(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0011295
(43) 공개일자 2023년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
*A61K 45/06* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
*A61P 35/02* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
*C07K 16/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 39/001117* (2018.08)
*A61K 39/395* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7039386
(22) 출원일자(국제) 2021년04월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년11월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/027152
(87) 국제공개번호 WO 2021/211628
국제공개일자 2021년10월21일
(30) 우선권주장
63/009,569 2020년04월14일 미국(US)

(71) 출원인
**포세이다 테라퓨틱스, 인크.**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 타운 센터 드라이브 9390 스위트 200
(72) 발명자
**오스터택 에릭 엠**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 타운 센터 드라이브 9390 스위트 200 포세이다 테라퓨틱스, 인크. 내
**스피어 매튜**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 타운 센터 드라이브 9390 스위트 200 포세이다 테라퓨틱스, 인크. 내
(74) 대리인
**김진희, 김태홍**

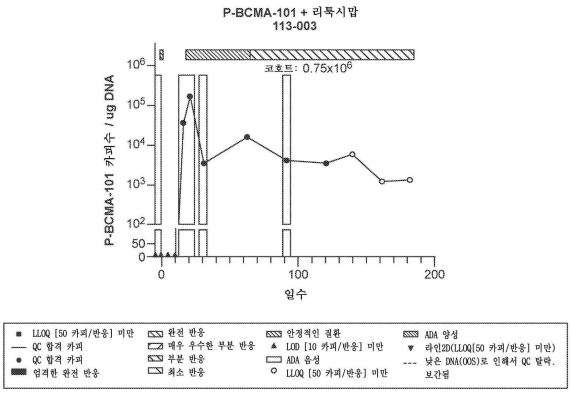
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료에 사용하기 위한 조성물 및 방법**

## (57) 요 약

Centyrin을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)(즉, CARTyrin), 본 개시내용의 CAR 및 CARTyrin을 코딩하는 트랜스포존, 본 개시내용의 CAR 및 CARTyrin을 발현하도록 변형된 세포, 또한 이의 제조 방법 및 입양 세포 요법을 위해서 이를 사용하는 방법이 개시된다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
***A61K 45/06*** (2013.01)
***A61P 35/00*** (2018.01)
***A61P 35/02*** (2018.01)
***C07K 16/2878*** (2013.01)
***C07K 16/2887*** (2013.01)
***C07K 16/30*** (2013.01)
*A61K 2039/5156* (2013.01)
*A61K 2039/5158* (2013.01)
*A61K 2300/00* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

암을 치료하는 방법으로서, 대상체에게

키메라 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)를 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 제1 조성물로서, CAR은 B-세포 성숙 항원(BCMA: B-cell maturation antigen)에 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인을 포함하는, 제1 조성물; 및

항-CD20 작용제를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 조성물이 투여되지만 제2 조성물이 투여되지 않은 환자와 비교할 때 환자에서 제1 조성물에 대한 항-약물 항체(ADA: anti-drug antibody) 반응의 적어도 50% 감소가 존재하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 제1 조성물이 투여되지만 제2 조성물이 투여되지 않은 환자와 비교할 때 환자에서 제1 조성물의 지속성의 적어도 75% 증가가 존재하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 제1 조성물이 투여되지만 제2 조성물이 투여되지 않은 환자와 비교할 때 환자에서 제1 조성물의 지속성의 적어도 90% 증가가 존재하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 지속성의 척도는 혈장 농도 곡선의 곡선 하 면적(AUC: area under the curve)인, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 림프구제거제를 포함하는 제3 조성물을 더 포함하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 아이오딘 i131 토시투모맙, 오비누투주맙 또는 이브리투모맙인, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙인, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 인식 도메인은 Centyrin, scFv, 단일 도메인 항체, VH 또는 VHH를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 항원 결합 도메인은 Centyrin을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

### 청구항 11

제9항에 있어서, 항원 결합 도메인은 VH를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물은 다회 주입으로서 투여되고, 다회 주입은 제1 주입 및 제2 주입으로 분할된 총 용량을 포함하고,

i) 제1 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고;

ii) 제2 주입은 총 용량의 약 2/3를 차지하고, 제1 주입 적어도 10일 후에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물은 다회 주입으로서 투여되고, 다회 주입은 제1 주입, 제2 주입 및 제3 주입으로 분할된 총 용량을 포함하고,

i) 제1 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고;

ii) 제2 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고, 제1 주입 적어도 10일 후에 투여되고;

iii) 제3 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고, 제2 주입 적어도 10일 후에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 14**

제12항 또는 제13항에 있어서, 제1 주입과 제2 주입 사이의 시간 또는 제2 주입과 제3 주입 사이의 시간은 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 및/또는 제3 조성물은 순차적으로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물, 제2 조성물 및/또는 제2 조성물은 동시에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 17**

제3항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 조성물은 제1 조성물 이전에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 18**

제3항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 조성물은 1회 초과의 용량으로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 제3 조성물은 1일 1회 투여되고, 제3 조성물의 제1 용량은 제1 조성물의 제1 주입 적어도 5일 전에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 제3 조성물은 제1 조성물의 제1 주입 3일, 4일 및 5일 전에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 조성물은 제1 조성물 이전에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 조성물은1회 초과의 용량으로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 제2 조성물의 제1 용량은 제1 조성물의 제1 주입 12일 이전에 투여되고, 제2 조성물의 제2 용

량은 제1 조성물의 제1 주입 5일 전에 투여되고, 후속 용량은 제1 조성물의 제1 주입 후 적어도 8주 동안 주당 1회 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 항암제로 이전에 치료된 적이 없는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 조성물의 제1 림프구제거제 및 제3 조성물의 제2 림프구제거제는 동시에 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 조성물의 제1 림프구제거제 및 제3 조성물의 제2 림프구제거제는 순차적으로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 제1 림프구제거제 및 제2 림프구제거제는 같은 날에 투여되고, 제1 림프구제거제는 30분의 시간 기간에 걸쳐서 정맥내로 투여되고, 제2 림프구제거제는 30분의 시간 기간에 걸쳐서 정맥내로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 28**

제26항 또는 제27항에 있어서, 제1 림프구제거제 또는 제2 림프구제거제는 사이클로포스파마이드 또는 플루다라빈인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 제3 조성물의 용량은

i) 100 mg/$m^2$, 200 mg/$m^2$, 300 mg/$m^2$, 400 mg/$m^2$ 또는 500 mg/$m^2$의 사이클로포스파마이드;

ii) 10 mg/$m^2$, 20 mg/$m^2$, 30 mg/$m^2$, 40 mg/$m^2$ 또는 50 mg/$m^2$의 플루다라빈; 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 제3 조성물의 용량은 300 mg/$m^2$의 사이클로포스파마이드 및 30 mg/$m^2$의 플루다라빈을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 31**

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물은 적어도 0.1x$10^6$, 0.2 x$10^6$, 0.25 x$10^6$, 0.5 x$10^6$, 0.6 x$10^6$, 0.7 x$10^6$, 0.75 x$10^6$, 0.8 x$10^6$, 0.9 x$10^6$, 1x$10^6$, 2 x$10^6$, 3 x$10^6$, 4 x$10^6$, 5 x$10^6$, 6 x$10^6$, 7 x$10^6$, 8 x$10^6$, 9 x$10^6$, 10 x$10^6$, 11 x$10^6$, 12 x$10^6$, 13 x$10^6$, 14 x$10^6$, 15 x$10^6$, 16 x$10^6$, 17 x$10^6$, 18 x$10^6$, 19 x$10^6$ 또는 20 x$10^6$개 세포/대상체 체중 kg의 총 용량으로 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 32**

제12항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조성물의 제1 주입, 제2 주입 및/또는 제3 주입은 약 1 x $10^5$ 세포/mL to 약 5 x $10^7$개 세포/mL의 농도로 제1 조성물을 포함하는 주입 백을 사용하여 투여되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 주입 백은 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL의 농도로 제1 조성물을 포함하

는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 조성물의 용량은 100 mg/$m^2$, 125 mg/$m^2$, 150 mg/$m^2$, 175 mg/$m^2$, 200 mg/$m^2$, 225 mg/$m^2$, 275 mg/$m^2$, 300 mg/$m^2$, 325 mg/$m^2$, 375 mg/$m^2$, 400 mg/$m^2$, 425 mg/$m^2$, 450 mg/$m^2$, 475 mg/$m^2$ 또는 500 mg/$m^2$의 리툭시맙을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 제2 조성물의 용량은 375 mg/$m^2$의 리툭시맙인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 제2 조성물은 정맥내 주입에 의해서 투여되고, 정맥내 주입의 유량은 약 25 mg/시간 내지 약 500 mg/시간인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 제2 조성물의 제1 용량은 50 mg/시간의 유량으로 정맥내 주입에 의해서 투여되고, 유량은 30분마다 400 mg/시간의 최대치로 증가되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 38**

제36항에 있어서, 제2 조성물의 제2 용량 및 후속 용량은 약 100 mg/시간의 유량으로 정맥내 주입에 의해서 투여되고, 유량은 30분마다 약 400 mg/시간의 최대치로 증가되는, 암을 치료하는 방법.

