



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035326
(43) 공개일자 2022년03월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 14/74 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/85 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0634 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7038248
- (22) 출원일자(국제) 2020년05월04일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년11월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2020/062346
- (87) 국제공개번호 WO 2020/221939
국제공개일자 2020년11월05일
- (30) 우선권주장
19172389.9 2019년05월02일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
셀리아드
벨기에, 비-1435 몬트-세인트-귀버트, 루 에두아르드 벨린 12, 액시스파르크 비즈니스 센터
- (72) 발명자
본세인, 사이먼
벨기에, 1435 몬트-세인트-귀버트, 루 에두아르드 벨린 2, 액시스파르크, 셀리아드 내
소티로플루, 페기
벨기에, 1435 몬트-세인트-귀버트, 루 에두아르드 벨린 2, 액시스파르크, 셀리아드 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
나승택

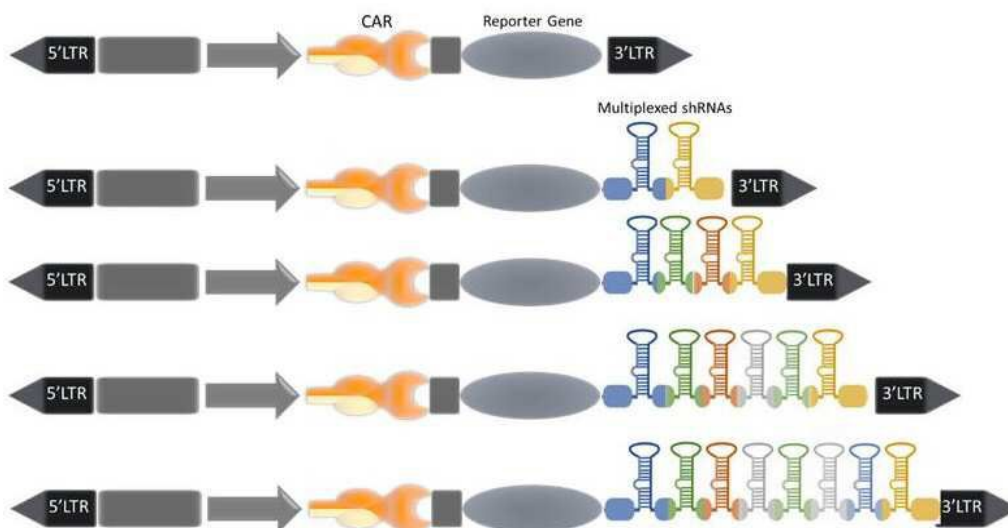
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 다중화된 억제성 RNA를 갖는 세포

(57) 요약

본 발명은 면역치료 분야에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 입양 세포 요법(ACT) 분야에 관한 것이다. 본 발명에서는 다수의 타겟들을 하향조절하도록 설계된 다중 shRNA들이 제안된다. 또한, 단독 또는 키메릭 항원 수용체(CAR)와 조합되는, 상기 shRNA들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 벡터들 및 그러한 shRNA들을 발현하는 세포들이 제안된다. 상기 세포들은 특히 면역요법에 사용되기에 적합하다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2021.08)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
C07K 14/70592 (2013.01)
C12N 15/1138 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

브레멘, 아이탄

벨기에, 1435 몬트-세인트-귀버트, 루 에두아르드
벨린 2, 엑시스파르크, 셀리아드 내

슈테클로브, 미하일

벨기에, 1435 몬트-세인트-귀버트, 루 에두아르드
벨린 2, 엑시스파르크, 셀리아드 내

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 조작된 세포:

- 목적 단백질을 인코딩하는 제1 외생 핵산 분자, 및
- 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들을 인코딩하는 제2 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조작된 세포는 조작된 면역 세포인 조작된 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 면역 세포는 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 줄기 세포, 간세포(progenitor cell), 및 iPSC 세포로부터 선택되는, 조작된 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 목적 단백질은 수용체, 특히 키메릭 항원 수용체 또는 TCR인, 조작된 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 및 제2 핵산 분자는, 진핵생물 발현 플라스미드, 미니-서클 DNA, 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티 바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 및 센다이 바이러스로부터 유래됨)와 같은 하나의 벡터 내에 존재하는, 조작된 세포.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 하나의 프로모터의 제어 하에 있는, 조작된 세포.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 프로모터는 U6 프로모터는 아닌, 조작된 세포.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 프로모터는 CMV 프로모터, EF1 α 프로모터(코어 또는 전체 길이), PGK 프로모터, CAG 프로모터, Ubc 프로모터, SFFV 프로모터, RSV 프로모터, IL-2 프로모터, MSCV LTR, SV40 프로모터, GALV LTR 및 tRNA 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 Pol II 프로모터인, 조작된 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 miRNA 분자들인, 조작된 세포.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 miRNA 분자들은 하나의 프로모터의 제어 하에 있는 하나의 miRNA 스캐폴드인, 조작된 세포.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 miRNA 분자들 중 적어도 하나는 miR-196a2 스캐폴드 서열 또는 miR-106a~363 클러스터로부터의 스캐폴드 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 적어도 두개의 RNA 간섭 분자들 모두는 miR-스캐폴드 서열, 바람직하게는 miR-196a2 스캐폴드 서열 또는 miR-106a~363 클러스터로부터의 스캐폴드 서열을 포함하는, 조작된 세포.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다중화 RNA 간섭 분자들 중 적어도 두개는 동일한 타겟을 겨냥하는, 조작된 세포.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 다중화 RNA 간섭 분자들 중 적어도 두개는 동일한, 조작된 세포.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들 모두는 서로 다른, 조작된 세포.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들 모두는 서로 다른 타겟들을 겨냥하는, 조작된 세포.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들에 의해 타겟팅되는 분자는 다음으로부터 선택되는, 조작된 세포:

MHC 클래스 I 유전자, MHC 클래스 II 유전자, MHC 공수용체 유전자(예로서, HLA-F, HLA-G), TCR 체인, NKBBiL, LTA, TNF, LTB, LST1, NCR3, AIF1, LY6, 열충격 단백질(예로서, HSPA1L, HSPA1A, HSPA1B), 보체연쇄반응 조절 수용체들(예로서, NOTCH4), TAP, HLA-DM, HLA-DO, RING1, CD52, CD247, HCP5, DGKA, DGKZ, B2M, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6, 2B4, A2AR, BAX, BLIMP1, C160(POLR3A), CBL-B, CCR6, CD7, CD95, CD123, DGK [DGKA, DGKB, DGKD, DGKE, DKGK, DGKH, DGKI, DGKK, DGKQ, DGKZ], DNMT3A, DR4, DR5, EGR2, FABP4, FABP5, FASN, GMCSF, HPK1, IL-10R [IL10RA, IL10RB], IL2, LFA1, NEAT 1, NFkB(RELA, RELB, NFkB2, NFkB1, REL 포함), NKG2A, NR4A(NR4A1, NR4A2, NR4A3 포함), PD1, PI3KCD, PPP2RD2, SHIP1, SOAT1, SOCS1, T-BET, TET2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TIGIT, TIM3, TOX, 및 ZFP36L2.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조작된 세포는 의약으로서 사용되기 위한 것인, 조작된 세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 조작된 세포는 암의 치료에 사용되기 위한 것인, 조작된 세포.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포의 적정량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 이로써 적어도 하나의 증상을 개선하는, 암 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역치료 분야에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 입양 세포 요법(adoptive cell therapy; ACT) 분야에 관한 것이다. 본 발명에서, 다중 타겟을 하향조절하도록 조작된 다중 shRNA들이 제안된다. 또한, 단독으로 또는 키메라 항원 수용체(CAR)와 조합된, shRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 벡터 및 그러한 shRNA를 발현하는 세포들이 제안된다. 상기 세포들은 특히 면역치료를 사용되기에 적합하다. 본 발명은 T 세포 치료가 필요한 환자에게서 T 세포 치료의 효율을 증가시키는 방법을 제공한다. 또한, 상기한 세포들을 이용하여 암과 같은 질병들을 치료하기 위한 전략들도 제공된다. 상기한 CAR들을 발현하는 T-세포들 또는 자연살해(NK) 세포들과 같은 조작된 면역 세포들은 림프종, 다발성 골수종 및 백혈병을 치료하기에 적합한데, CAR의 특이성에 따라 다른 종양들 또한 치료될 수 있다.

배경 기술

[0002] 세포 치료에 있어서, 상기 치료의 이로운 효과들을 저해할 수 있는 타겟들: 예를 들어, 이식편대 숙주 질환을 유도할 수 있는 TCR 성분들, 숙주편대 이식 질환을 유도할 수 있는 HLA 성분들, 스트레스 리간드들, 면역 관문들 등을 하향조절하는 것이 종종 유리하다. 그러나, 실제적인 제약(예로서, 벡터 크기 및 동시에 투여될 수 있는 분자들의 수) 및 독성때문에, 이들 타겟들 중 몇몇을 동시에 하향조절하는데 종종 문제가 있다.

[0003] 전형적으로, 예를 들어 CRISPR/Cas들, TALEN들, 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease; ZFN)들 등과 같은 유전공학적 접근들이 제안되어 왔다. 그러나, 이러한 접근법들은 전형적으로 영구적이고 비가역적 변화들 및/또는 유전자들의 완전한 녹아웃을 초래하고, 이는 만약 타겟의 부재가 생존능 또는 독성에 관한 문제를 유발할 경우 문제가 될 수 있다. 더구나, 만약 단지 타겟의 일시적 하향조절만이 요구되는 경우, 영구적 성질은 유연성을 감소시키게 된다. 또한, 유전공학 기술들은 전형적으로 매우 복잡하고, 여러 타겟들의 동시 녹다운에 이상적으로 적합하지는 않다. 예를 들어, TALEN들의 경우, 녹다운이 실현가능하도록 하기 위해 각각의 타겟에 대해 별개의 뉴클레아제 단백질이 설계될 필요가 있다. 둘 이상의 다른 TALEN들의 조합은, 이론적으로는 실현가능하지만, 실제로는 명백히 불리한 점들을 수반한다: 두개의 TALEN의 조합은 효능에 대한 효과를 가지는지를 확인하기 위해 여전히 테스트될 필요가 있다. 이들은 큰 단백질들이므로, 일반적으로 벡터 크기가 제한되기 때문에, 예로서 ACT의 관점에서 둘 모두를 발현하는 것은 비현실적이다. Crispr/Cas는 일반적으로 더욱 다목적성의 해결수단이지만, 다중화(multiplexing)(즉, 하나 이상의 타겟 부위를 동시에 조작하는 것)는, 특히 진핵생물에서, 여전히 도전적인 작업임이 판명되었다. 이는, 특히, DNA 회복의 낮은 효율성(진핵생물에서의 이중 가닥 손상의 NHEJ 회복 메카니즘은 오류가 발생하기 쉬움), 부정확성(off-target) 효과 및 CRISPR에서 가끔 나타나는 염색체 재배열, 및 CRISPR의 다중화의 일반적으로 낮은 효율(형질감염 효율은 하나 이상의 유전자가 타겟일 때 현저히 낮아짐)에 기인한다 - 즉, 효율성 및 특이성 모두에서 문제가 있다. 또한, DNA에 직접 작용함으로써 타겟 유전자의 영구적 침묵을 가져오는 유전자 편집 기술들은 게놈 완전성을 보장하기 위해 견고성 테스트의 필요성이 요구되고, 또한 그들은 정교한 다단계 생산 방법들을 요구하며, 이로써 제한된 지속성 및/또는 제한된 기능성을 가져서, 늦게 분화된 또는 탈진된 세포들을 유도할 수 있다(Gattinoni et al., 2011). 이는, 특히 ACT의 관점에서 관련성이 있다: 치료 효능을 위해, 조기 분화되고 탈진되지 않은 세포들이 확실히 더 우수하다.

[0004] 따라서, 당분야에서는, 다단계 생산 방법들을 요구하지 않고(따라서, 상대적으로 제조 용이성 및 비용 절감을 제공하고), (예를 들어, (예로서, 독성을 회피하기 위해) 녹다운의 감소를 가능케 하는 가역적 변화를 일으키거나, 하나의 타겟을 다른 것으로 교체함으로써) 유연성을 제공하는, 타겟의 다중화된 녹다운으로 세포 치료를 가능하게 하는 시스템들이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 다중 계층 엔지니어링이 직면한 문제들의 해결을 고려할 때, 시스템들은 유전자 녹아웃(knockout) 대신에 녹다운(knockdown)의 가능성을 제공하여 더 높은 유연성(예를 들어, 일시적 조절이 가능하게 될 것임)을 유도할 것을 고려할 수 있다. 이상적으로는, 이들 시스템은 또한 (각 타겟에 대해 별개의 단백질들이 설계될 필요가 없도록) 덜 번거로워야 하며, 충분히 효율적이고 특이적이어야 한다.

[0006] 고려될 수 있는 하나의 해결책은 RNA 간섭(RNAi)이다. RNAi 유전자 조절을 위한 여러 시스템들이 식물 및 동물에 존재한다. 첫번째는 마이크로RNA들("miRNAs")이라고 불리는 작은 비코딩(non-coding) RNA들의 발현을 통해서이다. miRNA들은 분해를 위해 특정의 메신저 RNA("mRNA")들을 타겟팅할 수 있고, 그로써 유전자 침묵을 촉진할 수 있다.

[0007] 유전자 활성의 조절에 있어서의 microRNA 경로의 중요성으로 인해, 현재 연구자들은 인공적으로 설계된 분자인 작은 간섭 RNA들("siRNAs")이 RNAi를 매개할 수 있는 정도에 대해 탐구하고 있다. siRNA들은 miRNA와 유사한 mRNA와 같은 타겟 분자의 절단을 야기할 수 있고, 상기 타겟 분자를 인식하기 위하여, siRNA들은 염기들의 상보성에 의존한다.

[0008] siRNA로서 알려진 부류의 분자들 중에는 짧은 헤어핀 RNA들("shRNAs")이 있다. shRNA는 센스 영역 및 상기 센스 영역과 하이브리드화할 수 있는 안티센스 영역을 포함하는 단일 가닥 분자이다. shRNA는 줄기와 루프 구조를 형성할 수 있고, 상기 센스 영역과 안티센스 영역이 상기 줄기의 일부 또는 전부를 형성한다. siRNA들을 사용하는 것의 하나의 이점은 그들이 단일 가닥으로서 전달 또는 전사될 수 있다는 점이고, 이는 siRNA가 두개의 별개의 가닥들을 갖는 경우에는 가능하지 않다. 그러나, 다른 siRNA와 마찬가지로, shRNA들은 여전히 염기들의 상보성에 기초하여 mRNA를 타겟팅한다.

[0009] 많은 상태들, 질병, 및 장애들은 복수의 단백질들 사이의 상호작용 또는 그들 중에서의 상호작용에 의해 야기된다. 따라서, 연구자들은 다중 siRNA들을 세포 또는 기관으로 동시에 전달하기 위한 효과적인 방법들을 찾고 있다.

[0010] 하나의 전달 옵션은, shRNA들이 내생의 miRNA 경로를 통해 처리되어질 세포들 내에서 shRNA들을 발현하기 위한 벡터 기술들의 사용이다. 각각의 shRNA에 대한 개별 벡터의 사용은 복잡할 수 있다. 따라서, 연구자들은 복수의 shRNA들을 발현할 수 있는 벡터들의 사용을 탐구하기 시작하였다. 유감스럽게도, 보고된 문헌들에는, 단일 벡터로부터 다중 shRNA들을 발현할 경우, 여러 과제들이 있음을 기술하고 있다. 연구자들이 직면한 문제들 중에는 다음의 문제들이 있다: (a) 벡터 재조합의 위험 및 shRNA 발현의 손실; (b) 다중 카세트에서의 위치 효과들에 의한 shRNA 기능성의 감소; (c) shRNA 클로닝의 복잡성; (d) RNAi 프로세싱 포화; (e) 세포독성; 및 (f) 바람직하지 않은 비표적(off-target) 효과.

[0011] 또한, siRNA는 어떤 형질전환 포유동물 세포주에서는 단기 유전자 억제에 대해 효과적인 것으로 나타났으나, 1차 세포 배양물에서의 그것의 사용 또는 안정한 전사 녹다운을 위한 그것의 사용은 더 문제가 있는 것으로 판명되었다. 녹다운 효율은 다양한 것으로 알려져 있고, <10% 내지 >90%의 범위이고(예로서, Taxman et al., 2006), 따라서 추가적인 최적화가 필요하다. 하나보다 많은 억제유전자가 발현되는 경우 일반적으로 효능은 감소하므로, 그러한 경우의 설정에서는 상기한 최적화는 더더욱 중요하다.

[0012] 따라서, 다중 RNA 간섭 분자들의 전달을 위한 효과적인 카세트 및 벡터들을 개발할 필요성이 여전히 남아있다. 일반적으로 세포 적용을 위해서도 그렇지만, ACT 분야에서는 연구가 훨씬 덜 이루어져서, 이들 세포에서의 효과적인 시스템에 대한 높은 요구가 있다.

[0013] 놀랍게도, shRNA는 세포 내에서, 특히 조작된(engineered) 면역 세포들 내에서 성공적으로 다중화될 수 있을 뿐만 아니라, 타겟들은 매우 효과적으로 하향조절되어, 심지어 유전자 녹아웃에 비견될만 하다는 것이 본 발명에 의해 입증된다(실시예 5~8 참조 및 CRISPR과 비교).

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 적어도 두개의 다중화(multiplexed) RNA 간섭 분자들을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 조작된 세포들을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 추가의 구체예들에 따르면, 다음을 포함하는 조작된 세포들이 제공된다:

[0016] ◦ 목적 단백질(protein of interest)을 인코딩하는 제1 외생 핵산 분자

[0017] ◦ 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들(multiplexed RNA interference molecules)을 인코딩하는 제2 핵산 분자.

[0018] 상기 조작된 세포들은, 특히 진핵세포들이고, 더욱 특별히는 조작된 포유동물 세포들이며, 더더욱 특별히는 조작된 인간 세포들이다. 특정 구체예에 따르면, 상기 세포들은 조작된 면역 세포들이다. 전형적인 면역 세포들은 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 줄기 세포, 간세포(progenitor cell), 및 iPSC 세포로부터 선택된다.

[0019] 특정 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포들은 목적 단백질을 인코딩하는 핵산을 더 포함한다. 특히, 상기 목적 단백질은 수용체, 특히 키메릭 항원 수용체 또는 TCR이다. 키메릭 항원 수용체들은 임의의 타겟을 겨냥(directed against)할 수 있는 것으로, 전형적인 예로는 CD19, CD20, CD22, CD30, BCMA, B7H3, B7H6, NKG2D, HER2, HER3, GPC3을 포함하나, 적합한 더 많은 종류가 또한 존재한다.

