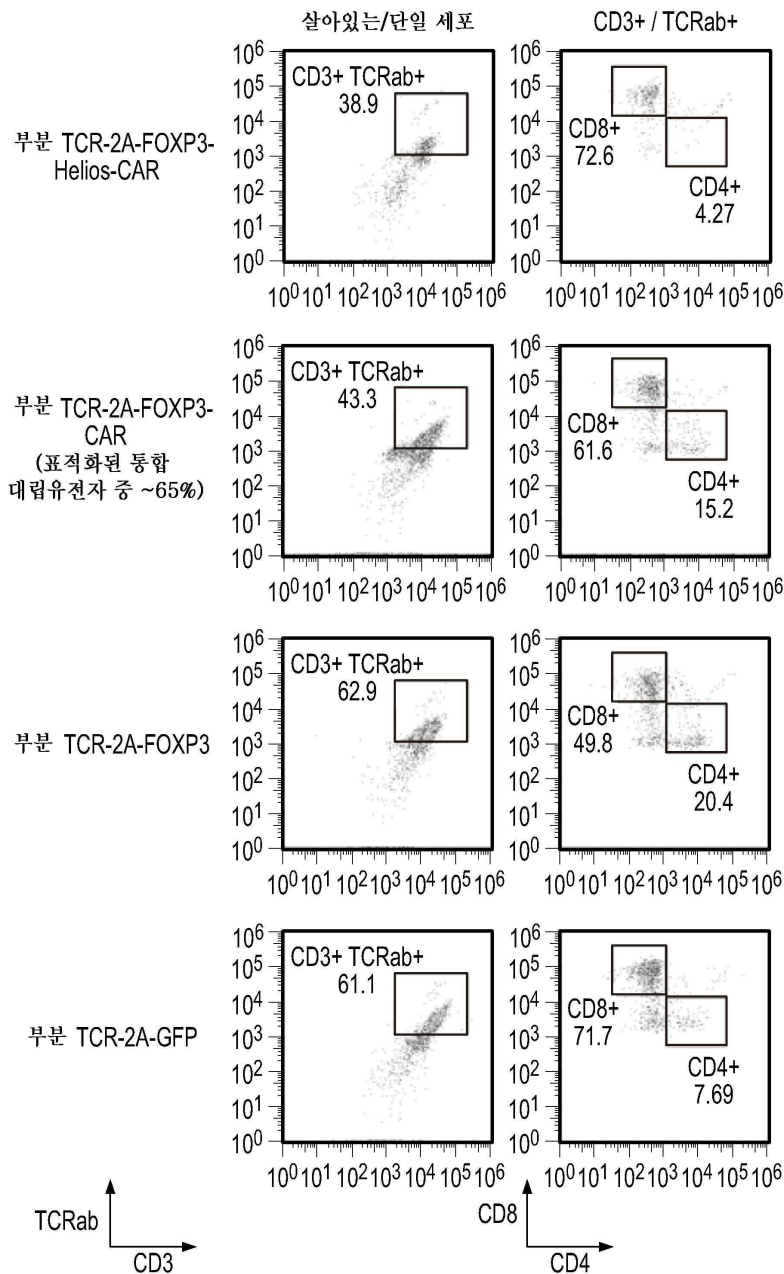
도면12c



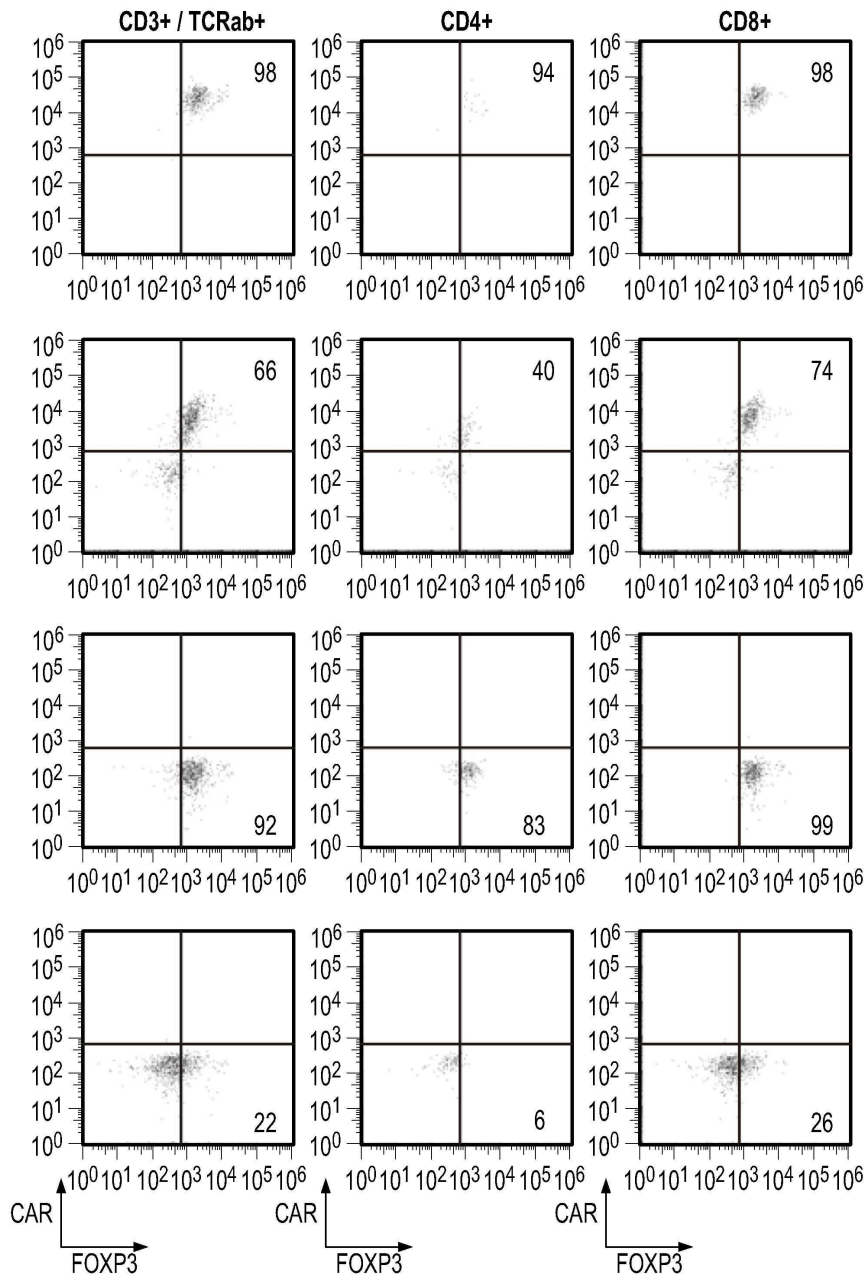
도면12d



도면13ai



도면13ai



도면13b