**청구항 39**

제1항 내지 제38항에 있어서, 암은 혈액암인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 다발성 골수종은 재발 다발성 골수종 또는 난치성 다발성 골수종인, 암을 치료하는 방법.

**청구항 42**

250 mL의 조성물을 포함하는 단위 용량 주입 백으로서, 조성물은

CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하며, CAR은 BCMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin을 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 조성물의 농도는 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL인, 단위 용량 주입 백.

**청구항 43**

250 mL의 조성물을 포함하는 단위 용량 주입 백으로서, 조성물은

CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하며, CAR은 BCMA에 특이적으로 결합하는 VH를 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 조성물의 농도는 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL인, 단위 용량 주입 백.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2020년 4월 14일자로 출원된 미국 임시 출원 제63/009,569호에 대한 우선권 및 이익을 주장한다. 본 출원의 내용은 전문이 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 분자 생물학에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 키메라 항원 수용체, 1종 이상의 CAR을 함유하는 트랜스포존뿐만 아니라 이의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

[0005] 서열목록의 참조에 의한 통합

[0006] 2021년 4월 13일에 생성된 크기가 54.6 KB인 파일명 "POTH-057_001WO_SequenceListing.txt"의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

## 배 경 기 술

[0007] 전통적인 항체 서열 또는 이의 단편을 사용하지 않고 면역 세포의 특이성을 지시하는 방법에 대해서 오랫동안 느껴졌지만 충족되지 않은 요구가 존재하였다. 본 개시내용은 우수한 키메라 항원 수용체를 제공한다.

## 발명의 내용

[0008] 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 키메라 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)를 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 제1 조성물로서, CAR은 B-세포 성숙 항원(BCMA: B-cell maturation antigen)에 특이적으로 결합하는 항원 인식 도메인을 포함하는, 제1 조성물; 및 항-CD20 작용제를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 1종의 림프구제거제를 포함하는 제3 조성물을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 아이오딘 i131 토시투모맙, 오비누투주맙 또는 이브리투모맙이다. 바람직한 실시형태에서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙이다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 Centyrin, scFv, 단일 도메인 항체, VH 또는 VHH를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 Centyrin을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 VH를 포함한다.

[0009] 본 개시내용은 또한 암을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 제1 조성물로서, CAR은 항원 인식 도메인을 포함하는, 제1 조성물; 및 항-CD20 작용제를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물은 1종 초과의 CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 제1 조성물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 1종 초과의 CAR에서 각각의 CAR은 상이한 항원에 결합한다. 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 1종의 림프구제거제를 포함하는 제3 조성물을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 아이오딘 i131 토시투모맙, 오비누투주맙 또는 이브리투모맙이다. 바람직한 실시형태에서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙이다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 Centyrin, scFv, 단일 도메인 항체, VH 또는 VHH를 포함한다. 일부 실시형태에서, Centyrin은 B-세포 성숙 항원(BCMA)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, VH는 BCMA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, Centyrin은 전립선-특이적 막 항원(PSMA: Prostate-specific membrane antigen)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, scFv는 Mucin 1(MUC-1)에 결합한다. 일부 실시형태에서, scFv는 MUC1-C에 결합한다.

[0010] 일부 실시형태에서, 방법은 제1 조성물이 투여되지만 제2 조성물이 투여되지 않은 환자와 비교할 때 환자에서 제1 조성물에 대한 항-약물 항체(ADA: anti-drug antibody) 반응의 적어도 50% 감소를 제공한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 방법은 제1 조성물이 투여되지만 제2 조성물이 투여되지 않은 환자와 비교할 때 환자에서 제1 조성물의 지속성의 적어도 75% 증가를 제공한다. 일부 실시형태에서, 방법은 제1 조성물이 투여되지만 제2 조성물이 투여되지 않은 환자와 비교할 때 환자에서 제1 조성물의 지속성의 적어도 90% 증가를 제공한다. 일부 실시형태에서, 지속성의 척도는 혈장 농도 곡선의 곡선 하 면적(AUC: area under the curve)이다.

[0012] 일부 실시형태에서, 제1 조성물은 다회 주입으로서 투여되고, 다회 주입은 제1 주입 및 제2 주입으로 분할된 총 용량을 포함하고, i) 제1 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고; ii) 제2 주입은 총 용량의 약 2/3를 차지하고, 제1 주입 적어도 10일 후에 투여된다.

[0013] 일부 실시형태에서, 제1 조성물은 다회 주입으로서 투여되고, 다회 주입은 제1 주입 및 제2 주입으로 분할된 총 용량을 포함하고, i) 제1 주입은 총 용량의 약 2/3를 차지하고; ii) 제2 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고,

제1 주입 적어도 10일 후에 투여된다.

[0014] 일부 실시형태에서, 제1 조성물은 다회 주입으로서 투여되고, 다회 주입은 제1 주입, 제2 주입 및 제3 주입으로 분할된 총 용량을 포함하고, i) 제1 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고; ii) 제2 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고, 제1 주입 적어도 10일 후에 투여되고; iii) 제3 주입은 총 용량의 약 1/3을 차지하고, 제2 주입 적어도 10일 후에 투여된다.

[0015] 일부 실시형태에서, 제1 주입과 제2 주입 사이의 시간 또는 제2 주입과 제3 주입 사이의 시간은 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주이다.

[0016] 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 및 제3 조성물은 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물, 제2 조성물 및/또는 제3 조성물은 동시에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제3 조성물은 제1 조성물 이전에 투여된다.

[0017] 일부 실시형태에서, 제3 조성물은 1회 초과의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 제3 조성물 1일 1회 투여되고, 제3 조성물의 제1 용량은 제1 조성물의 제1 주입 적어도 5일 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제3 조성물은 제1 조성물의 제1 주입 3일, 4일 및 5일 전에 투여된다.

[0018] 일부 실시형태에서, 제2 조성물은 제1 조성물 이전에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제2 조성물은 1회 초과의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 제2 조성물의 제1 용량은 제1 조성물의 제1 주입 12일 이전에 투여되고, 제2 조성물의 제2 용량은 제1 조성물의 제1 주입 5일 전에 투여되고, 후속 용량은 제1 조성물의 제1 주입 후 적어도 8주 동안 주당 1회 투여된다.

[0019] 일부 실시형태에서, 대상체는 항암제로 이전에 치료된 적이 없다. 일부 실시형태에서, 대상체는 i) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 2주 이내; 또는 ii) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전에 항암제의 5 반감기 이내에 항암제를 제공받지 않는다.

[0020] 일부 실시형태에서, 대상체는 제1 조성물의 제1 주입의 투여 후에 항암제를 제공받지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 면역억제제로 이전에 치료된 적이 없다. 일부 실시형태에서, 대상체는 i) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 2주 이내; 또는 ii) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전에 면역억제제의 5 반감기 이내에 면역억제제를 제공받지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 제1 조성물의 제1 주입의 투여 후에 면역억제제를 제공받지 않는다.

[0021] 일부 실시형태에서, 대상체는 항염증제로 이전에 치료된 적이 없다. 일부 실시형태에서, 대상체는 i) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 2주 이내; ii) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 1주 이내; 또는 ii) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전에 면역억제제의 5 반감기 이내에 항염증제를 제공받지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 제1 조성물의 제1 주입의 투여 후에 항염증제를 제공받지 않는다. 일부 실시형태에서, 항염증제는 코르티코스테로이드이다. 일부 실시형태에서, 코르티코스테로이드는 프레드니손이고, 프레드니손은 적어도 5 mg/일의 용량으로 전신으로 투여된다.