[0020] 특정 구체예들에 따르면, 상기 제1 및 제2 핵산 분자는, 진핵생물 발현 플라스미드, 미니-서클 DNA, 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 및 센다이 바이러스로부터 유래됨)와 같은 하나의 벡터 내에 존재한다.

[0021] 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은, 하향조절될 타겟 분자들의 수 및 상기 다중화 분자들의 공동발현에 있어서의 제한들에 따라, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개 또는 그 이상의 분자들일 수 있다. "멀티플렉스"는 복수의 동종 분자들, 예로서 복수의 siRNA 또는 shRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 멀티플렉스 내에서, 분자들이 동종(예로서, 모두 shRNA들)인 경우, 그들은 동일할 수 있고, 또는 다른 서열들을 포함할 수 있다. 동종의 분자들 사이에, 본 명세서에서 기재된 링커들과 같은 개재 서열들이 존재할 수 있다. 본 발명의 멀티플렉스의 예는 복수의 탠덤(tandem) miRNA-기반 shRNAs들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 멀티플렉스는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 또는 단일 가닥인 영역들 및 이중 가닥인 영역들을 모두 가질 수 있다.

[0022] 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 하나의 프로모터의 제어 하에 있다. 전형적으로, 상기 프로모터는 U6 프로모터는 아니다. 왜냐하면, 이 프로모터는 특히 고수준의 발현 상태에서 독성과 관련되기 때문이다. 동일한 이유로, (U6 보다 약한 프로모터인) H1 프로모터를 또는 일반적으로 Pol III 프로모터들도 (이들이 어떤 조건에서는 적합할 수 있다 하더라도) 배제하는 것을 고려할 수 있다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 프로모터는 Pol II 프로모터 및 Pol III 프로모터로부터 선택된다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 프로모터는 천연의 또는 합성의 Pol II 프로모터이다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 프로모터는 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, 연장인자 1 알파(EF1α) 프로모터 (코어 또는 전체 길이), 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 엽스트림 CMV IV 인핸서를 갖는 복합 베타-액틴 프로모터(CAG 프로모터), 유비퀴틴 C(Ubc) 프로모터, 비장 병소형성 바이러스(SFFV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 인터루킨-2 프로모터, 쥐 줄기세포 바이러스(MSCV) 긴 말단 반복(LTR), 긴팔원숭이(Gibbon ape) 백혈병 바이러스(GALV) LTR, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터, 및 tRNA 프로모터로부터 선택되는 Pol II 프로모터이다. 이들 프로모터들은 mRNA 발현을 진행하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 폴리머라제 II 프로모터들이다.

[0023] 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 shRNA 분자들 또는 miRNA 분자들일 수 있다. 특히, 이들은 miRNA 분자들이다. shRNA 분자와 miRNA 분자 간의 차이는, miRNA 분자는 드로샤(Drosha)에 의해 처리되는 반면, 통상의 shRNA는 그렇지 않다는 것이다(이는 독성과 연관되어 있음, Grimm et al., Nature 441:537-541 (2006)).

[0024] 특정 구체예들에 따르면, miRNA 분자들은 하나의 프로모터의 제어 하에 있는 하나의 miRNA 스캐폴드로서 제공될 수 있다.

[0025] miRNA 다중화를 위해 특히 적합한 스캐폴드 서열들은 miR-30 스캐폴드 서열, miR-155 스캐폴드 서열, 및 miR-196a2 스캐폴드 서열이다.

- [0026] 전형적으로, miRNA 분자들 중 적어도 하나는 miR-196 스캐폴드 서열, 바람직하게는 miR-196a2 스캐폴드 서열을 포함한다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 miRNA 분자들 모두는 miR-196 스캐폴드 서열, 바람직하게는 miR-196a2 스캐폴드 서열을 포함한다. 이러한 사항은 miR-30 스캐폴드 서열 및 miR-155 스캐폴드 서열에 대해서도 동일하게 적용될 수 있다. 그러한 적합한 스캐폴드들의 예들은 본 명세서에 참고문헌으로 통합된 미국 특허 US 8841267호(특히, 그의 청구항 1)에 열거되어 있다. 단일 스캐폴드는 SMARTvector™ micro-RNA 개조된 스캐폴드(Horizon Discovery, Lafayette, CO, USA)로서 상업적으로 입수가 가능하다. 이 스캐폴드의 복수의 사본들은 탠덤 반복(tandem repeats) 영역 내에 배열될 수 있다(도 5 참조).
- [0027] 추가의 적합한 스캐폴드 서열들은 miR-26b (hsa-mir-26b), miR-204(hsa-mir-204), and miR-126(hsa-mir-126), hsa-let-7f, hsa-let-7g, hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-mir-29a, hsa-mir-140-3p, hsa-let-7i, hsa-let-7e, hsa-mir-7-1, hsa-mir-7-2, hsa-mir-7-3, hsa-mir-26a, hsa-mir-26a, hsa-mir-340, hsa-mir-101, hsa-mir-29c, hsa-mir-191, hsa-mir-222, hsa-mir-34c-5p, hsa-mir-21, hsa-mir-378, hsa-mir-100, hsa-mir-192, hsa-mir-30d, hsa-mir-16, hsa-mir-432, hsa-mir-744, hsa-mir-29b, hsa-mir-130a, 또는 hsa-mir-15a를 포함한다.
- [0028] 배타적이지 않은 대안적 구체예들에 따르면, 인공적으로 반복된 스캐폴드를 초래하는 반복되는 특정 miR 스캐폴드를 사용하는 것 보다는, 진짜의 폴리시스트론 miRNA 클러스터 또는 그의 일부를 사용할 수 있고, 이 경우 miRNA는 목적 shRNA로 대체된다. 이러한 목적을 위해 특히 적합한 miR 스캐폴드 클러스터는 miR-106a~363, miR-17~92, miR-106b~25, 및 miR-23a~27a~24-2 클러스터이고; 가장 특별히 고려되는 것은 miR-106a~363 클러스터이다. 중요하게는, 벡터 페이로드(payload)를 절감하기 위하여, 특히 서열들의 전부가 아닌, 그러한 천연 클러스터들의 일부를 사용하는 것도 고려된다(이는, 모든 miRNA들이 동일한 간격으로 배열되지 않고, 모든 링커 서열들이 필요하지 않을 수 있기 때문에 특히 유용하다). 예를 들어, 세포 내에서 가장 효과적으로 처리되는 miRNA들을 취하는 것과 같은, 다른 고려사항들도 고려될 수 있다. 예로서, 상기 miR-17~92 클러스터는 (순서대로) miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 및 miR-92-1(또한 miR-92a1)로 구성되고, 이들의 특히 유용한 단편들은 miR-19a 내지 miR-92-1(즉, 6개 miRNA 중 4개) 또는 miR-19a 내지 miR-19b-1(즉, 6개 miRNA 중 3개)의 스캐폴드 서열이다. 마찬가지로, 106a~363 클러스터는 (순서대로) miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92-2(또한 miR-92a2) 및 miR-363으로 구성된다. 이들의 특히 유용한 단편들은 miR-20b 내지 miR-363(즉, 6개 miRNA 중 4개) 또는 miR-19b-2 내지 miR-363 (즉, 6개 miRNA 중 3개)의 스캐폴드 서열이다. (벡터들의 페이로드를 다시 감소시키기 위하여) 천연 링커 서열들 및 그들의 단편들 또는 합성 링커들도 사용될 수 있다.
- [0029] 상기 전략들의 조합이 사용될 수 있고, 예를 들어, miR-106a~363 클러스터 및 miR-196a2 서열이 신규의 스캐폴드 내에 조합될 수 있음도 고려된다.
- [0030] 특정 구체예들에 따르면, 상기 다중화 RNA 간섭 분자들 중 적어도 두개는 동일한 타겟을 겨냥한다. 추가의 특정 구체예들에 따르면, 상기 다중화 RNA 간섭 분자들 중 적어도 두개는 동일하다.
- [0031] 대안적 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 모두 서로 다르다. 추가의 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들 모두는 서로 다른 타겟들을 겨냥한다.
- [0032] 상기 조작된 세포 내에 존재하는 임의의 적합한 분자는 인스턴트 RNA 간섭 분자들에 의해 타겟팅될 수 있다. 고려되는 타겟들의 전형적 예들은 다음과 같다: MHC 클래스 I 유전자, MHC 클래스 II 유전자, MHC 공수용체(coreceptor) 유전자(예로서, HLA-F, HLA-G), TCR 체인, CD3 체인, NKBBiL, LTA, TNF, LTB, LST1, NCR3, AIF1, LY6, 열충격 단백질(예로서, HSPA1L, HSPA1A, HSPA1B), 보체연쇄반응(complement cascade) 조절 수용체들(예로서, NOTCH4), TAP, HLA-DM, HLA-DO, RING1, CD52, CD247, HCP5, DGKA, DGKZ, B2M, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6, 2B4, A2AR, BAX, BLIMP1, C160(POLR3A), CBL-B, CCR6, CD7, CD95, CD123, DGK [DGKA, DGKB, DGKD, DGKE, DKGK, DGKH, DGKI, DGKK, DGKQ, DGKZ], DNMT3A, DR4, DR5, EGR2, FABP4, FABP5, FASN, GMCSF, HPK1, IL-10R [IL10RA, IL10RB], IL2, LFA1, NEAT 1, NFkB(RELA, RELB, NFkB2, NFkB1, REL 포함), NKG2A, NR4A(NR4A1, NR4A2, NR4A3 포함), PD1, PI3KCD, PPP2RD2, SHIP1, SOAT1, SOCS1, T-BET, TET2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TIGIT, TIM3, TOX, 및 ZFP36L2.
- [0033] 특히 적합한 구축물(construct)들은 miRNA-기반인 것으로 확인되었다. 따라서, 다중화 microRNA-기반 shRNA 인코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조작된 세포들이 제공되고, 상기 다중화 microRNA-기반 shRNA 인코딩 영역은:
- [0034] 둘 이상의 합성 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열들을 인코딩하는 서열들을 포함하고, 각각의 합성 miRNA-기

반 shRNA 뉴클레오티드 서열은

- [0035] ◦ miRNA 스캐폴드 서열,
 - [0036] ◦ 활성(active) 서열 또는 성숙 서열, 및
 - [0037] ◦ 패신저(passenger) 서열 또는 스타(star) 서열
- [0038] 을 포함하며, 각각의 합성 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열 내에서, 상기 활성 서열은 상기 패신저 서열에 대해 적어도 80% 상보성이다.
- [0039] 상기 합성 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열들의 각각의 활성 서열 및 패신저 서열 모두는 전형적으로 18개 내지 40개 뉴클레오티드, 특히 18개 내지 30개 뉴클레오티드, 더욱 특히 19개 내지 25개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0040] 전형적으로, 이들 마이크로RNA 스캐폴드 서열들은 링커들에 의해 분리되어 있고, 링커 서열들은, 더 짧은 길이도 적용되지만, 예를 들어 30개 내지 60개 뉴클레오티드 길이이다. 실제로, 놀랍게도, 링커의 길이는 필수적인 역할을 하지 않으며, 매우 짧을 수 있고(10개 뉴클레오티드 미만), 또는 심지어 shRNA 기능을 간섭함이 없이 부재할 수 있다는 것이 밝혀졌다.
- [0041] 합성 서열들은, 예를 들어, 특정 타겟에 대해 조작된 shRNA 서열들에 의해 내생의 miR 서열들이 대체된 천연 발생 스캐폴드(예로서, miR-106a~363 클러스터와 같은 miR 클러스터 또는 그의 단편)일 수 있거나, 특정 타겟에 대해 조작된 shRNA 서열들에 의해 내생의 miR 서열들이 대체된 단일 miR 스캐폴드(예로서, miR-196a2 스캐폴드)의 반복체일 수 있거나, 합성 miR-유사 서열들일 수 있거나, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조작된 세포는 전형적으로 키메라 항원 수용체 또는 TCR과 같은, 목적 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 더 포함하고, 상기한 바와 같이, 조작된 면역 세포일 수 있다.
- [0043] 다중화 RNA 간섭 분자들의 공동발현은 적어도 하나의 유전자의 억제를 초래하지만, 전형적으로 상기 조작된 세포 내에서는 복수의 유전자들의 억제가 일어난다. 이는 더 우수한 치료 효능에 기여할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 명세서에 기재된 조작된 세포들은 의약으로서의 용도를 위해 제공된다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포들은 암의 치료에서의 사용을 위해 제공된다.
- [0045] 따라서, 본 명세서에 기재된 조작된 세포들의 적정량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하고, 이로써 적어도 하나의 증상을 개선하는 암 치료 방법이 제공된다.
- [0046] 상기 조작된 세포들은 자가 유래의 면역 세포들(환자로부터 획득된 세포들) 또는 동종이계의 면역 세포들(다른 대상으로 부터 획득된 세포들)일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1: miRNA 스캐폴드 길이의 최적화. A) CD19 발현에 의해 측정된, 형질도입된 T 세포들의 백분율. B) TCR 및 C) 다양한 길이의 miRNA 스캐폴드들 내에 매립된, CD247 타겟팅 shRNA로 형질도입된 세포들의 CD3E MFI.
- 도 2: 다양한 CD52 타겟팅 shRNA들의 스크리닝. A) FSC/SSC로 살아있는 세포들을 게이팅하고, CD3+ 세포들 중 형질도입된 (CD19+)CD4+ 또는 CD8+ T 세포들의 백분율이 나타나 있다. B) 형질도입된 (CD19+에 게이팅된) CD4+ 또는 CD8+ T 세포들에 대해 CD52 MFI가 나타나 있다. C) 형질도입된 T (CD19+ CD3+) 세포들의 CD52 발현을 나타내는 대표적 히스토그램.
- 도 3: 다양한 공여자들에서의 CD52 녹다운. 세계의 서로 다른 공여자들로부터 파생된 T 세포들에 대해 CD52 MFI가 나타나 있다. 세포들은 Mock 또는 CD52 shRNA-3 발현벡터로 형질도입된다.
- 도 4: CRISPR/Cas9 기반 CD52 녹다운 T 세포들의 생성을 위한 gRNA들의 스크리닝. 왼쪽 패널에, 수확 시(8일째)의 CD4+ 및 CD8+ T 세포들에 대해 CD52 MFI가 나타나 있다. Mock (tCD19) 및 shRNA 조건에 대해, 상기 게이팅은 CD19+ 세포들에서 수행되었고, 다른 조건 게이팅에 대해서는 CD3+ T 세포들에서 수행되었다. 오른쪽 패널에서, 대표적인 히스토그램은, 단지 대조군으로서의 Cas9와 비교되는 세계의 다른 gRNA들에 대한 CD52 발현을 나타낸다.
- 도 5: 통합된 miRNA 스캐폴드의 부존재(상단) 또는 존재(하단) 하의 CAR 발현 벡터(예로서, CD19, BCMA, B7H3, B7H6, NKG2D, HER2, HER3, GPC3)의 설계를 나타내며, 이는 동일 벡터로부터 CAR과 다중 shRNA들(예로서, 2개,

4개, 6개, 8개, ...)의 공동발현을 가능하게 한다. LTR: 긴 말단 반복; 프로모터(예로서, EF1a, PGK, SFFV, CAG, ...); 마커 단백질(예로서, 절단형 CD34, CD19); 다중화 shRNA들.

도 6: 일차 T 세포들 내의 BCMA-CAR 벡터의 맥락에서, 두개의 miRNA shRNA가 동일 발현 구축물로부터 발현되었다. 두개의 shRNA(다중화 1-5) 사이의 서로 다른 스페이서들이 CD247 및 CD52 단백질의 녹다운에 대한 그들의 효과에 대해 분석되었다. A) 리포터 단백질 tCD34의 발현에 의해 측정된 형질도입 효율, B) BCMA-Fc 융합단백질로 염색됨에 따른 세포 표면 상에서의 BCMA CAR 발현 후에, 항-Fc PE 결합 항체로 염색된다. C) CD247를 타겟팅하는 shRNA에 의해 매개된 TCR의 CD3 ζ 서브유닛의 녹다운에 따른 TCR 발현의 하향조절의 효율에 대한 관독정보로서의 TCR의 평균 형광강도(MFI), 및 D) 관독정보로서 CD52 MFI를 사용하여 CD52를 하향조절하기 위한 별개의 구축물들의 효능.

도 7: A) CD247 (CD3z) 및 B) CD52 RNA 수준들은, 표시된 단일- 또는 다중화 shRNA 구축물들 및 대응되는 대조군들로 형질도입된 T 세포들 내에서, 하우스키핑 유전자로서 사용된 CYPB RNA에 대한 실시간 PCR 분석에 의해 분석되었다.

도 8: 스페이서-2 또는 스페이서-5로 다중화된 CD247 shRNA, CD52 shRNA 또는 CD52 shRNA와 CD247 shRNA 둘 모두를 공동발현하는, BCMA CAR로 형질도입된 TCR 및 CD52 염색된 T 세포들의 대표적인 유세포분석 데이터. 대조군으로서, 세포들은 그들의 핵 내에 RNP Cas9 gRNA CD52 및 gRNA CD247 복합체가 도입되었다.

도 9: A) TCR 세포 표면 발현 및 B) 표시된 단일- 또는 다중화 shRNA 구축물들 및 대응되는 대조군들로 형질도입된 T 세포들의 CD52 세포 표면 발현에 대한 유세포분석.

도 10: A) 서로 다른 발현 구축물들로 형질도입된 세포들의 BCMA CAR 발현은 BCMA-Fc 융합단백질로 염색한 후, PE-결합 항-Fc 및 APC-결합 항-CD34 항체들로 염색하여 분석되었다. 형질도입된 (CD34+) T 세포들에 대해 BCMA-Fc 염색의 평균 형광강도가 나타나 있다. B) 다양한 BCMA 발현 암 세포주들(RPMI-8226, U266, OPM-2)은 24시간 동안 Mock(tCD34), CD247 shRNA, CD52 shRNA 또는 CD247 CD52 다중화 shRNA가 존재 또는 부존재하는 T 세포들을 발현하는 BCMA-CAR과 함께 공동배양되었다. 상청액 내의 IFN- γ 수준은 ELISA로 측정되었다.

도 11: 유사분열 촉진 자극에 대한 반응에 따른 T 세포 수용체의 시험관내 기능 분석을 나타낸다. T 세포들은 항-CD3E 항체(클론 OKT3)의 존재 하에, 항-CD3E 항체의 농도를 증가시키면서 배양되었다. 24시간 후에, 상청액 내의 IFN- γ 수준은 ELISA로 측정되었다. 두개의 다른 공여자들(CC19-174 및 CC19-184)로부터의 결과들이 제공된다.

도 12: 항-CD52 매개 세포 사멸에 대한 T 세포들의 민감도를 분석하기 위한 시험관내 기능 분석을 나타낸다. 항-CD52 항체로서 알렘투주맙(alemtuzumab)이 사용되었다. T 세포들은 50 μ g/mL의 알렘투주맙 또는 IgG 대조군 항체들의 존재 하에 30% 보체(complement)로 처리되었다. 4시간 후에 생존가능한 세포들이 분석되었다.

도 13: 제2 세대 CD19 CAR 및 렌티바이러스 백본(backbone)을 사용한 선택마커와 함께, 상기 벡터 설계에서 나타낸 바와 같이, shRNA에 의해 타겟팅되는 단독 발현 또는 다중화 발현된 네개의 B2M, DGK, CD247 및 CD52로 형질도입된 Jurkat 세포들에서의 RNA 발현을 나타낸다. 형질도입 7일 후에 마커-특이적 자성 비드들을 사용하여, 단일 단계 영양강화(enrichment)가 수행되었다. 상기 네개의 타겟들의 전사 발현의 shRNA 매개된 하향조절은 qRT-PCR에 의해 분석되었다.

도 14: 106a-363miRNA 내에 도입된, 3 \times shRNAs 또는 6 \times shRNAs 타겟팅 CD247, B2M 또는 CD52와 함께 제2 세대 CD19-지향 CAR를 인코딩하는 렌티바이러스 벡터, 절단형 CD34 선택마커로 형질도입된, 건강한 공여자로부터의 일차 T 세포들에서의 RNA 발현을 나타낸다. 대조군으로서 shRNA(tCD34)는 전혀 사용되지 않았다. 형질도입 2일 후에, 세포들은 CD34-특이적 자성 비드들을 사용하여 영양강화되었고, 추가로 6일 동안 IL-2(100 IU/mL)에서 증폭되었다. CD247, B2M 및 CD52의 mRNA 발현은 하우스키핑 유전자로서 시클로필린을 사용하는 qRT-PCR에 의해 분석되었다.

도 15: 렌티바이러스 백본을 사용하는 선택마커 CD34(tCD34)와 함께 긴(링커 1-41bp) 또는 짧은(링커 2-6bp) 링커에 의해 분리된 두개의 shRNA로 형질도입된 인간 iPSC 세포주 SCiPS-R1에서의 RNA 발현을 나타낸다. 형질도입은 배양배지 중에서 1mL의 총부피가 될 때까지 희석된 50 μ L 또는 500 μ L의 바이러스 상청액으로 수행되었다. 단일 단계 영양강화는 형질도입 8일 후에 CD34-특이적 CliniMACS 자성 비드들을 사용하여 수행되었다. 이어서, 세포들은 하우스키핑 유전자로서 시클로필린을 사용하여 qRT-PCR에 의해 shRNA 타겟들의 전사 발현에 대해 분석되었다. 막대그래프는 대조군으로서 shRNA(tCD34)를 전혀 발현하지 않는 SCiPS-R1 세포들에 대한 상대적 발현값을 나타낸다. 링커 1(41bp): caagttgggctttaagcttgcaggcctgctgatgtt gag (서열번호: 1); 링커 2(6bp - 클로닝

유래): aagctt (서열번호: 2).

도 16: 렌티바이러스 백본을 사용하는 선택마커 CD34(tCD34)와 함께 긴(링커 1-41bp) 또는 짧은(링커 2-6bp) 링커에 의해 분리된 두개의 shRNA로 형질도입된 인간 iPSC 세포주 SciPR-R1에서의 RNA 발현을 나타낸다. 형질도입은 배양배지 중에서 1ml의 총부피가 될 때까지 희석된 500 μ l의 바이러스 상청액으로 수행되었다. 단일 단계 영양강화는 형질도입 8일 후에 CD34-특이적 CliniMACS 자성 비드들을 사용하여 수행되었다. 세포들은 하우스키팅 유전자로서 시클로필린을 사용하여 qRT-PCR에 의해 shRNA 타겟들의 발현에 대해 분석되었다. 막대그래프는 대조군으로서 shRNA(tCD34)를 전혀 발현하지 않는 SciPS-R1 세포들에 대한 상대적 발현값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

- [0048] **정의**
- [0049] 본 발명은 임의의 도면들을 참조하여 특정의 구체예들에 대해 설명될 것이지만, 본 발명은 이들에 제한되는 것은 아니고, 단지 청구범위에 의해서만 한정된다. 청구범위에서 임의의 참조 표시는 청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안될 것이다. 설명된 도면들은 단지 도식적인 것으로, 제한적인 것은 아니다. 도면들에서, 부재들의 일부의 크기는 확대될 수 있고, 예시적 목적으로 실제 크기로 도시되지 않을 수 있다. 발명의 설명 및 청구범위에서 용어 "포함하는"이 사용된 경우, 이는 다른 부재들 또는 단계들을 배제하지 않는다. 부정관사 또는 정관사가 단수형, 예로서 "a" 또는 "an", "상기"로 언급되면서 사용되는 경우, 이는 특별히 언급되지 않는 한 복수형을 포함한다.
- [0050] 또한, 발명의 설명 및 청구범위에서 제1, 제2, 제3 등의 용어는 유사한 부재들을 구별하기 위해 사용되며, 반드시 연속적 순서 또는 순차적 순서를 설명하기 위한 것은 아니다. 그러한 용어들은 적절한 상황하에서는 상호교환되어 사용될 수 있고, 본 명세서에 기재된 본 발명의 구체예들은 본 명세서에 기재 또는 예시된 순서와는 다른 순서로 동작될 수 있다.
- [0051] 하기의 용어들 또는 정의들은 단지 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공된다.
- [0052] 본 명세서에서 특별히 규정하지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 용어들은 본 발명의 분야에서의 기술자가 인식하고 있는 것과 동일한 의미들을 갖는다. 당분야의 정의들 및 용어들에 대해, 기술자들은 특히 Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2012); 및 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (up to Supplement 114), John Wiley & Sons, New York (2016)를 참조한다. 본 명세서에서 제공된 정의들은 당분야에서 통상의 기술을 가진 사람에 의해 이해되는 것보다 더 좁은 범위를 갖는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0053] 본 명세서에서 사용된 "조작된 세포(engineered cell)"는 (천연적으로 발생하는 돌연변이에 반대되는 개념으로서) 인간의 개입을 통해 변형된 세포이다.
- [0054] 본 명세서에서 사용된 "뉴클레오티드" 또는 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"로서 유사하게 언급된 용어 "핵산 분자"는 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 의미하며, 이는 미변형 RNA 또는 DNA, 또는 변형 RNA 또는 DNA일 수 있다. 핵산 분자는, 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA에 제한됨이 없이, 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일 가닥 및 이중 가닥 RNA, 및 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일 가닥 또는 더욱 전형적으로 이중 가닥, 또는 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA와 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함한다. 또한, "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA와 DNA 모두를 포함하는 삼중 가닥 영역들을 의미한다. 또한 용어 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 염기들 및 안정성 또는 다른 이유로 변형된 백본을 갖는 DNA들 또는 RNA들을 포함하는 DNA들 또는 RNA들을 포함한다. "변형된(modified)" 염기들은, 예를 들어 트리틸화된 염기들 및 이노신과 같은 이상(unusual) 염기들을 포함한다. 다양한 변형들이 DNA 및 RNA에 대해 이루어질 수 있다; 따라서, "폴리뉴클레오티드"는 전형적으로 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 화학적으로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태뿐 아니라 바이러스 및 세포들의 DNA 특징 및 RNA 특징의 화학적 형태들을 포괄한다. 또한 "폴리뉴클레오티드"는, 종종 올리고뉴클레오티드로도 언급되는, 상대적으로 짧은 핵산 사슬들을 포괄한다.
- [0055] "벡터"는, 다른 핵산 단편이 작동가능하게 삽입되어 상기 핵산 단편의 복제 또는 발현을 야기하는 플라스미드, 파아지, 코스미드, 또는 바이러스와 같은 레플리콘(replicon)이다. "클론"은 단일 세포 또는 유산분열에 의한 공통선조(common ancestor)로부터 유래된 세포군이다. "세포주"는 여러 세대 동안 시험관내에서 안정적으로 성장할 수 있는 일차 세포의 클론이다. 본 명세서에 제공된 일부 실시예들에서, 세포들은 이들 세포들을 DNA로 형

질감염시킴으로써 형질전환된다.

- [0056] 용어 "발현하다" 및 "생성하다"는 본 명세서에서 동의어로 사용되며, 유전자 생성물의 생합성을 의미한다. 이들 용어들은 RNA 내로의 유전자의 전사를 포함한다. 이들 용어들은 또한 하나 이상의 폴리펩티드 내로의 RNA의 번역을 포함하고, 또한 천연적으로 발생하는 전사 후 및 번역 후의 모든 변형들을 포함한다.
- [0057] 본 명세서에서 사용된 용어 "외생의"는, 특히 세포들 또는 면역 세포들의 관점에서, 개개의 살아있는 세포 내에서 존재하며 활성을 나타내되, (내생 인자와는 반대로) 상기 세포의 외부 기원에서 유래된 임의의 물질을 의미한다. 따라서, 문구 "외생의 핵산 분자"는, 전형적으로 형질도입 또는 형질감염을 통해 (면역) 세포 내로 도입된 핵산 분자를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "내생의"는 개개의 살아있는 세포 내에서 존재하며 활성을 나타내고, 상기 세포 내부에서 유래된 (따라서 또한 전형적으로 비-형질도입 또는 비-형질감염 세포 내에서 제조된) 임의의 인자 또는 물질을 의미한다.
- [0058] 본 명세서에서 사용된 "분리된"은 어느 생물학적 성분을 천연적으로 생성하는 유기체의 다른 생물학적 성분들, 예로서 다른 염색체 내 및 염색체 외 DNA 및 RNA 및 단백질들로부터 실질적으로 분리되거나, 상기 다른 생물학적 성분들과는 별개로 생성되거나, 상기 다른 생물학적 성분들로부터 정제된 (핵산, 펩티드 또는 단백질과 같은) 생물학적 성분을 의미한다. 따라서, "분리된" 핵산, 펩티드 및 단백질들은 표준 정제 방법들에 의해 정제된 핵산들 및 단백질들을 포함한다.
- [0059] "분리된" 핵산, 펩티드 및 단백질은 조성물의 일부일 수 있고, 만약 상기 조성물이 상기 핵산, 펩티드, 또는 단백질의 천연 환경의 일부가 아니라면, 더 분리될 수 있다. 또한, 상기 용어는 숙주세포 내에서의 재조합 발현에 의해 제조된 핵산, 펩티드 및 단백질뿐 아니라 화학적으로 합성된 핵산들도 포함한다.
- [0060] 유전자 편집의 관점에서 본 명세서에서 사용된 "다중화(multiplexed)"는 둘 이상(즉, 다수)의 관련된 타겟들 또는 관련없는 타겟들의 동시 타겟팅을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 용어 "RNA 간섭 분자"는 타겟 RNA 분자들을 중화함으로써 유전자 발현 또는 번역을 억제하는 RNA (또는 RNA-유사) 분자를 의미한다. 이들의 예로는, siRNA(shRNA 포함) 분자 또는 miRNA 분자를 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 "다중화 RNA 간섭 분자들"은 하나 이상의 타겟의 동반 하향조절을 위해 동시에 존재하는 둘 이상의 분자들이다.
- [0061] 전형적으로, 다중화 분자들의 각각은 특정 타겟을 겨냥할 것이나, 두개의 분자들은 동일한 타겟을 겨냥할 수 있다(심지어 상기 두개의 분자들은 동일할 수 있다).
- [0062] 본 명세서에서 사용된 "프로모터"는 일반적으로 유전자 영역에 인접하여 위치하는 핵산의 조절 영역으로서, 조절된 유전자 전사를 위한 조절점을 제공한다.
- [0063] "멀티플렉스(multiflex)"는 동종의 복수의 분자들, 예로서 복수의 siRNA 또는 shRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 멀티플렉스 내에서, 분자들이 동종일 때(예를 들어, 모든 shRNA), 그 분자들은 동일할 수 있거나 다른 서열들을 포함할 수 있다. 동종인 분자들 사이에, 본 명세서에서 기재된 링커들과 같은 중간 서열들이 존재할 수 있다. 본 발명의 멀티플렉스의 예는 복수의 탠덤 miRNA-기반 shRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 멀티플렉스는 단일 가닥이거나 이중 가닥이거나, 또는 단일 가닥인 영역들과 이중 가닥인 영역들 모두를 가질 수 있다.
- [0064] 본 명세서에서 사용된 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은, 적어도 항원에 대한 특이성을 갖는 결합 부분(moiety)(예로서, 항체, 수용체 또는 그의 동계(cognate) 리간드로부터 파생될 수 있음) 및 면역 세포 내에서 신호를 전달할 수 있는 신호(signaling) 부분(예로서, CD3 제타 체인, 그 외 예를 들어 Fc 엡실론 RI 감마 도메인, CD3 엡실론 도메인, 최근에 보고된 DAP10/DAP12 신호 도메인, 또는 공동자극 도메인으로서 CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP10, DAP12, CD27, 및 CD2로부터의 도메인들과 같은 다른 신호 부분들 또는 공동신호 부분들도 사용될 수 있음)을 갖는 키메라 수용체(즉, 다른 기원들로부터 유래된 부분들로 구성됨)를 의미한다. "키메라 NK 수용체"는 상기 결합 부분이 NK 수용체로부터 파생되거나 분리되는 CAR이다.
- [0065] 본 명세서에서 사용된 "TCR"은 T 세포 수용체를 의미한다. 이는, 입양세포 전달의 관점에서, 전형적으로 조작된 TCR, 즉 특정의 항원, 가장 일반적으로는 종양 항원을 인식하도록 조작된 TCR을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 "내생 TCR"은 미변형 세포들(전형적으로 T 세포들)에서 내생적으로 존재하는 TCR을 의미한다.
- [0066] TCR은, 통상적으로 불변 CD3 사슬 분자들과의 복합체의 일부로서 발현된 고가변성의 알파(α) 및 베타(β) 사슬들로 구성된 이화화-연결된 막-결합 헤테로이량체 단백질이다. TCR 수용체 복합체는 CD3 공수용체(하나의 CD3 γ 사슬, 하나의 CD3 δ 사슬, 및 두개의 CD3 ϵ 사슬들을 포함함) 및 두개의 CD3 ζ 사슬들(CD247 분자들로 알려짐)

과 가변성 TCR 수용체 α 및 β 사슬들의 8량체 복합체이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "기능성 TCR"은 그의 동계 리간드의 결합에 따라 신호를 변환할 수 있는 TCR을 의미한다. 전형적으로, 동종 이계 요법들을 위해, 예를 들어 적어도 하나의 TCR 사슬을 녹아웃 또는 녹다운시킴으로써, TCR 기능을 감소 또는 손상시키기 위한 조작이 일어날 것이다. 조작된 세포에서의 내생의 TCR은, 어떠한 조작이 이루어지지 않은 내생의 TCR을 갖는 세포와 비교 시, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%까지의 신호 능력(signalling capacity)(또는 T 세포 활성화)을 보유할 때, 기능성이 있다고 간주된다. 신호 능력 또는 T 세포 활성화에 대한 분석 방법들은 당분야의 기술자에게 알려져 있고, 특히 인터페론 감마를 측정하는 ELISA를 포함한다. 대안적 구체예들에 따르면, 내생의 TCR은 TCR 기능을 방해하는 조작이 전혀 일어나지 않았다면 기능성인 것으로 간주된다.

[0067] 본 명세서에서 사용된 용어 "면역 세포"는 (적응성 면역 시스템 또는 선천성 면역 시스템일 수 있는) 면역 시스템의 일부인 세포들을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 면역 세포들은 전형적으로 적응성 세포 이식(자가조직 이식 또는 동종이계 이식)을 위해 제조된 면역 세포들이다. 다양한 타입의 면역 세포들이 적응성 요법을 위해 사용되고, 따라서 본 명세서에서 기재된 방법들에 사용될 수 있다. 면역 세포들의 예는, 제한되지는 않지만, T 세포, NK 세포, NKT 세포, 림프구, 수상돌기 세포, 골수 세포, 줄기 세포, 간세포 또는 iPSC들을 포함한다. 후자의 세가지 세포는 면역 세포가 아니지만, 면역요법을 위한 적응성 세포 이식에 사용될 수 있다(예로서, Jiang et al., Cell Mol Immunol 2014; Themeli et al., Cell Stem Cell 2015) 참조). 전형적으로, 줄기 세포 또는 iPSC를 이용하여 제조공정이 개시되고(또는 면역 세포로부터 iPSC로의 분화단계부터 시작될 수도 있음), 제조는 투여 전에 면역 세포들로의 분화 단계를 수반할 것이다. 본 명세서에서, 적응성 이식을 위한 면역 세포의 제조에 사용된 줄기 세포, 간세포 및 iPSC(즉, 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR로 형질도입되는 줄기 세포, 간세포 및 iPSC 또는 그들의 분화된 자손)들은 면역 세포인 것으로 간주된다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 방법들에 고려되는 줄기 세포들은 인간 배아의 파괴 단계를 포함하지 않는다.

[0068] 특별히 고려된 면역 세포들은 림프구, 단핵구, 마크로파지 및 수상돌기 세포들을 포함하는 백혈구 세포(leukocyte)들을 포함한다. 특별히 고려되는 림프구들은 T 세포, NK 세포 및 B 세포들을 포함하고, 특히 가장 고려되는 것은 T 세포들이다. 적응성 이식의 관점에서, 면역 세포들은 전형적으로 일차 세포들(즉, 인간 또는 동물의 조직으로부터 직접 분리된 세포들로서, 배양되지 않았거나 단지 간단히 배양된 세포들)일 것이고, 세포주(즉, 계속적으로 장기간을 거쳐 동종의 유전자 타입 특성들 및 유전자 형질 특성들을 획득한 세포들)는 아니다. 특정 구체예들에 따르면, 면역 세포들은 전형적으로 일차 세포들(즉, 인간 또는 동물의 조직으로부터 직접 분리된 세포들로서, 배양되지 않았거나 단지 간단히 배양된 세포들)일 것이고, 세포주(즉, 계속적으로 장기간을 거쳐 동종의 유전자 타입 특성들 및 유전자 형질 특성들을 획득한 세포들)는 아니다. 대안적 특정 구체예들에 따르면, 상기 면역 세포는 세포주로부터의 세포는 아니다.