[0022] 일부 실시형태에서, 대상체는 과립구-집락 자극 인자(G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor) 또는 과립구-대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). 일부 실시형태에서, 대상체는 i) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 2주 이내; 또는 ii) 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 G-CSF 또는 GM-CSF의 5 반감기 이내에 G-CSF 또는 GM-CSF를 제공받지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 제1 조성물의 마지막 주입의 투여 후 및/또는 제1 조성물의 마지막 주입의 투여 후 2개월 이내에 G-CSF 또는 GM-CSF를 제공받지 않는다.

[0023] 일부 실시형태에서, 대상체는 한약(herbal medication)으로 이전에 치료된 적이 없다. 일부 실시형태에서, 대상체는 제2 조성물의 제1 용량의 투여 전 2주 이내에 한약을 제공받지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 제1 조성물의 마지막 주입의 투여 후 및/또는 제1 조성물의 마지막 주입의 투여 후 2개월 이내에 한약을 제공받지 않는다.

[0024] 일부 실시형태에서, 제3 조성물의 제1 림프구제거제 및 제3 조성물의 제2 림프구제거제는 동시에 투여된다. 일부 실시형태에서, 제3 조성물의 제1 림프구제거제 및 제3 조성물의 제2 림프구제거제는 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 제1 림프구제거제 및 제2 림프구제거제는 같은 날에 투여되고, 제1 림프구제거제는 30분의 시간 기간에 걸쳐서 정맥내로 투여되고, 제2 림프구제거제는 30분의 시간 기간에 걸쳐서 정맥내로 투여된다.

[0025] 일부 실시형태에서, 제1 림프구제거제 또는 제2 림프구제거제는 사이클로포스파마이드 또는 플루다라빈이다. 일

부 실시형태에서, 제3 조성물의 용량은 i) 100 mg/$m^2$, 200 mg/$m^2$, 300 mg/$m^2$, 400 mg/$m^2$ 또는 500 mg/$m^2$의 사이클로포스파마이드; ii) 10 mg/$m^2$, 20 mg/$m^2$, 30 mg/$m^2$, 40 mg/$m^2$ 또는 50 mg/$m^2$의 플루다라빈; 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제3 조성물의 용량은 300 mg/$m^2$의 사이클로포스파마이드 및 30 mg/$m^2$의 플루다라빈을 포함한다.

[0026] 일부 실시형태에서, 제1 조성물은 적어도 0.1x$10^6$, 0.2 x$10^6$, 0.25 x$10^6$, 0.5 x$10^6$, 0.6 x$10^6$, 0.7 x$10^6$, 0.75 x$10^6$, 0.8 x$10^6$, 0.9 x$10^6$, 1x$10^6$, 2 x$10^6$, 3 x$10^6$, 4 x$10^6$, 5 x$10^6$, 6 x$10^6$, 7 x$10^6$, 8 x$10^6$, 9 x$10^6$, 10 x$10^6$, 11 x$10^6$, 12 x$10^6$, 13 x$10^6$, 14 x$10^6$, 15 x$10^6$, 16 x$10^6$, 17 x$10^6$, 18 x$10^6$, 19 x$10^6$ 또는 20 x$10^6$개 세포/대상체 체중 kg의 총 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 제1 조성물의 제1 주입, 제2 주입 및/또는 제3 주입은 약 1 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 5 x $10^7$개 세포/mL의 농도로 제1 조성물을 포함하는 주입 백을 사용하여 투여된다. 일부 실시형태에서, 주입 백은 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL의 농도로 제1 조성물을 포함한다.

[0027] 일부 실시형태에서, 제1 주입, 제2 주입 및/또는 제3 주입은 약 0.5 mL/분 내지 약 30 mL/분의 유량으로 정맥내 주입에 의해서 투여된다. 일부 실시형태에서, 유량은 약 1mL/분 내지 약 20 mL/분이다. 일부 실시형태에서, 제1 주입, 제2 주입 및/또는 제3 주입은 약 5분 내지 약 30분이다.

[0028] 일부 실시형태에서, 제2 조성물의 용량은 100 mg/$m^2$, 125 mg/$m^2$, 150 mg/$m^2$, 175 mg/$m^2$, 200 mg/$m^2$, 225 mg/$m^2$, 275 mg/$m^2$, 300 mg/$m^2$, 325 mg/$m^2$, 375 mg/$m^2$ 400 mg/$m^2$, 425 mg/$m^2$, 450 mg/$m^2$, 475 mg/$m^2$ 또는 500 mg/$m^2$의 리툭시맙을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 제2 조성물의 용량은 375 mg/$m^2$의 리툭시맙이다.

[0029] 일부 실시형태에서, 제2 조성물은 정맥내 주입에 의해서 투여되고, 정맥내 주입의 유량은 약 25 mg/시간 내지 약 500 mg/시간이다. 일부 실시형태에서, 제2 조성물의 제1 용량은 50 mg/시간의 유량으로 정맥내 주입에 의해서 투여되고, 유량은 30분마다 400 mg/시간의 최대치로 증가된다. 일부 실시형태에서, 제2 조성물의 제2 용량 및 후속 용량은 약 100 mg/시간의 유량으로 정맥내 주입에 의해서 투여되고, 유량은 30분마다 약 400 mg/시간의 최대치로 증가된다.

[0030] 일부 실시형태에서, 아세트아미노펜, 항히스타민 및 메틸프레드니솔론이 제2 조성물의 각각의 용량 30분 전에 투여된다.

[0031] 일부 실시형태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시형태에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 실시형태에서, 재발 다발성 골수종은 재발 다발성 골수종 또는 난치성 다발성 골수종이다.

[0032] 일부 실시형태에서, 암은 고형암이다. 일부 실시형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시형태에서, 암은 거세-저항성 전립선암(CRPC: castrate-resistant prostate cancer)이다. 일부 실시형태에서, 고형암은 유방암, 결장 직장암, 폐암, 난소암, 췌장암 또는 신장암이다. 일부 실시형태에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다.

[0033] 본 개시내용은 CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 조성물 250 mL를 포함하는 단위 용량 주입 백을 제공하며, CAR은 BCMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin을 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 조성물의 농도는 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL이다.

[0034] 본 개시내용은 CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 조성물 250 mL를 포함하는 단위 용량 주입 백을 제공하며, CAR은 BCMA에 특이적으로 결합하는 VH를 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 조성물의 농도는 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL이다.

[0035] 본 개시내용은 CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 조성물 250 mL를 포함하는 단위 용량 주입 백을 제공하며, CAR은 PSMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin을 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 조성물의 농도는 약 3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL이다.

[0036] 본 개시내용은 CAR을 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 조성물 250 mL를 포함하는 단위 용량 주입 백을 제공하며, CAR은 MUC1-C에 특이적으로 결합하는 scFv를 포함하는 항원 인식 도메인을 포함하고, 조성물의 농도는 약

3 x $10^5$개 세포/mL 내지 약 2.4 x $10^7$개 세포/mL이다.

## 도면의 간단한 설명

[0037] **도 1**은 CARTyrin(CD8a 신호 펩티드, Centyrin, CD8a 힌지 서열 및 막관통 서열 및 CD3z 공자극성 도메인을 포함함)을 포함하는 트랜스포존을 포함하는 7676개 염기쌍의 본 개시내용의 piggyBac CARTyrin 작제물을 도시한 개략도이다.

**도 2**는 본 개시내용의 P-BCMA-101 작제물의 아미노산 서열의 개략도이다.

**도 3a 및 도 3b**는 본 개시내용의 P-BCMA-101 작제물의 핵산 서열의 개략도이다.

**도 4**는 본 개시내용의 CARTyrin의 작제를 도시하는 개략도 및 Centyrin 및 항체의 특징을 대조하는 표이다.

**도 5a**는 5 μg의 CARTyrin mRNA로 전기천공한 후 CARTyrin 발현을 도시한 일련의 세포 분류 플롯이다.

**도 5b**, 좌측 패널은 대조군 K562 세포주 및 BCMA 발현 H929 세포주로의 시험감염 후 CARTyrin 기능을 도시한 일련의 세포 분류 플롯이고, 우측 패널은 좌측 패널의 플롯의 정량화를 나타낸 그래프이다(BCMA-발현 주 U266로의 시험감염으로부터의 데이터 추가).