[0069] 본 명세서에서 사용된 "마이크로RNA 스캐폴드" 또는 "miRNA 스캐폴드"는 특정의 마이크로RNA 처리 조건들을 포함하는 잘 특성화된 일차 마이크로RNA 서열을 의미하고, (전형적으로 기존의 miRNA 서열을 특정 타겟을 겨냥하는 shRNA로 대체하기 위하여) RNA 서열이 삽입될 수 있다. miRNA 스캐폴드의 예로는 SMARTvectorTM 마이크로RNA 개조(adapted) 스캐폴드(Horizon Discovery, Lafayette, CO, USA), 또는 miR-106a~363 클러스터와 같은 천연 유래의 miRNA를 포함한다. 용어 "대상(subject)"은 인간 및 모든 척추동물, 예로서 비-인간 영장류, 쥐, 토끼, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류 및 파충류와 같은 포유동물 및 비-포유동물을 포함하는 비-인간 동물들을 의미한다. 개시된 방법들 중 가장 특별한 구체예들에서, 상기 대상은 인간이다.

[0070] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는, 증상들의 완화, 차도, 감소 또는 환자가 해당 상태를 더 견딜만하게 만드는 것, 악화 속도 또는 감퇴 속도를 지연시키는 것, 악화의 최종점을 덜 쇠약하게 만드는 것, 대상의 육체적 또는 정신적 웰빙을 향상시키는 것, 또는 생존 기간을 연장시키는 것과 같은 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터를 포함하는, 부상, 병리 또는 상태의 완화 또는 개선에서의 임의의 성공 또는 성공의 징후를 의미한다. 상기 치료는, 물리적 검사, 신경학적 검사, 또는 정신의학적 평가의 결과들을 포함하는 객관적 또는 주관적 파라미터들에 의해 분석될 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 문구 "적응성 세포 요법", "적응성 세포 이식", 또는 "ACT"는 세포들, 가장 일반적으로는 면역 세포들을 대상(예로서, 환자) 내에 이식하는 것을 의미한다. 이들 세포들은 상기 대상으로부터 유래하거나 다른 개체(동종이계 요법의 경우)로부터 유래한 것일 수 있다. 상기 요법의 목적은 면역 기능성 및 특성들을 향상시키는 것 및 암 면역요법에서 암에 대한 면역 반응을 상승시키는 것이다. T 세포들이 ACT를 위해 가장 자주 사용되지만, NK 세포들, 림프구들(예로서, 종양-침습 림프구들(TILs)), 수상돌기 세포들 및 골수 세포들과 같은

다른 면역 세포 타입을 사용하는 것도 적용된다.

- [0072] "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 투여용량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 효과적인 양을 의미한다. 본 명세서에 기재된 형질전환된 면역 세포들과 같은 치료제의 치료적 유효량은 질병 상태, 나이, 성별, 및 개체의 체중, 및 개체에서의 원하는 반응을 이끌어내기 위한 (상기 세포들과 같은) 치료제의 능력에 따라서 다양할 수 있다. 치료적 유효량은 또한 상기 치료제의 어떤 독성 또는 부작용이 치료적으로 유리한 효과들에 의해 보상되는 양이다.
- [0073] 문구 "이식편대 숙주병" 또는 "GvHD"는 동종이계 이식 후에 발생할 수 있는 상태를 의미한다. GvHD에 있어서, 기증된 골수, 말초 혈액(줄기) 세포들 또는 다른 면역 세포들은 수령자의 육체를 이질적으로 인식하여, 상기 기증된 세포들은 수령자의 육체를 공격한다. T 세포들과 같은 기증자 면역적격성 면역 세포들은 GvHD를 위한 주요 드라이버이고, GvHD를 방지하기 위한 하나의 전략은 상기 면역적격성 세포들에서의 (TCR-기반) 신호를 감소시키는 것, 예를 들어 직간접적으로 TCR 복합체의 기능을 억제하는 것이다.
- [0074] 적응성 세포 이식(ACT)의 관점에서 동의유전자의 타겟팅이 게놈 편집에 대한 필요성(및 그와 관련된 비용 및 복잡체 제조공정)없이 실현가능한지의 여부를 분석하기 위해, 다중화 RNA 간섭 분자들을 테스트하는 것이 결정되었다.
- [0075] 기본 접근법은, 염기 인식을 통해 선택된 mRNA를 타겟팅할 수 있는 활성 shRNA를 생성하기 위해 내생의 RNA 편집 시스템에 의해 처리되는 특정 벡터로부터의 RNA의 전사 및 그에 따른 CER 복합체에 의한 상기 특정 mRNA의 파괴에 기초한다. 상기 타겟팅된 mRNA의 상기 특성의 파괴에 따라 관련 단백질의 발현의 감소가 초래된다. RNA 올리고뉴클레오티드는 유전자 발현의 일시적 녹다운을 달성하기 위해 선택된 타겟 세포들 내로 형질감염될 수 있는 반면, 통합(integrated) 벡터로부터의 원하는 shRNA의 발현은 유전자 발현의 안정적인 녹다운을 가능하게 한다.
- [0076] shRNA의 성공적인 발현은, shRNA 듀플렉스의 처리를 가능하게 하는, 5' 캡 및 3' 폴리아데닐화가 결핍된 RNA 종들을 생성하는 폴리머라제 III(Pol III) 프로모터(예로서, H1, U6)와의 결합에 주로 의존한다. 일단 전사되면, shRNA는 처리되어 핵으로부터 방출되고, 추가 처리되어, 선택된 mRNA의 목적하는 분해를 유도하는 RNA-유도성 침묵 복합체(RISC) 내에 적재된다(Moore et al., 2010). Pol III 프로모터들에 의해 작동된 전사는 효과적이기는 하지만, 그 효율성은 Pol III 프로모터들로부터의 shRNA의 과도하게 높은 발현으로 인해 내생의 마이크로RNA 경로의 포화를 통해 세포독성을 초래할 수 있다(Fowler et al., 2015). 또한, 단일 벡터에 의한 치료(therapeutic) 유전자 및 shRNA의 발현은 전형적으로 상기 치료 유전자를 작동하는 폴리머라제 II(Pol II) 프로모터 및 상기 목적 shRNA를 작동하는 Pol III 프로모터를 사용함으로써 달성되었다. 이는 기능적이기는 하지만, 벡터 공간의 비용 문제가 있고, 따라서 치료 유전자들을 포함하기 위한 옵션이 덜 제공된다(Chumakov et al., 2010; Moore et al., 2010).
- [0077] 마이크로RNA(mir) 프레임워크 내에 shRNA를 매립하는 것은 상기 shRNA가 Pol II 프로모터의 조절 하에서 처리될 수 있게 한다(Giering et al., 2008). 중요하게는, 매립된 shRNA의 발현 수준은 낮아지는 경향이 있고, 그로 인해 U6 프로모터와 같은 다른 시스템을 사용할 경우에 관찰된 세포독성을 피할 수 있다(Fowler et al., 2015). 실제로, 간-특이적 Pol II 프로모터에 의해 작동된 shRNA를 이식한 마우스는 1년 이상 동안 내성의 문제없이 안정적인 유전자 녹다운을 나타내었다(Giering et al., 2008). 그러나, 이는 간(liver) 세포에서 하나의 shRNA에 대해 수행된 것으로, 단백질 수준의 감소는 단지 15%이었고(Giering et al., 2008), 따라서 특히 (처리하기 더 어려운) 면역 세포들 내에서 하나보다 많은 타겟에 대해서도 높은 효율이 달성될 수 있는지를 알 수 없다.
- [0078] 놀랍게도, 본 발명에서는, 서로 다른 타겟들에 대한 (예로서, 스캐폴드로서 사용된 miR196a2 스캐폴드 또는 miR106a~363 클러스터에 기반한) 복수의 마이크로RNA-기반 shRNA들의 발현이, 제조 및 독성을 나타내지 않으면서 타겟들의 효과적인 하향조절을 동시에 달성하면서 T 세포들 내에서 실현가능하다는 것이 입증되었다.
- [0079] 따라서, shRNA가 세포들, 특히 조작된 면역 세포들 내에서 성공적으로 다중화될 수 있을 뿐 아니라, 타겟들도 유전자 녹다운에 필적할 정도로 매우 효과적으로 하향조절될 수 있다(CRISPR과의 비교를 제공하는 실시예 5~8 및 도 8~12 참조).
- [0080] 따라서, 본 발명의 목적은 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 조작된 세포들을 제공하는 것이다.
- [0081] 적어도 두개의 RNA 간섭 분자들을 포함하는 세포들은 유리한 효과, 특히 치료적 이점들을 가질 수 있다. RNA 간섭 분자들은 실제로 (과)발현이 바람직하지 않은 타겟들을 겨냥할 수 있다. 그러나, 전형적으로, 본 발명에서

제공되는 조작된 세포들은 목적 단백질을 더 포함할 것이다.

- [0082] 추가의 구체예들에 따르면, 다음을 포함하는 조작된 세포들이 제공된다:
- [0083] ○ 목적 단백질을 인코딩하는 제1 외생 핵산 분자, 및
- [0084] ○ 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들을 인코딩하는 제2 핵산 분자.
- [0085] 선택적인 추가의 목적 단백질은, 예를 들어 추가적, 보충적, 또는 심지어 상승적 효과를 제공할 수 있거나, 또는 다른 목적을 위해 사용될 수 있다, 예를 들어, 목적 단백질은 종양을 겨냥한 CAR일 수 있고, 상기 RNA 간섭 분자들은, 예를 들어 면역관문을 타겟팅하여 직접 종양 타겟을 하향조절하고 종양 미세환경을 타겟팅함으로써 종양 기능을 방해할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 하나 이상의 RNA 간섭 분자들은 치료성 세포들의 지속성을 연장시킬 수 있거나, 또는 생리적 반응을 변경(예로서, GvHD 또는 숙주편대이식 반응을 방해함)시킬 수 있다.
- [0086] 목적 단백질들은 원칙적으로, 설계에 따라, 임의의 단백질일 수 있다. 그러나, 전형적으로 그들은 치료 기능을 갖는 단백질들이다. 이들은, 예로서 인터루킨, 사이토카인 또는 호르몬과 같은 분비된 치료성 단백질들을 포함할 수 있다. 그러나, 특정 구체예들에 따르면, 상기 목적 단백질은 분비된 것이 아니다. 전형적으로, 상기 목적 단백질은 수용체이다. 추가의 특정 구체예들에 따르면, 상기 수용체는 키메릭 항원 수용체 또는 TCR이다. 키메릭 항원 수용체들은 타겟 세포의 표면 상에 발현된 임의의 타겟을 겨냥할 수 있고, 전형적인 예로는, 제한되지는 않지만, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD33, CD38, CD44, CD56, CD70, CD123, CD133, CD138, CD171, CD174, CD248, CD274, CD276, CD279, CD319, CD326, CD340, BCMA, B7H3, B7H6, CEACAM5, EGFRvIII, EPHA2, 메소텔린(mesothelin), NKG2D, HER2, HER3, GPC3, Flt3, DLL3, IL1RAP, KDR, MET, mucin 1, IL13Ra2, FOLH1, FAP, CA9, FOLR1, ROR1, GD2, PSCA, GPNMB, CSPG4, ULBP1, ULBP2를 포함하나, 더 많은 종류들이 존재하고 이들 또한 적합하다. 대부분의 CAR들은 scFv-기반이지만(즉, 결합 부분이 특정 타겟을 겨냥한 scFv이고, CAR는 전형적으로 상기 타겟의 이름을 따서 명명된다), 일부 CAR 들은 수용체-기반이다(즉, 결합 부분이 수용체의 일부이고, CAR는 전형적으로 수용체의 이름을 따서 명명된다).
- [0087] 조작된 TCR들은, 세포내 타겟들을 포함하여, 세포의 임의의 타겟을 겨냥할 수 있다. 세포 표면 상에 존재하는 상기에 열거한 타겟들에 추가하여, TCR을 위한 전형적인 타겟들은, 제한되는 것은 아니지만, NY-ESO-1, PRAME, AFP, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, gp100, MART-1, 타이로시나제(tyrosinase), WT1, p53, HPV-E6, HPV-E7, HBV, TRAIL, 사이로글로불린(thyroglobulin), KRAS, HERV-E, HA-1, CMV, 및 CEA를 포함한다.
- [0088] 추가의 목적 단백질이 존재하는 이들 특징의 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포 내의 제1 및 제2 핵산 분자는 전형적으로 진핵 발현 플라스미드, 미니-서클 DNA, 또는 (예로서, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 및 센다이 바이러스로부터 파생된) 바이러스 벡터와 같은 하나의 벡터 내에 존재한다. 추가의 특정 구체예들에 따르면, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터로부터 선택된다. 특히, 후자의 벡터에 대해 규모(load)(즉, 구조체의 총 크기)가 중요하고, 콤팩트한 멀티플렉스 카세트의 사용이 특히 유리하다.
- [0089] 상기 조작된 세포들은 진핵 세포들, 특히 조작된 포유동물 세포들, 더욱 특별히는 조작된 인간 세포들이다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 세포들은 조작된 면역 세포들이다. 전형적인 면역 세포들은 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 줄기 세포, 간세포, 및 iPSC 세포로부터 선택된다.
- [0090] 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은, 하향조절될 타겟 분자들의 수 및 상기 다중화 분자들의 공동발현에 대한 제약에 따라, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개 또는 그 이상의 분자들일 수 있다. "멀티플렉스"는 동일한 종류의 복수의 분자들, 예로서 복수의 siRNA 또는 miRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 멀티플렉스 내에서, 분자들이 동일한 종류(예로서, 모두 shRNA)일 때, 그들은 동일할 수 있고, 또는 다른 서열들을 포함할 수 있다. 상기 동일한 종류의 분자들 사이에, 본 명세서에 기재된 바의 링커들과 같은 개체 서열들이 존재할 수 있다. 본 발명의 멀티플렉스의 예는 복수의 탠덤 miRNA-기반 shRNA들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드이다. 멀티플렉스는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 또는 단일 가닥인 영역들 및 이중 가닥인 영역들 모두를 가질 수 있다.
- [0091] 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 하나의 프로모터의 조절 하에 있다. 전형적으로, 하나보다 많은 RNA 간섭 분자들이 발현되는 경우, 이는 shRNA-발현 카세트의 복수의 사본들을 통합함으로써 수행된다. 이들은 전형적으로 동일한 프로모터 서열들을 가지고, 이로 인해 반복된 서열 단편들을 제거하는 빈번한 재조합 현상이 초래된다. 해결책으로서, 전형적으로 여러 다른 프로모터들이 하나의 발현 카세트

내에 사용된다(예로서, Chumakov et al., 2010). 그러나, 이러한 구체예들에 따르면, 재조합은 단지 하나의 프로모터의 사용에 의해 회피된다. 이는, 발현이 일반적으로 낮아지고, 너무 많은 siRNA는 세포에 유독하기 때문에(예를 들어, 내생의 siRNA 경로를 방해함으로써), 독성의 측면에서 유리한 점을 가진다. 단지 하나의 프로모터의 사용은, 모든 shRNA가 비슷한 수준으로 공동조절되고 발현되는 추가적인 이점을 갖는다. 놀랍게도, 실시예들에서 나타난 바와 같이, 동종 shRNA들은 효능의 상당한 저하 없이 하나의 프로모터로부터 전사될 수 있다.

[0092] 추가의 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들 및 상기 목적 단백질은 하나의 프로모터의 조절 하에 있다. 이는, (목적 단백질을 발현하기 위해 별개의 프로모터가 전혀 사용되지 않기 때문에) 벡터 규모를 감소시키고, 공동조절 발현의 이점을 제공한다. 이는, 예를 들어, 상기 목적 단백질이 암을 타겟팅하는 CAR이고, 상기 RNA 간섭 분자들이 종양 소거에 대해 추가적인 또는 상승적인 효과를 갖도록 의도되는 경우에 유리할 수 있다.

[0093] 전형적으로, RNA 간섭 분자들을 발현하기 위해 사용된 프로모터는 U6 프로모터는 아니다. 이는, 이 프로모터는 특히 고수준의 발현에서 독성으로 연결되기 때문이다. 동일한 이유로, 일반적으로 H1 프로모터들(U6 보다 더 약한 프로모터임) 또는 심지어 Pol III 프로모터들(이들은 어떤 조건에서는 적합할 수 있더라도)을 배제하는 것을 고려할 수 있다. 따라서, 특정 구체예들에 따르면, RNA 간섭 분자들을 발현하기 위해 사용된 프로모터는 RNA Pol III 프로모터가 아니다. RNA Pol III 프로모터는 시간적 및 공간적 조절이 부족하여, miRNA 억제제들의 조절된 발현이 어렵다. 대비적으로, 다수의 RNA Pol II 프로모터들은 조직-특이적 발현을 가능하게 하고, 유도성 및 억제성 RNA Pol II 프로모터들 모두가 존재한다. 본 발명의 측면에서, 조직-특이적 발현이 종종 요구되지 않을 지라도(세포들이 조작 전에 선택되기 때문), 예를 들어 면역 세포들을 위한 특이적 프로모터들을 갖는 것은 여전히 유리한데, 이는 다양한 프로모터들로부터의 RNAi 효능에서의 차이가 특히 면역 세포들에서 현저하게 나타났기 때문이다(Lebbink et al., 2011). 특정 구체예들에 따르면, 상기 프로모터는 Pol II 프로모터 및 Pol III 프로모터로부터 선택된다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 프로모터는 천연 또는 합성 Pol II 프로모터이다. 적합한 프로모터로는, 제한되지는 않지만, 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 연장인자 1 알파(EF1 α) 프로모터(코어 또는 전장(full length)), 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 업스트림 CMV IV 인핸서를 갖는 복합체 베타-액틴 프로모터 (CAG 프로모터), 유비퀴틴 C(Ubc) 프로모터, 비장병소 형성 바이러스(SFFV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 인터루킨-2 프로모터, 쥐줄기세포 바이러스(MSCV) 긴 말단 반복(LTR), 기번 아페(Gibbon ape) 백혈병 바이러스(GALV) LTR, 시미안 바이러스 40 (SV40) 프로모터, 및 tRNA 프로모터를 포함한다. 이들 프로모터들은 mRNA 발현을 작동하기 위한 가장 통상적으로 사용되는 폴리머라제 II 프로모터들이다.