**도 5c**는 T-세포의 전기천공 동안 사용된 mRNA 양의 함수로서 CARTyrin 활성을 도시한 그래프이다.

**도 6**은 마우스에서 A08 CARTyrin을 사용한 생체내 종양 시험감염 연구 타임라인을 도시한 개략도이다.

**도 7**은 A08 CARTyrin-처리된 마우스의 완전(100%) 생존을 나타낸 한 쌍의 그래프이다. 종양 부하를 M-단백질의 존재에 의해 평가하였다. 보호된 동물에서는 M-단백질이 검출되지 않았다.

**도 8**은 본 개시내용의 예시적인 유도성 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 도시한 개략도이다.

**도 9**는 뉴클레오펙션 후 제12일에 (piggyBac (PB) 트랜스포사제에 의해서 세포에 도입된 iC9 작제물("안전 스위치"라고도 알려짐)에 의해 코딩된) 본 개시내용의 유도성 카스파제 폴리펩티드와 조합하여 또는 단독으로 치료제(CARTyrin)를 발현하도록 변형된 세포에서 유도제(AP1903)의 증가하는 투여량의 함수로서 살아있는 세포의 면적(게이트된 우측 아래 사분면)에서 아폽토시스 세포에 의해 채워진 면적(좌측 위 사분면)으로 이동하는 세포의 존재비를 도시한 일련의 유세포 분석 플롯이다.

**도 10**은 뉴클레오펙션 후 제19일에 (piggyBac (PB) 트랜스포사제에 의해서 세포에 도입된 iC9 작제물("안전 스위치"라고도 알려짐)에 의해 코딩된) 본 개시내용의 유도성 카스파제 폴리펩티드와 조합하여 또는 단독으로 치료제(CARTyrin)를 발현하도록 변형된 세포에서 유도제(AP1903)의 증가하는 투여량의 함수로서 살아있는 세포의 면적(게이트된 우측 아래 사분면)에서 아폽토시스 세포에 의해 채워진 면적(좌측 위 사분면)으로 이동하는 세포의 존재비를 도시한 일련의 유세포 분석 플롯이다.

**도 11**은 도 9(좌측 그래프) 또는 도 10(우측 그래프)에 나타낸 집계된 결과의 정량화를 도시한 한 쌍의 그래프이다. 구체적으로, 이들 그래프는 제12일(도 9 및 좌측 그래프) 또는 제19일(도 10 및 우측 그래프)에 각각의 변형된 세포 유형에 대한 iC9 스위치의 유도제(AP1903) 농도의 함수로서 iC9 안전 스위치가 세포 생존율에 미치는 영향을 도시한다.

**도 12a 내지 도 12d**는 BCMA CARTyrin의 안정적인 발현 및 기능을 도시한 그래프이다. **도 12a**는 piggyBac(PB) 전위 후 P-BCMA-101에서 CARTyrin 표면 발현을 도시한 유세포 분석 플롯이다. 모의는 1차 BCMA/Fc/비오틴이 없는 것을 나타낸다. **도 12b**는 재자극된 P-BCMA-101 T 세포에서 CARTyrin 발현의 증가를 나타내는 유세포 분석 플롯이다. **도 12c**는 BCMA+(H929) 세포주에 대한 P-BCMA-101 세포에 의한 시험관내 사멸을 나타낸 그래프이다. **도 12d**는 BCMA-발현 세포주에 대한 P-BCMA-101 세포의 증식을 나타낸 유세포 분석 플롯이다.

**도 13a 내지 도 13d**는 GLP 안전성 연구에서 P-BCMA-101로 처리된 MM.1S-Luc 종양-보유 NSG 마우스의 생체내 종양 성장 및 생존을 나타낸 선 그래프이다. 암컷 NSG 마우스에게 M.1S BCMA+ MM 세포를 IV로 이식하고, 17 내지 19일 후에 P-BCMA-101을 IV로 투여하였다: 비히클(n=10)(검은색); 4 x $10^6$개 P-BCMA-101 세포(저용량)(n=19)(적색) 또는 12 x $10^6$개 P-BCMA-101 세포(고용량)(녹색). 종양 없음(청색)(n=20). 제29일에, 각각의 처리군으로부터 10마리의 마우스를 안락사시키고, 병리학을 위해 제출하였다. **도 13a**는 평균 ± 평균의 표준 오차(SEM) 생물발광 영상화 데이터를 나타낸 그래프이다. **도 13b**는 각각의 처리군으로부터의 각각의 개별 마우스의 생물발광 영상화 데이터를 나타낸 그래프이다. **도 13c**는 3개의 처리군으로부터의 마우스의 생존 백분율을 나타낸 생존 곡

선이다. **도 13d**는 각각의 처리군으로부터 마우스의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

**도 14**는 P-BCMA-101 단일 투여에 대한 전체 연구 설계의 개략도이다.

**도 15**는 P-BCMA-101 임상 제조 및 공정 계획의 개략도이다.

**도 16**은 코호트 A 및 코호트 C에서 P-BCMA-101 주기 투여에 대한 전체 연구 설계의 개략도이다. 1상 - 주기 투여 동안, P-BCMA-101의 다중 용량이 2주의 2주기로 정맥내 투여될 것이다.

**도 17**은 코호트 B에서 P-BCMA-101 주기 투여에 대한 전체 연구 설계의 개략도이다. 1상 주기 투여 동안, P-BCMA-101의 다중 용량이 2주의 3주기로 정맥내 투여될 것이다.

**도 18**은 P-BCMA-101 1상 조합 투여에 대한 전체 연구 설계의 개략도이다.1상 - 병용 투여에서, P-BCMA-101은 승인된 요법인 레날리도마이드 및 리툭시맙과 조합으로 투여될 것이다.

**도 19a**는 P-BCMA-101 단독으로 처리된 다발성 골수종 환자에서 시간 경과에 따른 P-BCMA-101의 카피 수/DNA ug를 나타낸 그래프이다.

**도 19b**는 P-BCMA-101과 리툭시맙의 조합물로 처리된 다발성 골수종 환자에서 시간 경과에 따른 P-BCMA-101의 카피 수/DNA ug를 나타낸 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0038] 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 제1 조성물로서, CAR은 항원 인식 도메인을 포함하는, 제1 조성물; 및 항-CD20 작용제를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0039] 일부 실시형태에서, CAR의 항원 인식 도메인은 Centyrin, scFv, 단일 도메인 항체, VH 또는 VHH를 포함한다.

[0040] 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 B-세포 성숙 항원(BCMA) 또는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17(TNFRSF17)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 BCMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin을 포함한다. BCMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin의 비제한적인 예는 국제공개 WO2018/014038호에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, BCMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin은 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 BCMA에 특이적으로 결합하는 VH를 포함한다. BCMA에 특이적으로 결합하는 VH의 비제한적인 예는 국제공개 WO2019/126574호에 개시되어 있다.

[0042] 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 전립선-특이적 막 항원(PSMA)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 PSMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin을 포함한다. PSMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin의 비제한적인 예는 국제공개 WO2019/173636호에 개시되어 있다.

[0043] 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인 Mucin 1(MUC-1)에 특이적으로 결합한다. 인간 MUC1은 단일 폴리펩티드로 번역되고, 소포체에서 N- 및 C-말단 소단위(MUC1-N 및 MUC1-C)로 절단되는 이종이량체 당단백질이다. 일부 실시형태에서, 항원 인식 도메인은 MUC1-C에 특이적으로 결합하는 scFv를 포함한다. MUC1-C에 특이적으로 결합하는 Centyrin의 비제한적 예는 국제출원 PCT/US2020/066121호 및 국제공개 WO2018/014039호에 개시되어 있다.

[0044] 본 개시내용의 Centyrin은 항원에 특이적으로 결합한다. 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 Centyrin을 포함하는 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 특정 항원에 대해 세포(예를 들어 세포독성 면역 세포)의 특이성을 지시하기 위해 사용될 수 있다.

[0045] 본 개시내용의 Centyrin은 LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (서열번호 1)을 포함하는 공통 서열을 포함할 수 있다.