[0094] 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 shRNA 분자들 또는 miRNA 분자들일 수 있다. 가장 특별히는, 그들은 miRNA 분자들이다. shRNA 분자들과 miRNA 분자들 사이의 차이는 miRNA 분자들은 Drosha에 의해 처리되는 반면, 통상의 shRNA 분자들은 그렇지 않다는 점이다(이는 독성과 관련됨, Grimm et al., Nature 441:537-541 (2006)).

[0095] 특정 구체예들에 따르면, miRNA 분자들은 하나의 프로모터의 조절 하에 있는 하나의 miRNA 스캐폴드로서 제공될 수 있다. 만약 선택된 스캐폴드가 정상적으로 하나의 miRNA를 품는다면, 상기 스캐폴드는 다중 RNA 간섭 분자들의 발현을 얻기 위하여 다른 스캐폴드들과 반복되거나 조합될 수 있다. 그러나, 추가의 스캐폴드들과 반복 또는 조합되는 경우, 전형적으로 모든 다중화 RNA 간섭 분자들이 하나의 프로모터의 조절 하에 있게 될 것(즉, 단일의 스캐폴드가 반복되는 경우, 상기 하나의 프로모터는 반복되지 않음)이 예상된다.

[0096] miRNA 다중화를 위해 특히 적합한 스캐폴드 서열들은 miR-30 스캐폴드 서열, miR-155 스캐폴드 서열, 및 miR-196a2 스캐폴드 서열이다. 그러나, 특정 구체예들에 따르면, miR-30 서열 또는 miR-155 서열의 어떤 것도 사용되지 않는다.

[0097] 전형적으로, miRNA 분자들 중 적어도 하나는 miR-196 스캐폴드 서열을 포함하고, 바람직하게는 miR-196a2 스캐폴드 서열을 포함한다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 적어도 두개의 miRNA 분자들 모두는 miR-스캐폴드 서열, 바람직하게는 miR-196a2 스캐폴드 서열을 포함한다. 동일하게 miR-30 스캐폴드 서열 및 miR-155 스캐폴드 서열의 경우에도 그러할 수 있다. 그러한 적합한 스캐폴드들의 예들은 미국특허 제8841267호(특히, 청구항 1)에 열거되어 있으며, 상기 미국특허는 본 명세서에 참고문헌으로 통합된다. 상기 단일의 스캐폴드는 SMARTvector™ 마이크로-RNA 개조 스캐폴드(Horizon Discovery, Lafayette, CO, USA)로서 상업적으로 입수가 가능하다.

[0098] 추가적으로 적합한 스캐폴드 서열들은 miR-26b(hsa-mir-26b), miR-204(hsa-mir-204), 및 miR-126(hsa-mir-126), hsa-let-7f, hsa-let-7g, hsa-let-7a, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-mir-29a, hsa-mir-140-3p, hsa-

let-7i, hsa-let-7e, hsa-mir-7-1, hsa-mir-7-2, hsa-mir-7-3, hsa-mir-26a, hsa-mir-26a, hsa-mir-340, hsa-mir-101, hsa-mir-29c, hsa-mir-191, hsa-mir-222, hsa-mir-34c-5p, hsa-mir-21, hsa-mir-378, hsa-mir-100, hsa-mir-192, hsa-mir-30d, hsa-mir-16, hsa-mir-432, hsa-mir-744, hsa-mir-29b, hsa-mir-130a, 또는 hsa-mir-15a를 포함한다.

- [0099] 배제적이지 않은 대안적 구체예들에 따르면, 반복됨으로써 합성 반복 스캐폴드를 제공하는 특정의 miR 스캐폴드를 사용하기 보다는, 내생의 miRNA가 목적 shRNA에 의해 대체된, 정통의 폴리시스트론 miRNA 클러스터들 또는 그들의 일부가 사용될 수 있다. 이를 위해 특히 적합한 miR 스캐폴드 클러스터들은 miR-106a~363, miR-17~92, miR-106b~25, 및 miR-23a~27a~24-2 클러스터이고; 가장 특별히 고려되는 것은 miR-106a~363 클러스터 및 그의 단편들이다. 주목할 점은, 벡터 페이로드를 절감하기 위해, 모든 서열들이 아닌, 그러한 천연 클러스터들의 일부를 사용하는 것도 특별히 고려된다(이는, 모든 miRNA 들이 동등한 간격으로 분포되지 않고, 모든 링커 서열들이 필요하지 않을 수 있기 때문에 특히 유리하다). 다른 고려사항, 예를 들어 세포 내에서 가장 효과적으로 처리되는 miRNA들을 사용하는 것도 고려될 수 있다. 예를 들어, miR-17~92 클러스터는 (순서대로) miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 및 miR-92-1(또한 miR-92a1)로 구성되고, 특히 유용한 이들의 단편들은 miR-19a 내지 miR-92-1(즉, 상기 6개 miRNA 중 4개) 또는 miR-19a 내지 miR-19b-1(상기 6개 miRNA들 중 3개)의 스캐폴드 서열이다. 유사하게, 106a~363 클러스터는 (순서대로) miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92-2(또한 miR-92a2) 및 miR-363으로 구성된다. 특히 유용한 이들의 단편들은 miR-20b 내지 miR-363(즉, 상기 6개 miRNA들 중 4개) 또는 miR-19b-2 내지 miR-363 (즉, 상기 6개 miRNA들 중 3개)의 스캐폴드 서열이다. 천연 링커 서열들 및 (벡터의 페이로드를 더 절감하기 위해) 이들의 단편들 또는 합성 링커들이 모두 사용될 수 있다.
- [0100] 이들 전략들의 조합이 사용될 수 있는 것으로 예상되는 데, 예를 들어, miR-106a~363 클러스터 및 miR-196a2 서열 모두가 신규한 스캐폴드 내에 조합될 수 있다.
- [0101] 본 명세서에 개시된 세포들은 다중화 RNA 간섭 분자들을 포함한다. 이들은 하향조절될 필요가 있는 하나 이상의 타겟들(세포 내 타겟들, 또는 shRNA가 분비된다면 세포 외 타겟들)을 겨냥하는 것들일 수 있다. 각각의 RNA 간섭 분자는 각각 다른 분자를 타겟팅하거나, 동일 분자를 타겟팅하거나, 또는 그들의 조합을 타겟팅할 수 있다 (즉, 하나 이상의 RNA 분자가 하나의 타겟을 겨냥하거나, 단지 하나의 RNA 간섭 분자가 다른 타겟을 겨냥함). RNA 간섭 분자들이 동일 타겟을 겨냥할 경우, 그들은 동일 영역을 타겟팅할 수 있고, 또는 그들은 다른 영역을 타겟팅할 수 있다. 즉, 상기 RNA 간섭 분자들은 동일 타겟을 겨냥할 때, 동일하거나 다를 수 있다. RNA 간섭 분자들의 그러한 조합들의 예는 실시예 9에 나타나 있다.
- [0102] 따라서, 특정 구체예들에 따르면, 다중화 RNA 간섭 분자들 중 적어도 두개는 동일 타겟을 겨냥한다. 추가의 특정 구체예들에 따르면, 상기 다중화 RNA 간섭 분자들 중 적어도 두개는 동일하다.
- [0103] 대안적 구체예들에 따르면, 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들 모두는 서로 다르다. 추가의 특정 구체예들에 따르면, 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들은 다른 타겟들을 겨냥한다.
- [0104] 본 발명의 조작된 세포 내에 존재하는 임의의 적합한 분자는 인스턴트 RNA 간섭 분자들에 의해 타겟팅될 수 있다. 고려되는 타겟들의 전형적 예들은: MHC 클래스 I 유전자, MHC 클래스II 유전자, MHC 공수용체 유전자(예로서, HLA-F, HLA-G), TCR 체인, CD3 체인, NKBB1L, LTA, TNF, LTB, LST1, NCR3, AIF1, LY6, 열충격 단백질 (예로서, HSPA1L, HSPA1A, HSPA1B), 보체 캐스케이드(complement cascade), 조절 수용체(예로서, NOTCH4), TAP, HLA-DM, HLA-DO, RING1, CD52, CD247, HCP5, DGKA, DGKZ, B2M, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6, 2B4, A2AR, BAX, BLIMP1, C160 (POLR3A), CBL-B, CCR6, CD7, CD95, CD123, DGK [DGKA, DGKB, DGKD, DGKE, DKGK, DGKH, DGKI, DGKK, DGKQ, DGKZ], DNMT3A, DR4, DR5, EGR2, FABP4, FABP5, FASN, GMCSF, HPK1, IL-10R [IL10RA, IL10RB], IL2, LFA1, NEAT 1, NFkB(RELA, RELB, NFkB2, NFkB1, REL 포함), NKG2A, NR4A(NR4A1, NR4A2, NR4A3 포함), PD1, PI3KCD, PPP2RD2, SHIP1, SOAT1, SOCS1, T-BET, TET2, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TIGIT, TIM3, TOX, 및 ZFP36L2이다.
- [0105] 특히 적합한 구축물들은 miRNA-기반인 것으로 확인되었다. 따라서, 다중화 마이크로RNA-기반 shRNA 인코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조작된 세포들이 제공되고, 상기 다중화 마이크로RNA-기반 shRNA 인코딩 영역은 둘 이상의 인공적 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열들을 인코딩하는 서열들을 포함하고, 상기 인공적 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열의 각각은
- [0106] ○ miRNA 스캐폴드 서열,

- [0107] ○ 활성 서열 또는 성숙 서열, 및
- [0108] ○ 패신저 서열 또는 스타 서열
- [0109] 을 포함하고, 각각의 인공적 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열 내에서, 상기 활성 서열은 상기 패신저 서열에 대해 적어도 80% 상보성이다.
- [0110] 상기 인공적 miRNA-기반 shRNA 뉴클레오티드 서열들의 각각의 활성 서열 및 패신저 서열 모두는 전형적으로 18 내지 40개 뉴클레오티드, 바람직하게는 18 내지 30개 뉴클레오티드, 가장 특별히는 19 내지 25개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0111] 전형적으로, 상기 마이크로RNA 스캐폴드 서열들은 링커들에 의해 분리되어 있고, 링커 서열들은, 예를 들어 30 내지 60개 뉴클레오티드 길이이지만, 더 짧은 길이 또한 적용된다. 실제로, 놀랍게도, 링커의 길이는 결정적 역할을 하는 것은 아니고, 매우 짧을 수 있고(10개 뉴클레오티드 미만), 또는 shRNA 기능을 저해함이 없이 존재하지 않을 수도 있다는 것이 밝혀졌다. 이는, 예를 들어 도 6 및 도 16에 나타나 있다.
- [0112] 인공 서열들은, 예를 들어 내생의 miR 서열들을 특정 타겟에 대해 조작된 shRNA 서열들로 대체한, 천연에서 발생하는 스캐폴드들(예로서, miR-106a~363 클러스터와 같은 miR 클러스터 또는 그의 단편)일 수 있거나, 내생의 miR 서열들을 특정 타겟에 대해 조작된 shRNA 서열들로 대체한, (예로서, miR-196a2 스캐폴드와 같은) 단일 miR 스캐폴드의 반복체일 수 있거나, 인공 miR-유사 서열들일 수 있거나, 또는 이들의 조합될 수 있다.
- [0113] 상기 조작된 세포는 전형적으로 키메라 항원 수용체 또는 TCR과 같은 목적 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 더 포함하고, 상기한 바와 같이, 조작된 면역 세포일 수 있다.
- [0114] 다중화 RNA 간섭 분자들의 공동발현에 의해, 상기 조작된 세포 내의 적어도 하나의 유전자, 전형적으로는 복수의 유전자들이 억제된다. 이는 더 높은 치료 효능에 기여할 수 있다.
- [0115] 본 명세서에서 기재된 상기 조작된 세포들은 또한 의약 용도를 위해 제공된다. 특정 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포들은 암 치료에 사용되기 위해 제공된다. 치료될 암의 예시적 종류는, 제한되지는 않지만, 선암종, 부신피질암, 항문암, 성상세포종, 방광암, 뼈암, 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 어뢰육종, 안구암, 나팔관암, 위암(gastric cancer), 교모세포종, 두경부암, 카포시육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 골수이형성 증후군, 다발성 골수종, 신경아세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 복막암, 인두암, 전립선암, 신세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 피부암, 소장암, 위암(stomach cancer), 고환암, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 질암, 및 윌름스 종양을 포함한다.
- [0116] 특정 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포들은 액(liquid)암 또는 혈액암의 치료를 위해 제공될 수 있다. 그러한 암의 예들은, 예로서 백혈병(특히, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 만성 골수성 백혈병(CML), 및 만성 림프구성 백혈병(CLL) 포함), 림프종(특히, 호지킨 림프종 및 B-세포 림프종과 같은 비호지킨 림프종(예로서, DLBCL), T 세포 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 외투세포 림프종, 및 소림프구 림프종 포함), 다발성 골수종, 또는 골수이형성 증후군(MDS)을 포함한다.
- [0117] 또한, 암을 치료하는 방법들도 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 조작된 세포들(즉, 적어도 두개의 다중화 RNA 간섭 분자들을 인코딩하는 외생의 핵산 분자, 및 선택적으로 목적 단백질을 인코딩하는 추가의 핵산 분자를 포함하는 조작된 세포들)의 적정량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하고, 그에 의해 암과 관련된 적어도 하나의 증상을 개선하는 것을 포함한다. 치료가 고려되는 암들은, 제한되지는 않지만, 선암종, 부신피질암, 항문암, 성상세포종, 방광암, 뼈암, 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 어뢰육종, 안구암, 나팔관암, 위암(gastric cancer), 교모세포종, 두경부암, 카포시육종, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 중피종, 골수이형성 증후군, 다발성 골수종, 신경아세포종, 골육종, 난소암, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 복막암, 인두암, 전립선암, 신세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 피부암, 소장암, 위암(stomach cancer), 고환암, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 질암, 및 윌름스 종양을 포함한다.
- [0118] 추가의 특정 구체예들에 따르면, 혈액암을 치료하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 본 명세서에서 기재된 조작된 세포들의 적정량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하고, 그에 의해 상기 암과 관련된 적어도 하나의 증상을 개선하는 것을 포함한다.
- [0119] 대안적 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포들은 자가면역 질환의 치료용으로 제공될 수 있다. 치료될 수 있는 자가면역 질환들의 예시적 종류는, 제한되지는 않지만, 류마티스성 관절염, 전신홍반성 낭창, 염증성 장질환, 다발성 경화증(MS), 제1형 당뇨병, 근위축성 측색경화증(ALS 또는 루게릭병), 척수근위축증(SMA), 크론병, 길랭

바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증, 건선, 건선 관절염, 에디슨병, 강직성 척추염, 베체트병, 셀리악 병, 콕사키 심근염, 자궁내막증, 섬유근육통, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 가와사키병, 메니에레 병, 중증근무력증, 육식증, 강피증, 쇠그렌 증후군, 혈소판성 자반증(TTP), 케양성 대장염, 혈관염 및 백반증을 포함한다.

[0120] 또한, 자가면역 질환을 치료하는 방법들도 제공되며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 조작된 세포들의 적정량을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하고, 그에 의해 상기 자가면역 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 개선하는 것을 포함한다. 치료될 수 있는 예시적 자가면역 질환들은 상기에 열거되어 있다.

[0121] 다른 추가의 구체예들에 따르면, 상기 조작된 세포들은 감염성 질병의 치료용으로 제공될 수 있다. 본 명세서에서 "감염성 질병"은 상기 질병을 갖고 있는 대상 또는 유기체 내에 존재하거나 또는 상기 대상 또는 유기체 상에 존재하는 외부 유기체(병원체)에 의해 야기되는 임의 종류의 질병을 의미한다. 감염은 일반적으로 프리온, 박테리아 및 바이러스와 같은 미생물 또는 기생 미생물에 의해 야기되는 것으로 여겨지고, 대형 기생 생물 및 곰팡이와 같은 더 큰 유기체들을 통해서도 감염될 수 있다. 감염을 야기할 수 있는 유기체들은 본 명세서에서 "병원체"(그들이 질병을 야기하는 경우) 및 "기생충"(그들이 숙주 유기체를 희생시켜 이익을 얻음으로써, 명백한 질병이 존재하지 않더라도 해당 숙주 유기체의 생물학적 건강을 감소시키는 경우)으로도 언급되며, 그들은, 제한되지는 않지만, 바이러스, 박테리아, 원생생물(예로서, 말라리아원충, 피토프토라) 및 원생동물(예로서, 말라리아원충, 엔트아메바, 편모충, 톡소플라스마, 크립토스포리디움, 트리코모나스, 리슈마니아, 트리파노소마)(기생 미생물) 및 기생충들(회충과 같은 선충, 사상충, 구충, 요충 및 편충 또는 촌충과 같은 편형충 및 흡충)뿐 아니라, 절지동물 및 진드기와 같은 체외 기생충들을 포함한다. 반기생체, 즉 숙주 유기체를 오염시키거나 죽이는 기생 유기체들은 기생충이라는 용어에 포함되는 것으로 간주된다. 특정 구체예들에 따르면, 감염성 질병은 미생물 유기체 또는 바이러스 유기체에 의해 야기된다.

[0122] 본 명세서에서 사용된 "미생물 유기체"는 그램 양성 박테리아(예로서, 스타필로코커스 속, 엔테로코커스 속, 바실러스 속), 그램 음성 박테리아(예로서, 대장균 속, 에르시니아 속), 스피로헤타(예로서, 트레포네마팔리둠과 같은 트레포네마 속, 랩토스피라 속, 보렐리아 버그도르페리와 같은 보렐리아 속), 몰리큐트(즉, 마이코플라스마 속과 같은 세포벽이 없는 박테리아), 내산성 박테리아(예로서, 마이코박테리움 튜버쿨로섬과 같은 마이코박테리움 속, 노카르디아 속)와 같은 박테리아를 의미할 수 있다. 또한, "바이러스 유기체"는 진균류(효모류 및 곰팡이류, 예로서, 칸디다속(*Candida* sp.), 아스퍼질러스속(*Aspergillus* sp.), 콕시디오이데스속(*Coccidioides* sp.), 크립토코쿠스속(*Cryptococcus* sp.), 히스토플라스마속(*Histoplasma* sp.), 뉴모시스티스속(*Pneumocystis* sp.), 또는 트리코피톤속(*Trichophyton* sp.)), 원생동물(예로서, 플라즈모디움속(*Plasmodium* sp.), 엔타메바속(*Entamoeba* sp.), 지아디아속(*Giardia* sp.), 톡소플라스마속(*Toxoplasma* sp.), 크립토스포리디움속(*Cryptosporidium* sp.), 트리코모나스속(*Trichomonas* sp.), 레이슈마니아속(*Leishmania* sp.), 트리파노소마속(*Trypanosoma* sp.)) 및 고세균류를 포함한다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 감염성 질병을 야기하는 미생물 유기체의 추가적인 예들은, 제한되지는 않지만, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 포함), 장내구균(반코마이신 내성 장내구균(VRE), 병원균성 엔테로코커스 페칼리스(nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis*) 포함), 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*B.cereus*), 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*), 살모넬라속(*Salmonella* sp.) 및 리스테리아 뉴모필리아(*Legionella pneumophila*)와 같은 식품 병원균을 포함한다.