[0046] 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR의 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 힌지/스페이서 도메인은 인간 CD8α, IgG4 및/또는 CD4의 힌지/스페이서/스톡을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 세포내 도메인 또는 엔도도메인은 인간 CD3ζ의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있고, 인간 4-1BB, CD28, CD40, ICOS, MyD88, OX-40 세포내 분절 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 막관통 도메인은 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ,

CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR 막관통 도메인을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0047] 본원에서 사용되는 용어 "P-BCMA-101"은 BCMA에 결합하는 Centyrin, BCMA에 결합하는 CARTyrin, BCMA에 특이적으로 결합하는 CAR 또는 BCMA에 특이적으로 결합하는 CARTyrin 또는 CAR을 발현하는 T-세포 또는 T-세포의 집단을 지칭한다. 일부 예에서, "P-BCMA-101"은 BCMA(예를 들어, 주변 요소, 예컨대, DHFR 및 iC9 포함)에 결합하는 CAR 또는 CARTyrin을 코딩하는 작제물을 지칭한다.

[0048] 일부 실시형태에서, P-BCMA-101 CARTyrin은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD8α 신호 펩티드; 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 BCMA에 특이적으로 결합하는 Centyrin을 포함하는 항원 인식 영역; 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD8α 힌지 영역; 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD8α 막관통 영역; 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 인간 4-1BB 공자극성 도메인; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CD3zeta 공자극성 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, P-BCMA-101 CARTyrin은 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, P-BCMA-101 CARTyrin은 서열번호 44의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해서 코딩된다.

[0049] 본 개시내용은 유전자 조작된 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포, 조혈 조상 세포, 말초 혈액(PB) 유래 T 세포(G-CSF-동원된 말초 혈액으로부터의 T 세포 포함), 제대혈(UCB) 유래 T 세포를 제공하는데, 이들은 이러한 세포를 본 개시내용의 CAR 및/또는 CARTyrin을 도입함으로써 1종 이상의 항원에 특이적이 된다. 본 개시내용의 세포는 본 개시내용의 CAR 또는 CARTyrin을 코딩하는 트랜스포존 및 본 개시내용의 트랜스포사제를 코딩하는 서열(바람직하게는 본 개시내용의 트랜스포사제를 코딩하는 서열은 mRNA 서열임)을 포함하는 플라스미드의 전기전달에 의해서 변형될 수 있다. CARTyrin을 코딩하는 트랜스포존의 예는 전문이 본원에 참조에 의해 포함된 국제출원 PCT/US2019/021224호에 기재되어 있다. CAR을 코딩하는 트랜스포존의 예는 각각 전문이 본원에 포함된 국제출원 PCT/US2018/066936호 및 PCT/US2017/042457호에 기재되어 있다.

[0050] 본 개시내용의 트랜스포존은 재조합/변형된 세포의 게놈에 에피솜에 의해서 유지되거나 통합된다. 트랜스포존은 향상된 비-바이러스 유전자 전달을 위해서 트랜스포존 및 트랜스포사제를 활용하는 2성분 piggyBac 시스템의 일부일 수 있다. 이러한 방법의 특정 실시형태에서, 트랜스포존은 2개의 시스-조절성 인설레이터 요소에 의해 플랭킹된 키메라 항원 수용체를 코딩하는 서열을 갖는 플라스미드 DNA 트랜스포존이다. 특정 실시형태에서, 트랜스포존은 piggyBac 트랜스포존이다. 특정 실시형태에서, 구체적으로 트랜스포존이 piggyBac 트랜스포존인 실시형태에서, 트랜스포사제는 piggyBac™ 또는 Super piggyBac™(SPB) 트랜스포사제이다.

[0051] 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, 트랜스포존은 2개의 시스-조절성 인설레이터 요소에 의해 플랭킹된 항원 수용체를 코딩하는 서열을 갖는 플라스미드 DNA 트랜스포존이다. 특정 실시형태에서, 트랜스포존은 piggyBac 트랜스포존이다. 특정 실시형태에서, 구체적으로 트랜스포존이 piggyBac 트랜스포존인 실시형태에서, 트랜스포사제는 piggyBac™ 또는 Super piggyBac™(SPB) 트랜스포사제이다. 특정 실시형태에서, 구체적으로 트랜스포사제가 Super piggyBac™(SPB) 트랜스포사제인 실시형태에서, 트랜스포사제를 코딩하는 서열은 mRNA 서열이다.

[0052] 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, 트랜스포사제 효소는 piggyBac™ (PB) 트랜스포사제 효소이다. piggyBac (PB) 트랜스포사제 효소는 하기 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 이들 사이의 임의의 퍼센트 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다:

```
  1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSEDDVQ SDTEEAFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGYKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF
```

[0053] (서열번호 12).

[0054] 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, 트랜스포사제는 하기 서열의 위치 30, 165, 282 또는 538 중 하나 이

상의 위치에서 아미노산 치환을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 piggyBac™ (PB) 트랜스포사제이다:

```
  1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEI SDHVSEDDVQ SDTEEAFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTGATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RMYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGYKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPNEV
541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF
```

(서열번호 12).

[0055]

[0056] 특정 실시형태에서, 트랜스포사제는 서열번호 12의 서열의 위치 30, 165, 282 또는 538 중 2개 이상의 위치에서 아미노산 치환을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 piggyBac™ (PB) 트랜스포사제이다. 특정 실시형태에서, 트랜스포사제는 서열번호 12의 서열의 위치 30, 165, 282 또는 538 중 3개 이상의 위치에서 아미노산 치환을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 piggyBac™ (PB) 트랜스포사제이다. 특정 실시형태에서, 트랜스포사제는 서열번호 12의 서열의 하기 위치 30, 165, 282 및 538 각각에서 아미노산 치환을 가진 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 piggyBac™ (PB) 트랜스포사제이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12의 서열의 위치 30에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 이소류신(I)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12의 서열의 위치 165에서의 아미노산 치환은 세린(S)에 의한 글리신(G)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12의 서열의 위치 282에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12의 서열의 위치 538에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 아스파라긴(N)의 치환이다.

[0057] 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, 트랜스포사제 효소는 Super piggyBac™ (sPBo) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 Super piggyBac™(sPBo) 트랜스포사제는 서열번호 12의 서열의 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있고, 이때 위치 30에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 이소류신(I)의 치환이고, 위치 165에서의 아미노산 치환은 세린(S)에 의한 글리신(G)의 치환이고, 위치 282에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환이고, 위치 538에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 아스파라긴(N)의 치환이다. 특정 실시형태에서, Super piggyBac™(sPBo) 트랜스포사제는 하기 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 이들 사이의 임의의 퍼센트 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나 이로 이루어질 수 있다:

```
  1 MGSSLDDEHI LSALLQSDDE LVGEDSDSEV SDHVSEDDVQ SDTEEAFIDE VHEVQPTSSG
 61 SEILDEQNVI EQPGSSLASN RILTLPQRTI RGKNKHCWST SKSTRRSRVS ALNIVRSQRG
121 PTRMCRNIYD PLLCFKLFFT DEIISEIVKW TNAEISLKRR ESMTSATFRD TNEDEIYAFF
181 GILVMTAVRK DNHMSTDDLF DRSLSMVYVS VMSRDRFDFL IRCLRMDDKS IRPTLRENDV
241 FTPVRKIWDL FIHQCIQNYT PGAHLTIDEQ LLGFRGRCPF RVYIPNKPSK YGIKILMMCD
301 SGTKYMINGM PYLGRGTQTN GVPLGEYYVK ELSKPVHGSC RNITCDNWFT SIPLAKNLLQ
361 EPYKLTIVGT VRSNKREIPE VLKNSRSRPV GTSMFCFDGP LTLVSYKPKP AKMVYLLSSC
421 DEDASINEST GKPQMVMYYN QTKGGVDTLD QMCSVMTCSR KTNRWPMALL YGMINIACIN
481 SFIIYSHNVS SKGEKVQSRK KFMRNLYMSL TSSFMRKRLE APTLKRYLRD NISNILPKEV
541 PGTSDDSTEE PVMKKRTYCT YCPSKIRRKA NASCKKCKKV ICREHNIDMC QSCF
```

(서열번호 2).

[0058]

[0059] 트랜스포사제가 위치 30, 165, 282 및/또는 538에서 상기의 돌연변이를 포함하는 것인 실시형태를 포함하는, 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, piggyBac™ 또는 Super piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12 또는 서열번호 2의 서열의 위치 3, 46, 82, 103, 119, 125, 177, 180, 185, 187, 200, 207, 209, 226, 235, 240, 241, 243, 258, 296, 298, 311, 315, 319, 327, 328, 340, 421, 436, 456, 470, 486, 503, 552, 570 및 591 중 하나 이상의 위치에서 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 위치 30, 165, 282 및/또는 538에서 상기의 돌연변이를 포함하는 것인 실시형태를 포함하는 특정 실시형태에서, piggyBac™ 또는 Super

piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 위치 46, 119, 125, 177, 180, 185, 187, 200, 207, 209, 226, 235, 240, 241, 243, 296, 298, 311, 315, 319, 327, 328, 340, 421, 436, 456, 470, 485, 503, 552 및 570 중 하나 이상의 위치에서 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 3에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)에 의한 세린(S)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 46에서의 아미노산 치환은 세린(S)에 의한 알라닌(A)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 46에서의 아미노산 치환은 트레오닌(T)에 의한 알라닌(A)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 82에서의 아미노산 치환은 트립토판(W)에 의한 이소류신(I)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 103에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)에 의한 세린(S)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 119에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)에 의한 아르기닌(R)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 125에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)에 의한 시스테인(C)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 125에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 시스테인(C)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 177에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 티로신(Y)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 177에서의 아미노산 치환은 히스티딘(H)에 의한 티로신(Y)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 180에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 180에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 180에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 185에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 187에서의 아미노산 치환은 글리신(G)에 의한 알라닌(A)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 200에서의 아미노산 치환은 트립토판(W)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 207에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)에 의한 발린(V)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 209에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)에 의한 발린(V)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 226에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 235에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)에 의한 류신(L)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 12의 위치 240에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 발린(V)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 241에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 페닐알라닌(F)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 243에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 프롤린(P)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 258에서의 아미노산 치환은 세린(S)에 의한 아스파라긴(N)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 296에서의 아미노산 치환은 트립토판(W)에 의한 류신(L)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 296에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)에 의한 류신(L)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 296에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)에 의한 류신(L)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 298에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 298에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 298에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 311에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)에 의한 프롤린(P)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 311에서의 아미노산 치환은 발린에 의한 프롤린(P)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 315에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 아르기닌(R)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 319에서의 아미노산 치환은 글리신(G)에 의한 트레오닌(T)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 327에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)에 의한 티로신(Y)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 328에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 티로신(Y)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 340에서의 아미노산 치환은 글리신(G)에 의한 시스테인(C)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 340에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 시스테인(C)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 421에서의 아미노산 치환은 히스티딘(H)에 의한 아스파르트산(D)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 436에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)에 의한 발린(V)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 456에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 470에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)

에 의한 류신(L)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 485에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 세린(S)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 503에서의 아미노산 치환은 류신(L)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 503에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 552에서의 아미노산 치환은 리신(K)에 의한 발린(V)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 570에서의 아미노산 치환은 트레오닌(T)에 의한 알라닌(A)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 591에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)에 의한 글루타민(Q)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 591에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)에 의한 글루타민(Q)의 치환이다.

[0060] 트랜스포사제가 위치 30, 165, 282 및/또는 538에서 상기의 돌연변이를 포함하는 것인 실시형태를 포함하는, 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12 또는 서열번호 2의 서열의 위치 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570 중 하나 이상의 위치에서 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, Super piggyBac™트랜스포사제 효소는 이러한 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 위치 30, 165, 282 및/또는 538에서 상기의 돌연변이를 포함하는 것인 실시형태를 포함하는, 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12 또는 서열번호 2의 서열의 위치 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570 중 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 이상의 위치에서 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, Super piggyBac™트랜스포사제 효소는 이러한 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 위치 30, 165, 282 및/또는 538에서 상기의 돌연변이를 포함하는 것인 실시형태를 포함하는, 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12 또는 서열번호 2의 서열의 위치 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570의 위치에서 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, Super piggyBac™트랜스포사제 효소는 이러한 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 103에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)에 의한 세린(S)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 194에서의 아미노산 치환은 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 372에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)에 의한 아르기닌(R)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 375에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)에 의한 리신(K)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 450에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)에 의한 아스파르트산(D)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 509에서의 아미노산 치환은 글리신(G)에 의한 세린(S)의 치환이다. 특정 실시형태에서, 서열번호 12 또는 서열번호 2의 위치 570에서의 아미노산 치환은 세린(S)에 의한 아스파라긴(N)의 치환이다. 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12의 위치 194에서 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환을 포함할 수 있다. piggyBac™ 트랜스포사제 효소가 서열번호 12의 위치 194에서 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환을 포함할 수 있는 것인 실시형태를 비롯한 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12 또는 서열번호 2의 서열의 위치 372, 375 및 450에서 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12의 위치 194에서 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환, 서열번호 12의 위치 372에서 알라닌(A)에 의한 아르기닌(R)의 치환, 및 서열번호 12의 위치 375에서 알라닌(A)에 의한 리신(K)의 치환을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, piggyBac™ 트랜스포사제 효소는 서열번호 12의 위치 194에서 발린(V)에 의한 메티오닌(M)의 치환, 서열번호 12의 위치 372에서 알라닌(A)에 의한 아르기닌(R)의 치환, 서열번호 12의 위치 375에서 알라닌(A)에 의한 리신(K)의 치환 및 서열번호 12의 위치 450에서 아스파라긴(N)에 의한 아스파르트산(D)의 치환을 포함할 수 있다.

***스캐폴드 단백질***

[0061] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 피브로넥틴 유형 III(FN3) 반복 단백질, 코딩 또는 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 조성물, 조합, 제형, 장치 및 이들의 제조 및 사용 방법으로부터 유래될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 단백질 스캐폴드는 인간 Tenascin-C(이하 "Tenascin")의 다중 FN3 도메인의 공통 서열로 구성된다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 단백질 스캐폴드는 15개의 FN3 도메인의 공통 서열이다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 다양한 분자, 예를 들어, 세포 표적 단백질에 결합하도록 설계될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 항원의 야생형 및/또는 변이체 형태의 에피토프에 결합하도록 설계될 수 있다.

[0062] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 추가 분자 또는 모이어티, 예를 들어 항체의 Fc 영역, 알부민 결합 도메인 또는 반감기에 영향을 미치는 다른 모이어티를 포함할 수 있다. 추가 실시형태에서, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 단백질 스캐폴드를 코딩할 수 있는 핵산 분자에 결합될 수 있다.

[0063] 본 개시내용은 적어도 1종의 단백질 스캐폴드가 검출 가능하고/하거나 회수 가능한 양으로 발현되는 조건 하에 본원에 기재된 바와 같은 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 숙주 세포에서 다중 FN3 도메인의 공통 서열에 기초하여 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 발현시키는 적어도 하나의 방법을 제공한다.

[0064] 본 개시내용은 (a) 다중 FN3 도메인의 공통 서열에 기초한 단백질 스캐폴드 및/또는 본원에 기재된 바와 같은 코딩 핵산; 및 (b) 적합하고/하거나 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 적어도 하나의 조성물을 제공한다.

[0065] 본 개시내용은 피브로넥틴 유형 III(FN3) 반복 단백질, 바람직하게는 다중 FN3 도메인의 공통 서열, 보다 바람직하게는 인간 Tenascin으로부터의 다중 FN3 도메인의 공통 서열에 기초하여 단백질 스캐폴드의 라이브러리를 생성하는 방법을 제공한다. 라이브러리는 스캐폴드의 부분, 예를 들어 루프 영역의 특정 위치에서 분자 내의 아미노산 또는 아미노산 수를 (돌연변이에 의해) 변경함으로써 스캐폴드를 연속적으로 생성함으로써 형성된다. 라이브러리는 단일 루프의 아미노산 조성을 변경하거나 다중 루프를 동시에 변경하거나 스캐폴드 분자의 추가 위치를 변경하여 생성할 수 있다. 변경된 루프는 이에 따라 늘어나거나 줄어들 수 있다. 이러한 라이브러리는 각각의 위치에 가능한 모든 아미노산 또는 설계된 아미노산 하위세트를 포함하도록 생성될 수 있다. 라이브러리 구성원은 디스플레이, 예컨대, 시험관내 또는 CIS 디스플레이(DNA, RNA, 리보좀 디스플레이 등), 효모, 박테리아 및 파지 디스플레이에 의한 스크리닝을 위해서 사용될 수 있다.