[0123] 본 명세서에서 동의어로 사용되는 "바이러스 유기체" 또는 "바이러스"는 유기체의 살아있는 세포들 내에서만 자기복제될 수 있는 작은 감염 인자들이다. 이들은 dsDNA 바이러스(예로서, 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 폭스바이러스), ssDNA 바이러스(예로서, 파보바이러스), dsRNA 바이러스(예로서, 레오바이러스), (+)ssRNA 바이러스(예로서, 피코르나바이러스, 토가바이러스, 코로나바이러스), (-)ssRNA 바이러스(예로서, 오르소믹소바이러스, 래브도바이러스), ssRNA-RT(역전사) 바이러스, 즉, 생존 주기에서 DNA 중간체와 함께 (+)센스 RNA를 갖는 바이러스(예로서, 레트로바이러스), 및 dsDNA-RT 바이러스(예로서, 헤파드나바이러스)를 포함한다. 또한 인간 대상을 감염시킬 수 있는 바이러스의 예들은, 제한되지는 않지만, 아데노바이러스, 아스트로바이러스, 헤파드나바이러스(예로서, B형 간염 바이러스), 헤르페스바이러스(예로서, 단순포진 바이러스 타입 I, 단순포진 바이러스 타입 2, 인간 시톰에갈로바이러스, 엡스테인-바르 바이러스, 수두 바이러스, 로세올로바이러스), 파포바이러스(예로서, 인간 유두종 바이러스 및 인간 폴리오마 바이러스), 폭스바이러스(예로서, 바리올라바이러스, 백시니아 바이러스, 스몰폭스 바이러스), 아레나바이러스, 부니아바이러스, 칼시바이러스, 코로나바이러스(예로서, SARS 코로나바이러스, MERS 코로나바이러스, SARS-CoV-2 코로나바이러스 (COVID-19의 기병성 인자)), 필로바이러스(예로서, 에볼라 바이러스, 마버그 바이러스), 플라비바이러스(예로서, 황열 바이러스, 웨스

턴 닐레 바이러스, 뎡기열 바이러스, C형 간염 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 뇌염 바이러스), 오르소믹소바이러스(예로서, A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스 및 C형 인플루엔자 바이러스), 파라믹소바이러스(예로서, 파라인플루엔자 바이러스, 루블라바이러스(mumps), 모빌리바이러스(홍역), 인간 호흡기 세포융합 바이러스와 같은 페렘 바이러스), 피코나바이러스(예로서, 폴리오바이러스, 리노 바이러스, 콕사키 A 바이러스, 콕사키 B 바이러스, A형 간염 바이러스, 에코바이러스 및 엔테로바이러스), 레오 바이러스, 레트로바이러스(예로서, 인간 면역결핍 바이러스 및 인간 T 림프구 친화성 바이러스(HTLV)와 같은 렌티바이러스), 래브도바이러스(예로서, 광견병 바이러스) 또는 토가바이러스(예로서, 풍진 바이러스)를 포함한다. 특정 구체예들에 따르면, 치료되어질 상기 감염성 질병은 HIV는 아니다. 대안적 구체예들에 따르면, 치료되어질 상기 감염성 질병은 레트로바이러스에 의해 야기된 질병은 아니다. 대안적 구체예들에 따르면, 치료되어질 상기 감염성 질병은 바이러스성 질병은 아니다.

[0124] 다시 말하면, 본 명세서에 기재된 조작된 세포들(즉, 두개 이상의 다중화 RNA 간섭 분자들을 인코딩하는 외생의 핵산 분자를 포함하고, 선택적으로 목적 단백질을 인코딩하는 추가의 핵산 분자를 포함하는 조작된 세포들)의 적정 투여량을, 이를 필요로 하는 대상에게 투여하여, 적어도 하나의 증상을 개선하는 것을 포함하는, 감염성 질병의 치료 방법들이 제공된다. 특히 고려되는 미생물성 또는 바이러스성 감염성 질병들은 상기에서 열거한 병원체들에 의해 야기되는 질병들이다.

[0125] 의약으로서 사용되기 위해 제공되는 상기 조작된 세포들은 동종이계 요법들에 사용되기 위해 제공될 수 있다. 즉, 상기 조작된 세포들은 치료법의 선택사항으로서 동종이계 ACT가 고려되는 치료에 사용되기 위해 제공된다(이 경우, 다른 대상으로부터의 세포들이 이를 필요로 하는 대상에게 제공된다). 특정 구체예들에 따르면, 동종이계 요법에서, 적어도 하나의 상기 RNA 간섭 분자가 TCR을 겨냥(가장 특별히는, TCR 복합체의 서브유닛을 겨냥)할 것이다. 대안적 구체예들에 따르면, 상기 세포들은 자가 요법, 특히 자가 ACT 요법(즉, 해당 환자로부터 획득된 세포들을 이용)에 사용되기 위해 제공된다.

[0126] 본 명세서에서, 본 발명에 따른 세포들 및 방법들에 대해 특정 구체예들, 특정 구성들 및 특정 물질들 및/또는 특정 분자들이 논의되었지만, 본 발명의 범위 및 기술사상을 벗어남이 없이, 그 형태 및 상세사항에 있어서 다양한 변화들 및 변형들이 이루어질 수 있음을 이해하여야만 한다. 하기의 실시예들은 특정 구체예들을 더욱 잘 예시하기 위해 제공되며, 이들은 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명은 청구범위에 의해서만 제한된다.

[0127] **실시예**

[0128] **실시예 1. 하향조절되는 TCR에서 miRNA 스캐폴드 길이의 평가**

[0129] 동일한 바이러스 발현 벡터 내에서 여러 shRNA들의 성공적인 다중화를 위해 miRNA 기반 스캐폴드가 가능한한 작은 것이 바람직하다. 이는, 상기 벡터의 전체 크기에 크게 영향을 미치지 않으면서 다수의 shRNA들의 조합을 가능하게 할 것이다. 짧은 miRNA-기반 shRNA 스캐폴드들이 여전히 타겟 녹다운에 효과적인지의 여부를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 miRNA-196a2 스캐폴드(SMARTvector™ 마이크로-RNA 조작 스캐폴드(Horizon Discovery, Lafayette, CO, USA))로부터 이미 확인된 CD247(TCR 서브유닛) 타겟팅 shRNA를 발현하였고, 이 경우 새로운 구조물들은 miRNA 스캐폴드 길이가 서로 달랐다. 오리지널 구조물은 263개 핵산을 가지고 있고, 두개의 짧은 구조물들은 각각 150개 또는 111개 핵산들을 사용하였다. 모든 바이러스 벡터들은, 절단된 CD19 마커로 표시된 바와 같이, 그 정도는 다르지만(도 1), 모두 일차 T 세포들을 도입할 수 있었다. 그러나, TCR 또는 CD3E 단백질 녹다운의 정도는 세계의 구조물 모두가 비슷하였는데, 이는 가장 작은 miRNA-기반 shRNA 스캐폴드 역시 더 긴 miRNA 스캐폴드와 비슷한 정도로 TCR/CD3 복합체 발현을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

[0130] **실시예 2. 다양한 CD52 타겟팅 shRNA들의 스크리닝**

[0131] 다양한 CD52 타겟팅 shRNA들의 효능을 비교할 수 있도록 하기 위하여, 이미 CD247에 적용되었던 구조물과 동일한 골격구조를 갖되, 단지 shRNA의 타겟팅 서열만 교체되고, CD247-타겟팅 서열 대신에 CD52-타겟팅 서열을 대체한 구조물들을 사용하였다. 일차 T 세포들 내로 shRNA들을 전달하기 위해 레트로바이러스 벡터가 사용되었고, 이는 절단된 CD18(tCD19) 마커에 의해 모니터링될 수 있었다. 다양한 CD52-타겟팅 shRNA들이 레트로바이러스 벡터의 miRNA 스캐폴드 내로 클로닝되었다. CD52 녹다운의 정도는 세포 배양 8일째에 분석되었다. CD19-발현에 의해 측정된 바와 같이(도 2), 모든 구조물들은 일차 T 세포들에 형질도입될 수 있었다. 그러나, CD52 녹다운의 정도는 시험된 4개의 shRNA들 마다 달랐다. CD52 발현을 녹다운시키는 것을 고려하면, shRNA-3이 가장 효과적이었고, shRNA-1 및 shRNA-2가 그 뒤를 이었다. 대조적으로, shRNA-4는 CD52 발현에서 어떠한 감소도 나타내지 않

았다(도 2).

[0132] 이 shRNA의 녹다운 효능이 서로 다른 공여체에 따라 달라질 것인지의 여부를 분석하기 위하여, 3개의 다른 공여체들로부터의 T 세포들에 Mock 구축물 또는 CD52 shRNA-3 발현 구축물이 형질도입되었다(도 3). 3개의 공여체 모두에서, shRNA-3은 일관되고 상당한 CD52 녹다운을 나타내었고(도 3), 이는 동일한 shRNA는 공여체와 무관하게 일관된 CD52 녹다운을 야기한다는 것을 의미한다.

[0133] **실시예 3. CRISPR/Cas9 매개 CD52 녹아웃에 대한 gRNA들의 스크리닝**

[0134] CD52 및/또는 TCR/CD3 복합체 발현 억제에 대한 긍정적 제어를 이루기 위하여, CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 각각의 녹아웃 T 세포들을 생성하였다. 다양한 가이드 RNA(gRNA)들을 설계하고, CD52-결핍 T 세포들을 효과적으로 발생시킬 gRNA들을 동정하기 위해 분석하였다(도 4). 세개의 gRNA들 중 두개는 CD52 녹아웃 세포들을 생성할 수 있었고(도 4에서 CD52.1.AA로 표시된 gRNA-1, 및 도 4에서 CD52.2.AE로 표시된 gRNA-3), CD52-결핍 세포들의 발생 빈도는 CD52 gRNA-1의 경우에 약간 더 높았다.

[0135] **실시예 4. 타겟 녹다운에 대한 miRNA의 효과**

[0136] DROSHA 복합체에 의한, 전사된 RNA로부터 miRNA의 효과적인 프로세싱은 효과적인 타겟 녹다운을 위한 중심축이다. 본 발명자들의 이전의 데이터는, miRNA 기반 shRNA들은 효과적으로 CAR-인코딩 벡터로 공동발현될 수 있고, 상기 벡터로부터의 miRNA 시스템에 의해 프로세싱될 수 있음을 보여주었다. 상기 동일한 벡터로부터 다수의 miRNA 기반 shRNA들(예로서, 2, 4, 6, 8개 ...)을 공동발현할 수 있는 CAR 발현 벡터를 생성하는 것이 더 바람직할 것이다. 그러나, 이전의 연구들은 다수의 miRNA 기반 shRNA들의 공동발현은 shRNA 활성의 손실을 초래한다는 것을 보여주었다. 따라서, 단일 발현 벡터로부터의 다수의 타겟들을 녹다운시키기 위해, 효과적인 miRNA 프로세싱이 중요하다.

[0137] 두개의 공동발현된 shRNA들의 활성을 최적화하기 위해, 본 발명자들은 크기 뿐만 아니라 miRNA 기반 shRNA들 사이의 링커 서열 및 miRNA 스캐폴드가 shRNA 활성에 영향을 미칠 것으로 가정하였다. shRNA 프로세싱을 최적화하기 위해, 본 발명자들은 두개의 타겟 유전자들인 CD247(CD3 ζ) 및 CD52의 녹다운에 대한 다양한 shRNA 링커들의 영향을 분석하였다. 천연 유래의 인간 miR-17-92 클러스터로부터 파생된 스페이서 서열들에 기초한 5개의 서로 다른 스페이서들을 설계하였다. 상기 5개의 서로 다른 스페이서들은, BCMA CAR의 관점에서, CD247과 CD52 shRNA 사이에 클로닝되었다. 대조군으로서 tCD34(Mock) 및 BCMA-CD247 shRNA 벡터를 사용하여, T 세포들에 상기 서로 다른 구축물들을 형질도입하였고; 그 결과는 도 6에 나타내었다. 멀티플렉스 1은 111bp CD247 shRNA와 111bp CD52 shRNA 사이에 스페이서가 포함되어 있지 않았다. 멀티플렉스 2에는 miR-17-92 클러스터 내의 miR-17과 miR-18a 사이에 43bp의 천연 유래 스페이서가 포함되었다. 멀티플렉스 3은 miR-17-92 클러스터 내의 miR-19a와 miR-20a 사이의 스페이서 영역에 대응되는 92bp 스페이서를 포함하였다. 멀티플렉스 4는 miR-17-92 클러스터 내의 miR-20a와 miR-19b1 사이의 스페이서 영역에 대응되는 56bp 스페이서를 포함하였다. 멀티플렉스 5는 29bp의 랜덤 TA 풍부 스페이서 영역을 포함하였다. shRNA를 가진 모든 구축물들은 채취 시에 비슷하게 낮은 형질도입 효율을 나타내었다. 또한, BCMA CAR의 발현은 다수의 shRNA들의 발현에 의해 단지 약간의 영향만 받았다(도 6). CD52 및 TCR 녹다운의 분석 결과, 모든 구축물들은 비슷한 수준으로 TCR 및 CD52 발현을 감소시킬 수 있음을 보여주었다. 두개의 헤어핀들 사이에 스페이서가 없는 제1 멀티플렉스 구축물만이 다른 구축물들에 비해 약간 낮은 TCR(CD52에 대해서는 아님) 녹다운 활성을 나타내었으나, 발현을 감소시키는데에는 여전히 매우 양호하게 작용하였다(도 6).

[0138] **실시예 5. 다중화된 shRNA와 단일 shRNA의 비교**

[0139] 다음으로, 본 발명자들은 CD247 및 CD52에 대한 단일 shRNA들의 발현 효과와 두개의 shRNA들을 다중화한 효과를 직접 비교해 보기로 하였다. RNA 발현 분석은 다중화된 shRNA 구축물들은 단일 shRNA들과 같이 CD52 또는 CD247을 하향조절하는데 효과적이었음을 나타내었다(도 7).

[0140] 다른 대조군으로서, 본 발명자들은 두개의 다른 gRNA들을 사용하여 CD52와 CD247을 동시에 타겟팅하는 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하였다. 회수 시에, CD247 shRNA 또는 gRNA를 포함하는 세포들은 추가의 분석 전에 TCR-양성 세포들이 결핍되어 있었다. 단일 또는 다중화 shRNA들이 형질도입된 세포들의 단백질 발현을 비교하기 위하여, TCR 및 CD52 발현은 유세포 분석법으로 분석되었다(도 8 및 도 9). 단일 CD247 shRNA는 TCR의 발현을 감소시킬 수 있었다(도 8 및 도 9). TCR 표면 발현의 감소는 CRISPR/Cas9에 의해 매개된 CD247의 녹아웃과 대등하였다. 유사하게, 단일 CD52 shRNA는 CD52 발현을 감소시킬 수 있었다(도 8 및 도 9). 서로 다른 링커들을 갖는 두개의 다중화 shRNA 구축물들(도 4 참조)은 둘다 단일 shRNA와 같은 정도의 TCR 녹다운을 나타내었다. 유사

하게, CD52 발현은 단일 shRNA 구축물 또는 다중화 shRNA 구축물들에 의해 동일한 정도로 감소되었다(도 8 및 도 9).

[0141] **실시예 6. CAR 발현 및 세포능(cell potency)**

[0142] CAR 발현 및 기능성에 대한 하나 또는 다수의 shRNA의 공동발현 효과를 분석하기 위하여, BCMA-CAR 발현이 유세포 분석으로 분석되었다. 세포들은 BCMA-Fc 융합 단백질로 염색된 후, 2차 PE-결합 항체로 염색되었다. 도 10에 도시된 바와 같이, CAR의 발현은 모든 그룹들에서 비슷하였고, 이는 이들 다중화 shRNA들이 CAR 발현의 수준에 영향을 미치지 않음을 보여준다. 또한, 본 발명자들은 BCMA-양성 암 세포주들인 RPMI-8226, OPM-2 및 U226에 대한 BCMA-CAR 발현 세포들의 기능적 활성을 분석하였다(도 10). 이를 위하여, 상청액 중의 IFN γ 수준을 분석하기 전에, T 세포들은 암 세포들과 함께 24시간 동안 공동배양되었다. T 세포들 단독으로는 IFN γ 를 전혀 생성하지 못하였지만, BCMA-발현 암 세포들과 공동배양한 결과, T 세포들의 모든 그룹에 의해 비슷한 수준의 IFN γ 생성이 이루어졌다. 따라서, 하나 또는 다수의 shRNA들의 공동발현은 암세포주들에 대한 CAR의 발현 또는 CAR-T 세포들의 기능적 활성에 영향을 미치지 않는다.

[0143] **실시예 7. 유사분열촉진성 자극에 대한 CAR T세포들의 기능적 반응**

[0144] 다음으로, 유사분열촉진성 TCR 자극에 대한 CAR-T 세포들의 반응성을 분석하였다. 이를 위하여, T 세포들은 항-CD3 항체(클론 OKT3)의 농도를 증가시키면서 자극되었고, 24시간 후에 IFN γ 생성이 측정되었다. Mock이 형질도입된 세포들은 OKT3 활성화 후에 고수준의 IFN γ 를 생산하였다. 유사하게, BCMA-CAR 단독 또는 CD52 shRNA와의 조합 하의 공동발현은 TCR 활성화 자극에 반응하는 T 세포들의 성능을 감소시키지 않았다. 그러나, 단일 또는 다중화 CD247 shRNA의 공동발현은 CRISPR/Cas9 CD247 게놈 편집 대조군 세포들의 수준에 대한 TCR의 기능적 반응을 상당히 감소시켰다(도 11). 따라서, 다중화 shRNA들은 단일 shRNA 대조군 및 게놈 편집된 T 세포들만큼 TCR 기능을 억제하는데 효과적이다.