[0066] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 향상된 생물리학적 특성, 예컨대, 환원 조건 하에서의 안정성 및 고농도에서의 용해도를 제공하고; 이들은 이. 콜라이와 같은 원핵 시스템, 효모와 같은 진핵 시스템, 그리고 토끼 망상적혈구 용해물 시스템과 같은 시험관내 전사/번역 시스템에서 발현되고 폴딩될 수 있다.

[0067] 본 개시내용은 본 발명의 스캐폴드 라이브러리를 표적으로 패닝하고 결합제를 검출함으로써 특정 표적에 결합하는 스캐폴드 분자를 생성하는 방법을 제공한다. 다른 관련 양태에서, 본 개시내용은 예를 들어, 특정 친화도로 표적 단백질에 결합할 수 있는 목적하는 활성을 갖는 친화도 성숙 단백질 스캐폴드를 생성하는 데 사용될 수 있는 스크리닝 방법을 포함한다. 친화도 성숙은 파지 디스플레이 또는 시험관내 디스플레이와 같은 시스템을 사용하여 돌연변이유발 및 선택의 반복 라운드에 의해 달성될 수 있다. 이 과정 동안 돌연변이유발은 특정 스캐폴드 잔기에 대한 부위 지정 돌연변이유발, 실수-유발(error-prone) PCR로 인한 무작위 돌연변이유발, DNA 셔플링 및/또는 이러한 기술의 조합의 결과일 수 있다.

[0068] 본 개시내용은 포유동물-유래 스캐폴드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 피브로넥틴 유형 III(FN3) 반복 단백질의 공통 서열에 기초한 단리된 재조합 및/또는 합성 단백질 스캐폴드뿐만 아니라 공통 FN3 서열에 기초한 단백질 스캐폴드를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자를 코딩하는 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 진단 및 치료 조성물, 방법 및 장치를 포함하는 이러한 핵산 및 단백질 스캐폴드의 제조 및 사용 방법을 더 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0069] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 종래의 치료제보다 국소적으로, 경구로 투여하는 능력 또는 혈액-뇌 장벽을 통과하는 능력, 리소스 대 포유동물 세포 발현의 함수로서의 단백질의 증가된 발현을 허용하는 이. 콜라이에서의 발현 능력, 다중 표적 또는 동일한 표적의 다중 에피토프에 결합하는 이중특이적 또는 탠덤 분자로 조작될 능력, 약물, 중합체 및 프로브에 접합될 능력, 고농도로 제형화될 능력 및 이러한 분자가 병든 조직 또는 종양을 효과적으로 침투하는 능력과 같은 이점을 제공한다.

[0070] 더욱이, 단백질 스캐폴드는 항체의 가변 영역을 모방하는 접힘과 관련하여 항체의 많은 특성을 갖는다. 이러한 배향은 FN3 루프가 항체 상보성 결정 영역(CDR)과 유사하게 노출되도록 한다. 이들은 세포 표적에 결합할 수 있어야 하며, 특정 결합 또는 관련 특성을 개선하기 위해 루프가 변경될 수 있고, 예를 들어, 친화도 성숙될 수 있다.

[0071] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드의 6개 루프 중 3개는 위상학적으로 항체의 상보성 결정 영역(CDR 1 내지 3), 즉 항원 결합 영역에 해당하는 반면, 나머지 3개의 루프는 항체 CDR과 유사한 방식으로 표면 노출된다. 이들 루프는 서열번호 13의 잔기 13 내지 16, 22 내지 28, 38 내지 43, 51 내지 54, 60 내지 64 및 75 내지 81에 또는 그 부근에 걸쳐 있다. 바람직하게는, 루프 영역은 잔기 22 내지 28에 또는 그 부근에 걸쳐 있고, 51 내지 54 및 75 내지 81은 결합 특이성 및 친화성에 대해 변경된다. 이들 루프 영역 중 하나 이상은 다른 루프 영역 및/또는 라이브러리를 채우기 위한 골격 부분으로서 이들의 서열을 유지하는 다른 가닥으로 무작위화되고, 강력한 결합제는 특정 단백질 표적에 대해 높은 친화도를 갖는 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 하나 이상의 루프 영역이 단백질과의 항체 CDR 상호작용과 유사하게 표적 단백질과 상호작용할 수 있다.

[0072] 본 개시내용의 스캐폴드는 항체 모방체를 포함할 수 있다.

[0073] 용어 "항체 모방체"는 표적 서열에 특이적으로 결합하고 자연적 발생 항체와 구별되는 구조를 갖는 유기 화합물을 설명하기 위한 것이다. 항체 모방체는 단백질, 핵산 또는 소분자를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 항체 모방체가 특이적으로 결합하는 표적 서열은 항원일 수 있다. 항체 모방체는 우수한 용해도, 조직 침투, 열 및 효소에 대한 안정성(예를 들어 효소 분해에 대한 저항성), 및 낮은 제조 비용을 포함하는 그러나 이에 제한되지 않는, 항체보다 우수한 특징을 제공할 수 있다. 예시적인 항체 모방체는 애피바디(affibody), 애필린(afflilin), 애피머(affimer), 애피틴(affitin), 알파바디(alphabody), 안티칼린(anticalin), 및 아비머(avimer; 결합력(avidity) 다량체로서도 알려짐), DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein), 피노머(Fynomer), Kunitz 도메인 펩티드 및 모노바디(monobody)를 포함한다.

[0074] 본 개시내용의 애피바디 분자는 임의의 디설파이드 가교 없이 하나 이상의 알파 나선을 포함하거나 이로 이루어진 단백질 스캐폴드를 포함한다. 바람직하게는, 본 개시내용의 애피바디 분자는 3개의 알파 나선을 포함하거나 이로 이루어진다. 예를 들어, 본 개시내용의 애피바디 분자는 면역글로불린 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 애피바디 분자는 단백질 A의 Z 도메인을 포함할 수 있다.

[0075] 본 개시내용의 애필린 분자는 예를 들어 감마-B 결정질 또는 유비퀴틴의 노출된 아미노산의 변형에 의해 생성된 단백질 스캐폴드를 포함한다. 애필린 분자는 작용적으로 항원에 대한 항체의 친화성을 모방하지만, 구조적으로 항체를 모방하지 않는다. 애필린을 제조하는 데 사용된 임의의 단백질 스캐폴드에서, 적절하게-폴딩된 단백질 분자에서 용매 또는 가능한 결합 파트너에 접근할 수 있는 아미노산은 노출된 아미노산으로 간주된다. 이들 노출된 아미노산 중 임의의 하나 이상은 표적 서열 또는 항원에 특이적으로 결합하도록 변형될 수 있다.

[0076] 본 개시내용의 애피머 분자는 특정 표적 서열에 대한 고 친화성 결합 부위를 제공하는 펩티드 루프를 나타내도록 조작된 고도로 안정한 단백질을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함한다. 본 개시내용의 예시적인 애피머 분자는 시스타틴 단백질 또는 이의 3차 구조에 기초한 단백질 스캐폴드를 포함한다. 본 개시내용의 예시적인 애피머 분자는 역-평행 베타-시트 위에 놓인 알파-나선을 포함하는 공통 3차 구조를 공유할 수 있다.

[0077] 본 개시내용의 애피틴 분자는 인공 단백질 스캐폴드를 포함하고, 이의 구조는 예를 들어 DNA 결합 단백질(예를 들어, DNA 결합 단백질 Sac7d)로부터 유래될 수 있다. 본 개시내용의 애피틴은 항원의 전체 또는 일부일 수 있는 표적 서열을 선택적으로 결합한다. 본 개시내용의 예시적인 애피틴은 DNA 결합 단백질의 결합 표면 상의 하나 이상의 아미노산 서열을 무작위화하고 생성된 단백질을 리보좀 전시 및 선택에 적용함으로써 제조된다. 본 개시내용의 애피틴의 표적 서열은 예를 들어 게놈에서, 또는 펩티드, 단백질, 바이러스 또는 박테리아의 표면상에서 발견될 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시형태에서, 애피틴 분자는 효소의 특정 저해제로서 이용될 수 있다. 본 개시내용의 애피틴 분자는 열-저항성 단백질 또는 그 유도체를 포함할 수 있다.