[0145] **실시예 8. CD52의 기능적 억제**

[0146] 다음 단계에서, 본 발명자들은 단일 또는 다중화 CD52 shRNA의 발현이 항-CD52 항체의 존재 하에 T 세포들의 보체 의존성 사멸에 어떻게 영향을 미치는지를 분석하였다. 이를 위하여, T 세포들은 항-CD52 항체(알렘투주맵) 또는 대조군 IgG 항체의 존재 하에 보체와 함께 배양되었다. 4시간 후에, 세포 수들이 확인되었다. Mock 및 BCMA-CAR가 형질도입된 T 세포들은 알렘투주맵의 존재 하에 보체에 의해 효과적으로 타겟팅되었다(도 12). 그러나, 단일 및 다중화 CD52 shRNA 모두 CD-52에 의해 매개된 사멸을 방지할 수 있었다.

[0147] **실시예 9. 두개 이상의 타겟들의 다중화**

[0148] 다음으로, 4개의 shRNA들의 다중화 가능성이 분석되었다. 이를 분석하기 위하여, 제2 세대 CD19 CAR 및 렌티바이러스 벡본과 반복된 miR-196a2 스캐폴드를 사용하는 선택 마커와 함께, β 2m, DGK, CD247 (CD3 ζ) 및 CD52를 타겟팅하는 단일 또는 다중화 CD52 shRNA를 저캣(Jurkat) 세포에 형질도입하였다. 형질도입 후 7일 째에 마커-특이적 자성 비드들을 사용하여 단일 단계 강화(enrichment)가 수행되었다. 세포들은, qRT-PCR에 의해 shRNA 타겟들의 발현에 대해 분석되었다. 4개의 타겟들의 전사 발현에 대한 shRNA 매개성 하향조절은 다중화 shRNA와 각각의 단일 shRNA 간에 서로 동등하였다(도 13).

[0149] 저캣 세포들에 이어, miR-106a-363 클러스터에 도입된 CD247, β 2m 및 CD52를 타겟팅하는 3 \times shRNA들 또는 6 \times shRNA들을 포함하는 제2 세대 CD19 CAR를 인코딩하는 레트로바이러스 벡터들을 일차 T 세포들에 형질도입하였다(도 14). 요약하면, 106a-363miRNA 클러스터의 마지막 세개의 miR들(miR-19b2, miR-92a2 및 miR-363)에 도입된, CD247, B2M 및 CD52를 타겟팅하는 3개의 shRNA들 또는 상기 클러스터의 6개 miR 스캐폴드 내의 동일한 세개의 유전자들을 타겟팅하는 6개의 shRNA들(이 경우, CD247을 타겟팅하는 두개의 shRNA들은 서로 다름)과 함께, 제2 세대 CD19-지향 CAR를 인코딩하는 레트로바이러스 벡터들, 절단된 CD34 마커를, 건강한 공여자로부터의 T 세포들에 형질도입하였다. 간략하게, shRNA들은 6-플렉스, 3-플렉스로 발현되었고, 대조군의 경우 shRNA(tCD34)가 발현되지 않았다. 형질도입 후 2일째에, 세포들은 CD34-특이적 자성 비드들을 사용하여 강화되었고, 추가로 6일 동안 IL-2(100IU/mL) 내에서 증폭되었다. CD247, B2M 및 CD52의 mRNA 발현은 하우스-키팅 유전자로서 사이클로필린을 사용하여 qRT-PCR에 의해 분석되었다.

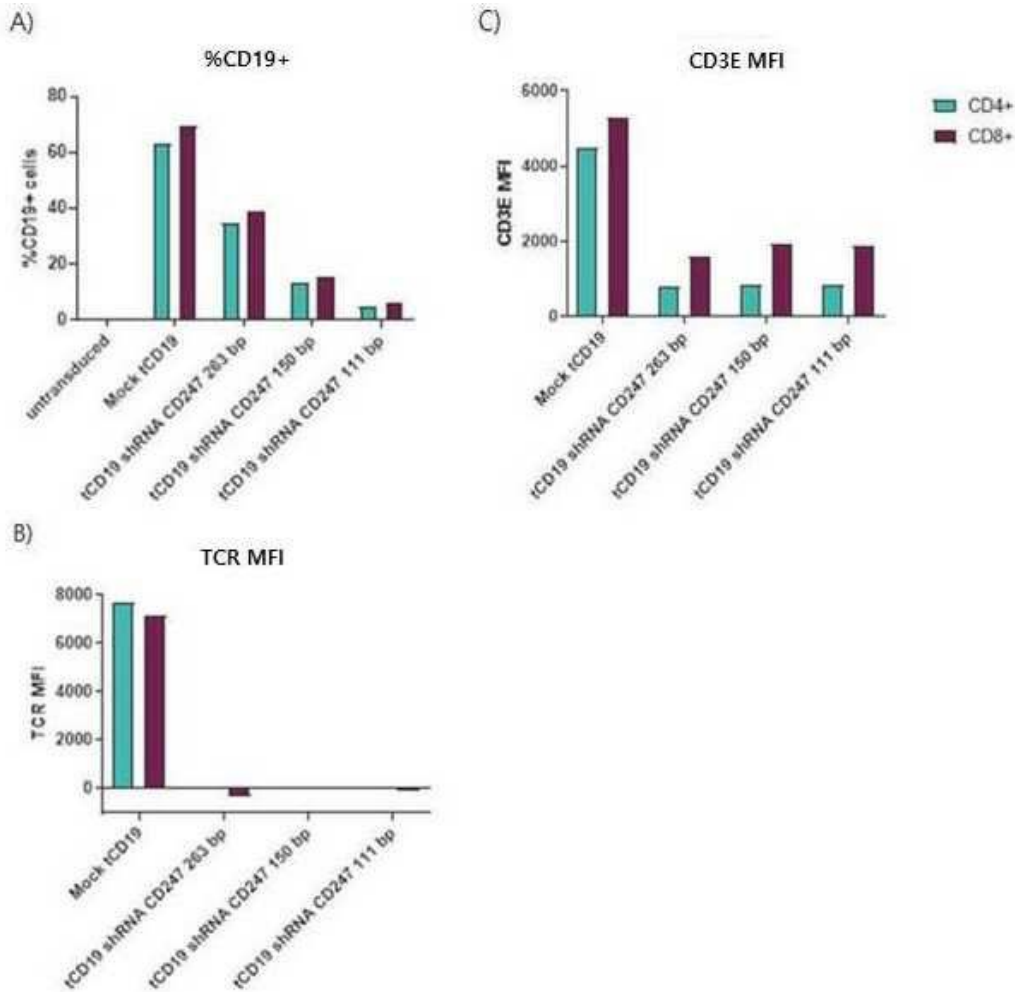
[0150] 다중화 shRNA들은 타겟팅된 모든 유전자들에 대해 효과적인 RNA 녹다운 수준을 달성하였다. 6개의 다중화 shRNA들(각각의 단백질 타겟에 대해 두개의 shRNA)의 도입은 세개의 다중화 shRNA들(각각의 단백질 타겟에 대해 하나의 shRNA)에 비해 더 높은 수준의 RNA 녹다운을 이루었다(도 14).

[0151] 실시예 10. iPSC 세포들에서의 타겟들의 멀티플렉스 녹다운

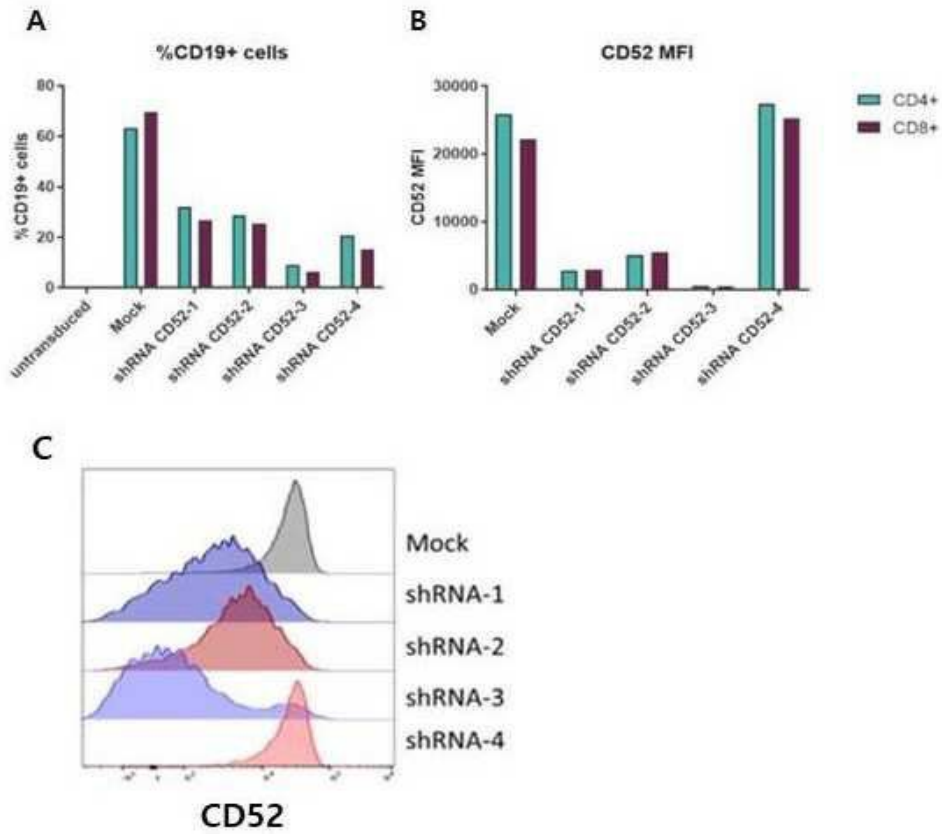
[0152] 다른 면역 세포들에서의 다중화 RNA 간섭 분자들의 녹다운을 탐색하기 위하여, iPSC에서 다중화가 분석되었다. 긴 링커(41bp) 또는 최소 링커(6bp)에 의해 분리된 ($\beta 2m$ 및 DGKa에 대한) 두개의 shRNA들은 인간 iPSC 세포주 SCiPS-R1에서 발현되었다. 형질도입은 $50\mu l$ 또는 $500\mu l$ 의 바이러스 상청액으로 수행되었다. shRNA가 형질도입되지 않은 세포들과 비교 시, 다중화된 shRNA들은 링커 크기 또는 사용된 바이러스 상청액의 부피와 관계없이 효과적인 RNA 녹다운 수준을 달성하였다(도 15, 도 16).

도면

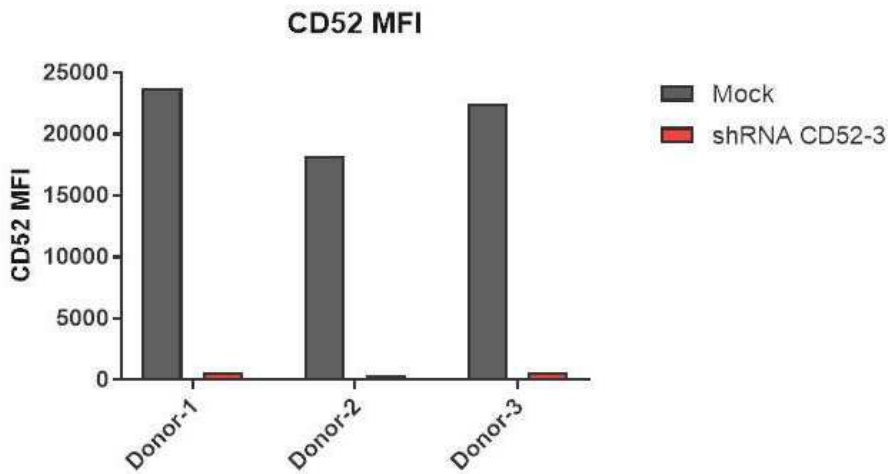
도면1



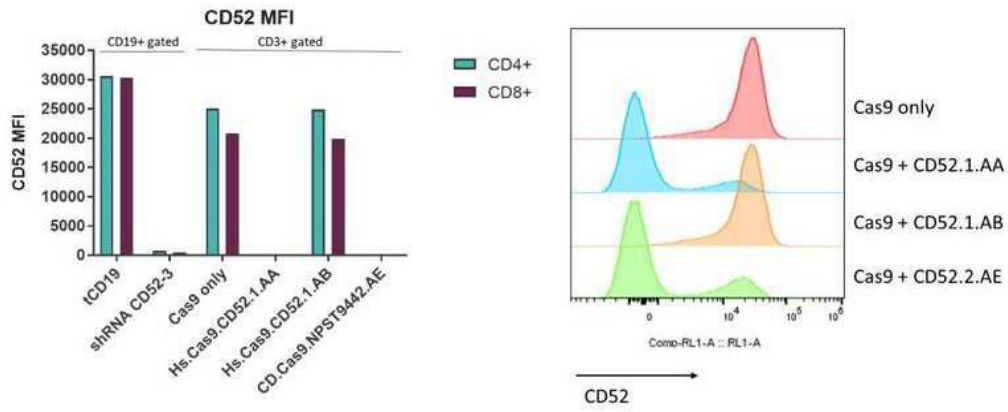
도면2



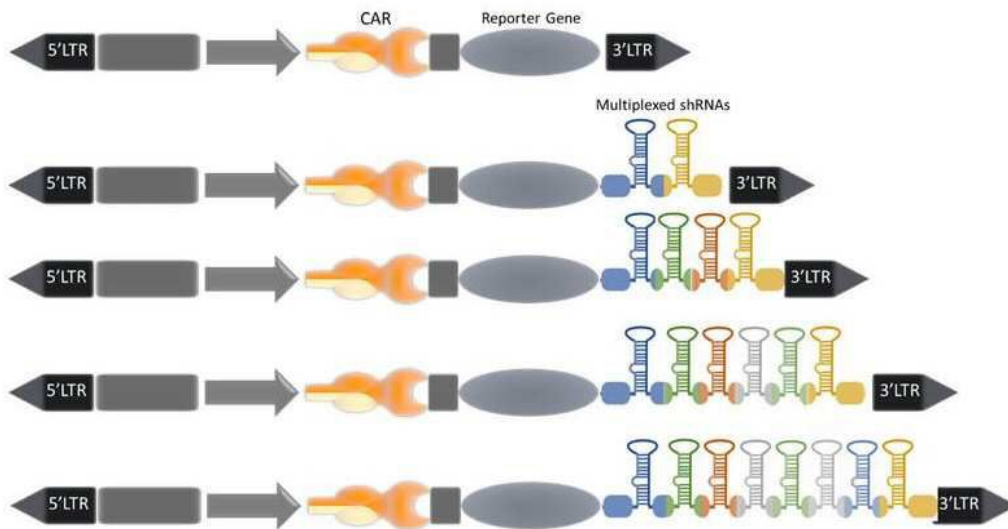
도면3



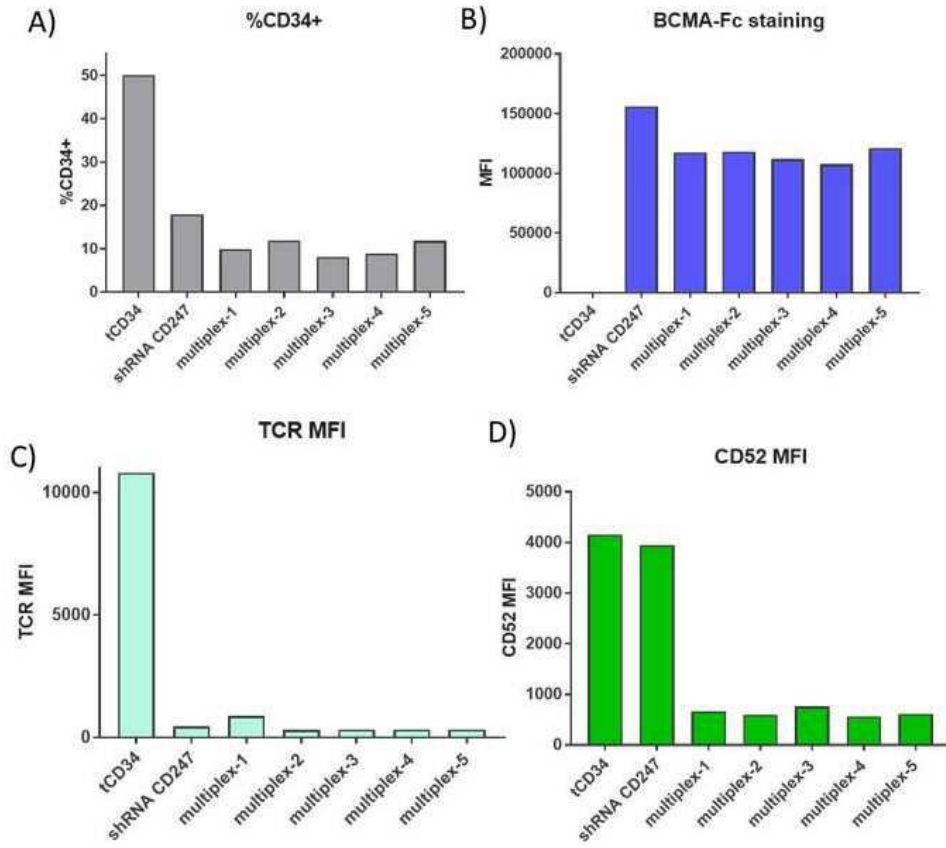
도면4



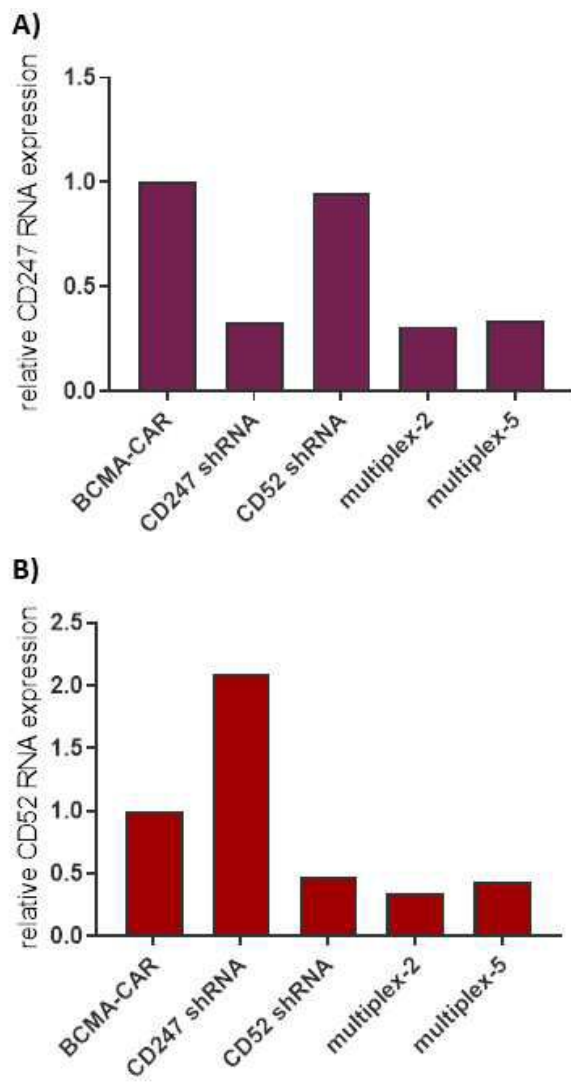
도면5



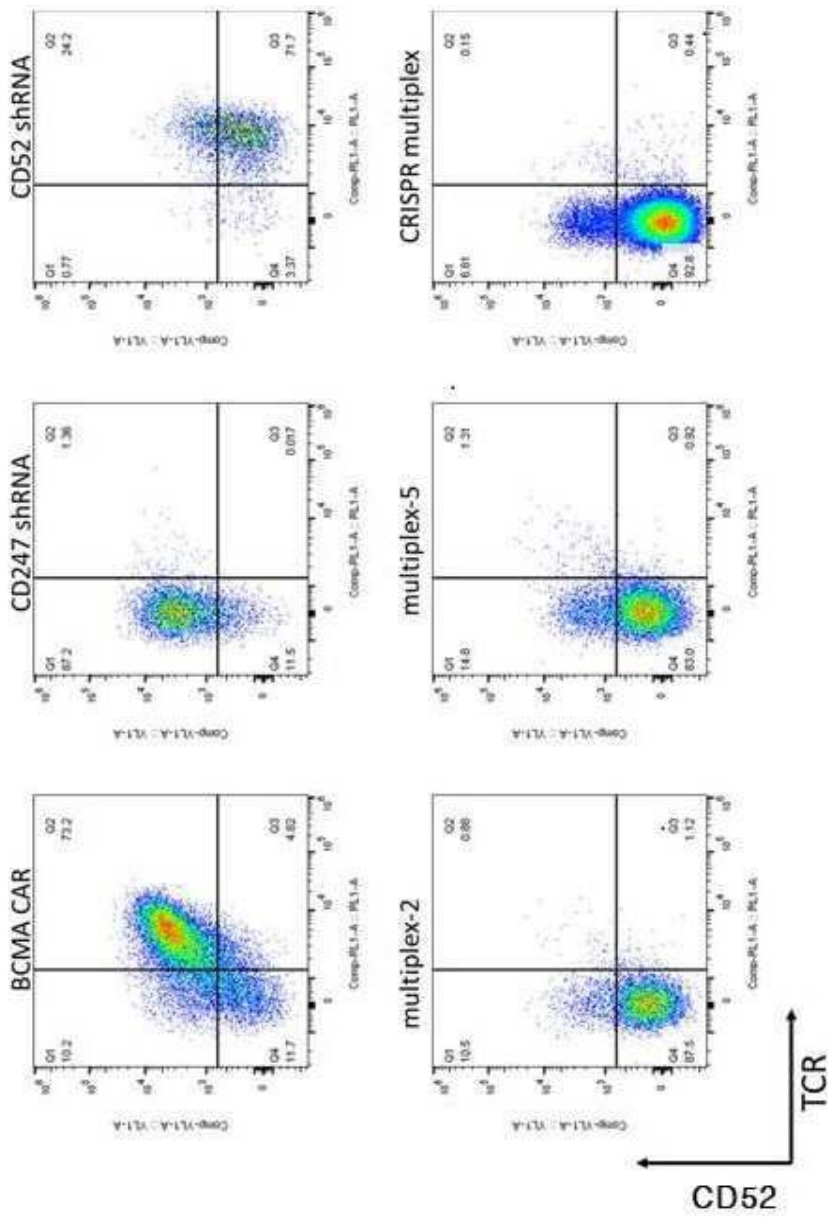
도면6



도면7

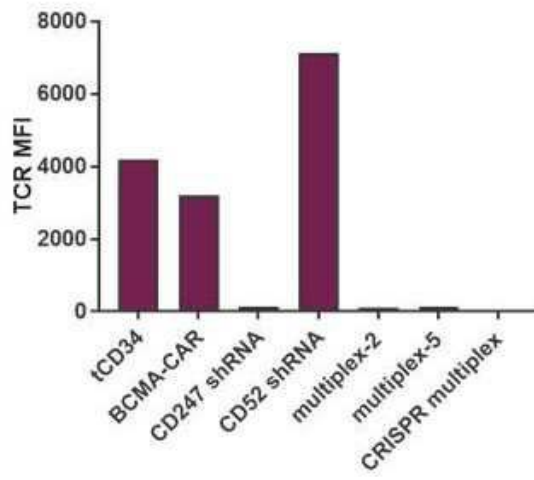


도면8

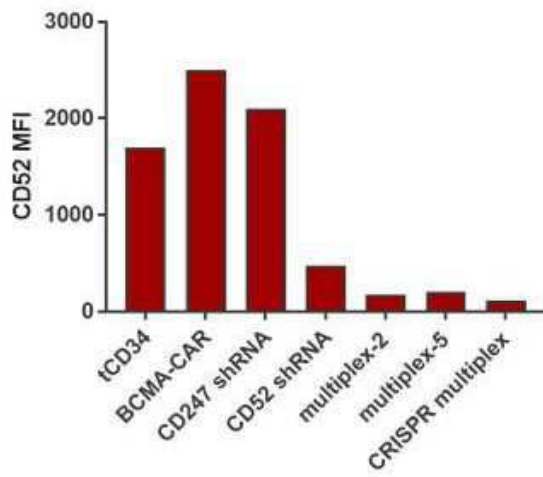


도면9

A)

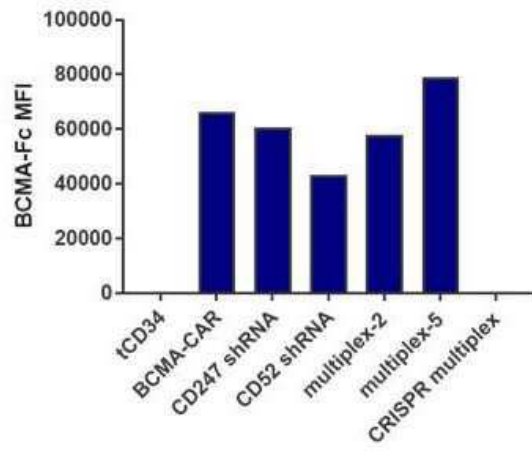


B)

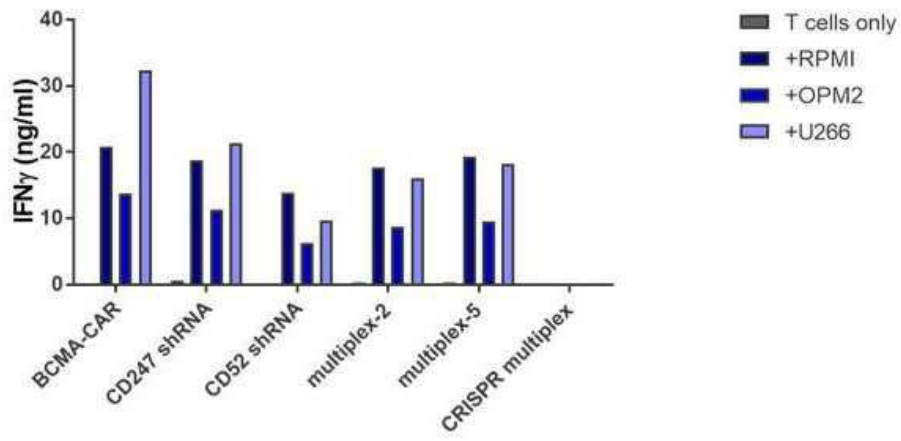


도면10

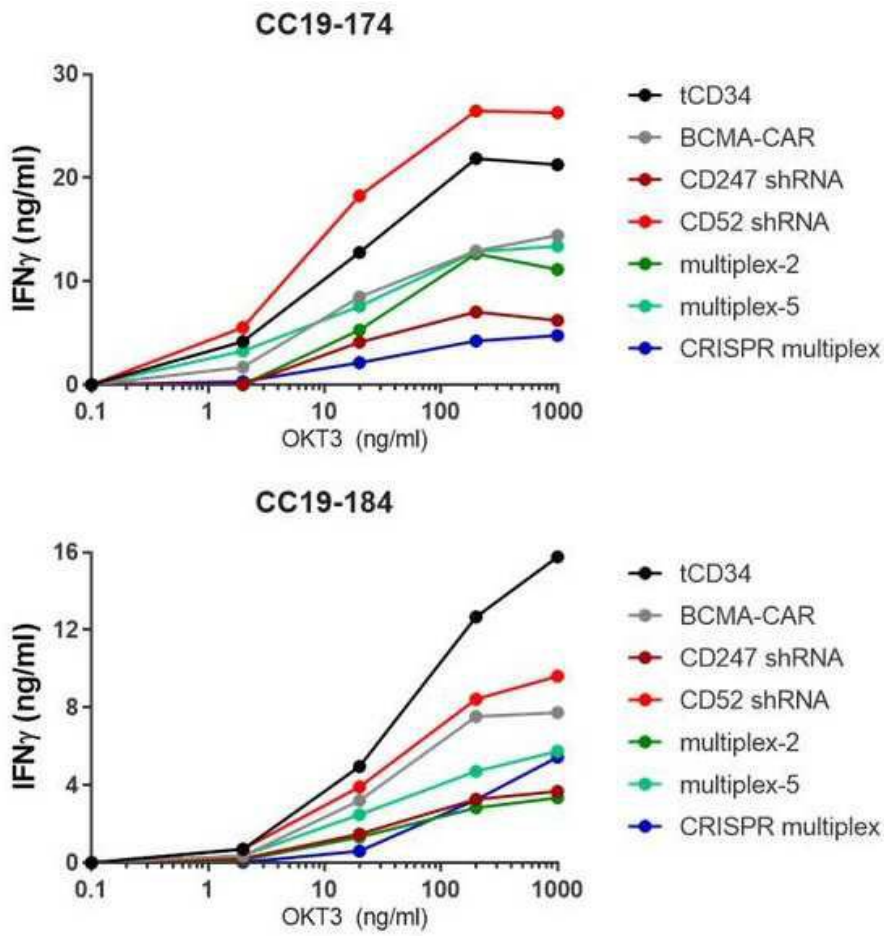
A)



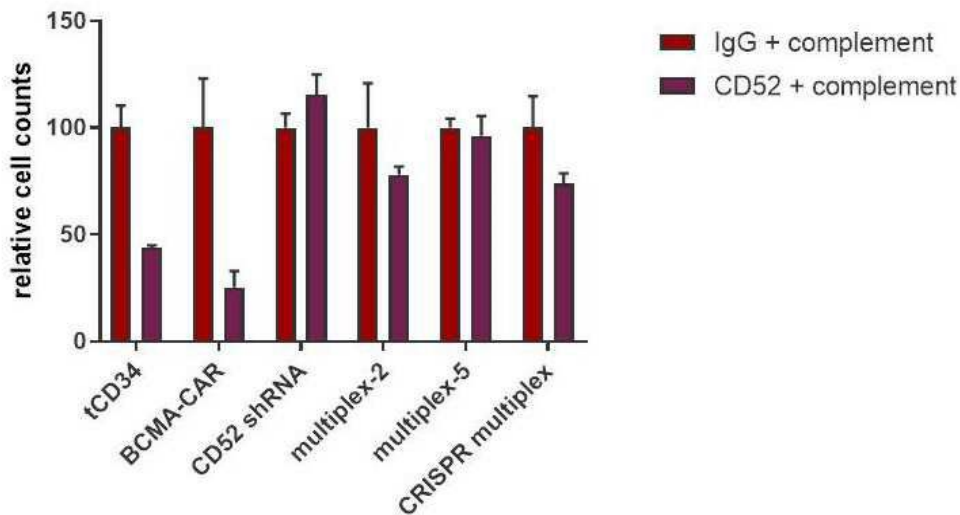
B)



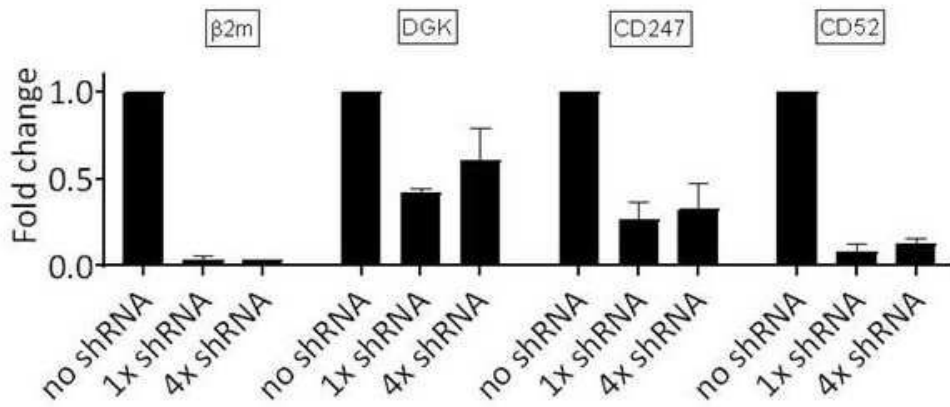
도면11



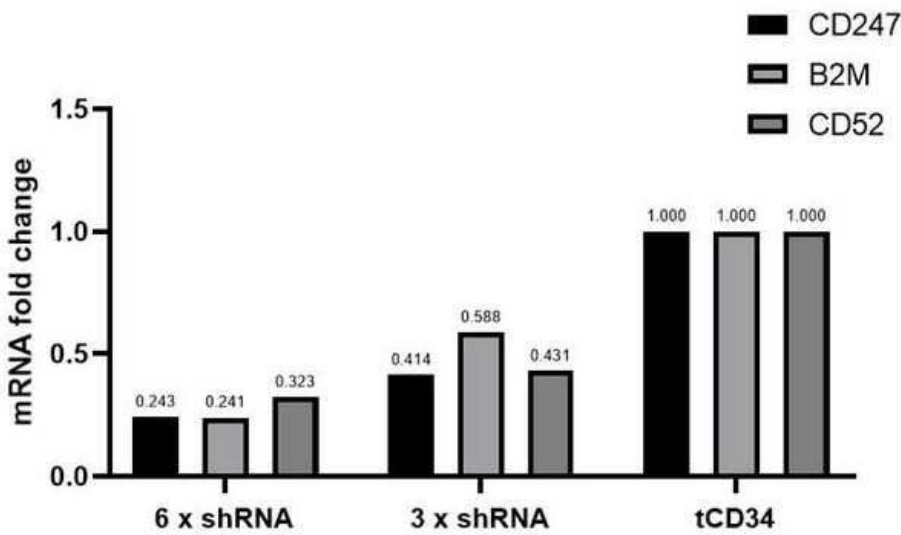
도면12



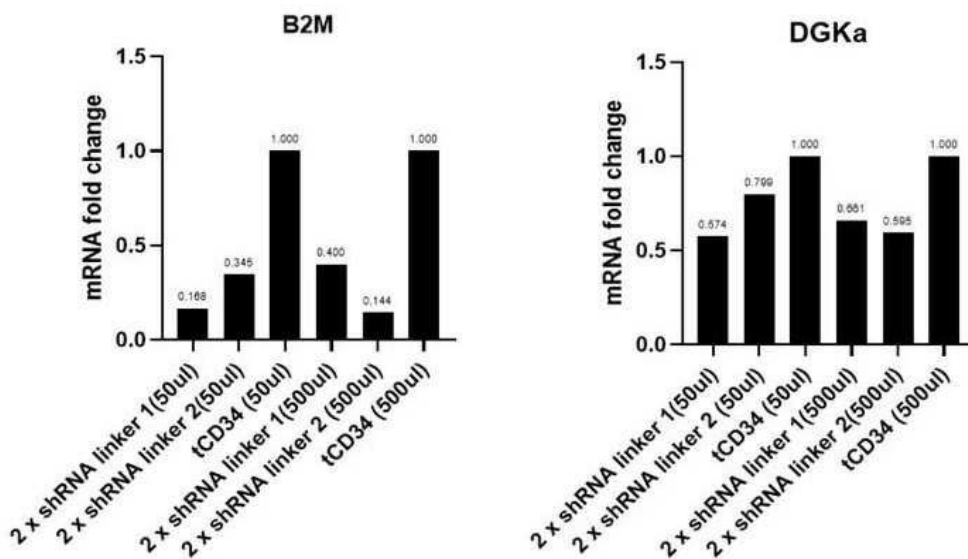
도면13



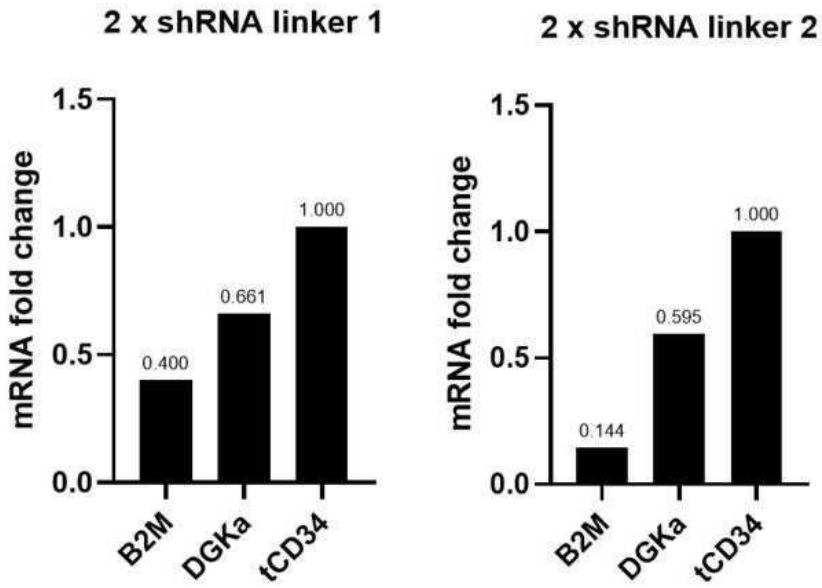
도면14



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Celyad

<120> Cells with multiplexed inhibitory RNA

<130> P54025WO/DJC/JG

<150> EP19172389.9

<151> 2019-05-02

<160> 2

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 1

<400> 1

caagttgggc tttaaagctt gcaggcctg ctgatgtga g

41

<210> 2

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 2

<400> 2

aagctt

6