[0078] 본 개시내용의 알파바디 분자는 또한 세포-통과 알파바디(CPAB: Cell-Penetrating Alphabody)로서 지칭될 수 있다. 본 개시내용의 알파바디 분자는 각종 표적 서열(항원 포함)에 결합하는 작은 단백질(전형적으로 10 kDa 미만)을 포함한다. 알파바디 분자는 세포내 표적 서열에 도달 및 결합할 수 있다. 구조적으로, 본 개시내용의 알파바디 분자는 단일 사슬 알파 나선(자연 발생 코일형 코일 구조와 유사함)을 형성하는 인공 서열을 포함한다. 본 개시내용의 알파바디 분자는 표적 단백질에 특이적으로 결합하도록 변형된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함할 수 있다. 분자의 결합 특이성에 관계 없이, 본 개시내용의 알파바디 분자는 정확한 폴딩 및 열안정성을 유지한다.

[0079] 본 개시내용의 안티칼린 분자는 단백질 또는 소분자에서 표적 서열 또는 부위에 결합하는 인위적인 단백질을 포함한다. 본 개시내용의 안티칼린 분자는 인간 리포칼린으로부터 유래된 인위적인 단백질을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 안티칼린 분자는 예를 들어 단클론성 항체 또는 그 단편을 대신하여 사용될 수 있다. 안티칼린 분자는 단클론성 항체 또는 그 단편보다 더 우수한 조직 침투 및 열안정성을 나타낼 수 있다. 예시적인 본 개시내용의 안티칼린 분자는 대략 20 kDa의 질량을 갖는 약 180개의 아미노산을 포함할 수 있다. 구조적으로, 본 개시내용의 안티칼린 분자는 루프 및 부착된 알파 나선에 의해 쌍으로 연결된 역평행 베타-가닥을 포함하는 배럴 구조를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용의 안티칼린 분자는 루프 및 부착된 알파 나선에 의해 쌍으로 연결된 8개의 역평행 베타-가닥을 포함하는 배럴 구조를 포함한다.

[0080] 본 개시내용의 아비머 분자는 (또한 항원일 수 있는) 표적 서열에 특이적으로 결합된 인위적인 단백질을 포함한다. 본 개시내용의 아비머는 동일한 표적 내 또는 구별되는 표적 내 다중 결합 부위를 인식할 수 있다. 본 개시내용의 아비머가 하나 초과의 표적을 인식하는 경우, 아비머는 이중특이적 항체의 기능을 모방한다. 인위적인

단백질 아비머는 각각 대략 30 내지 35개의 아미노산의 2개 이상의 펩티드 서열을 포함할 수 있다. 이들 펩티드는 하나 이상의 링커 펩티드를 통해 연결될 수 있다. 아비머의 펩티드의 하나 이상의 아미노산 서열은 막 수용체의 A 도메인으로부터 유래될 수 있다. 아비머는 디설파이드 결합 및/또는 칼슘을 선택적으로 포함할 수 있는 단단한 구조를 갖는다. 본 개시내용의 아비머는 항체에 비해 더 큰 열 안정성을 나타낼 수 있다.

[0081] 본 개시내용의 DARPin(Designed Ankyrin Repeat Protein)은 표적 서열의 고 특이성 및 고 친화성을 가진 유전적으로-조작된, 재조합체, 또는 키메라 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 DARPin은 안키린 단백질로부터 유래되고, 선택적으로 안키린 단백질의 적어도 3개의 반복 모티프(또한 반복적 구조 단위로서 지칭됨)를 포함한다. 안키린 단백질은 고-친화성 단백질-단백질 상호작용을 매개한다. 본 개시내용의 DARPin은 큰 표적 상호작용 표면을 포함한다.

[0082] 본 개시내용의 피노머는 인간 Fyn SH3 도메인으로부터 유래되고 항체와 동일한 친화성 및 동일한 특이성을 가진 표적 서열 및 분자에 결합하도록 조작된 작은 결합 단백질(약 7 kDa)을 포함한다.

[0083] 본 개시내용의 Kunitz 도메인 펩티드는 Kunitz 도메인을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함한다. Kunitz 도메인은 프로테아제 활성을 저해하기 위한 활성 부위를 포함한다. 구조적으로, 본 개시내용의 Kunitz 도메인은 디설파이드-풍부 알파+베타 폴드를 포함한다. 이 구조는 소 췌장 트립신 저해제에 의해 예시된다. Kunitz 도메인 펩티드는 특정 단백질 구조를 인식하고 경쟁적 프로테아제 저해제로서 역할한다. 본 개시내용의 Kunitz 도메인은 엑칼란티드(Ecallantide)(인간 리포단백질-연관 응고 저해제(LACI)로부터 유래됨)를 포함할 수 있다.

[0084] 본 개시내용의 모노바디는 단일 사슬 항체와 크기면에서 필적할만한 작은 단백질이다(약 94개의 아미노산을 포함하고, 약 10 kDa의 질량을 가짐). 이들 유전적으로 조작된 단백질은 항원을 포함해 표적 서열에 특이적으로 결합한다. 본 개시내용의 모노바디는 하나 이상의 구별되는 단백질 또는 표적 서열을 특이적으로 표적화할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 개시내용의 모노바디는 인간 피브로넥틴의 구조를 모방하는 단백질 스캐폴드를 포함하고, 더욱 바람직하게는 피브로넥틴의 제10의 세포외 유형 III 도메인의 구조를 모방하는 단백질 스캐폴드를 포함한다. 피브로넥틴의 제10의 세포외 유형 III 도메인뿐만 아니라 그의 모노바디 모방체는 항체의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 해당하는 배럴을 형성하는 7개의 베타 시트 및 각 면에 3개의 노출된 루프를 함유한다. 항체의 가변 도메인의 구조에 대조적으로, 모노바디는 금속 이온에 대한 임의의 결합 부위뿐 아니라 중앙 디설파이드 결합이 결여된다. 다중특이적 모노바디는 루프 BC 및 FG를 변형시킴으로써 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 모노바디는 애드넥틴을 포함할 수 있다.

[0085] 이러한 방법은 적어도 하나의 스캐폴드 단백질을 포함하는 유효량의 조성물 또는 약제학적 조성물을, 증상, 효과 또는 기전의 이러한 조절, 치료, 개선, 예방 또는 감소를 필요로 하는 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 유효량은 단일(예를 들어, 볼러스), 다중 또는 연속 투여당 약 0.001 내지 500 mg/kg의 양, 단일, 다중 또는 연속 투여당 0.01 내지 5000 μg/ml 혈청 농도의 혈청 농도를 달성하기 위한 양 또는 본원에 기재되거나 관련 기술 분야에 알려진 바와 같은 알려진 방법을 사용하여 수행되고 결정된 바와 같은 임의의 유효 범위 또는 그 안의 값을 달성하기 위한 양을 포함할 수 있다.

[0086] ***스캐폴드 단백질의 생산 및 생성***

[0087] 본 개시내용의 적어도 하나의 스캐폴드 단백질은 당업계에 공지되어 있는 바와 같이, 세포주, 혼합된 세포주, 불멸화 세포 또는 불멸화 세포의 클론성 집단에 의해 선택적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001)]; 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]; 문헌[Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]; 문헌[Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; 문헌[Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)] 참조.

[0088] 스캐폴드 단백질로부터의 아미노산은 당업계에 알려진 바와 같이, 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화성, 온-속도, 오프-속도, 결합력, 특이성, 반감기, 안정성, 용해도 또는 임의의 기타 적합한 특성을 감소, 향상 또는 수정하도록 변경, 부가 및/또는 결실될 수 있다.

[0089] 선택적으로는, 스캐폴드 단백질은 항원에 대한 고 친화성 및 기타 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 조작될 수 있다. 상기 목표를 달성하기 위해, 스캐폴드 단백질은 모 서열 및 조작된 서열의 3차원 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념적 조작 생성물의 분석 과정에 의해 선택적으로 제조될 수 있다. 3차원 모델은 시판

중이며, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 예시하고 표시하며, 가능한 면역원성을 측정할 수 있는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다(예를 들어, 캘리포니아주 먼로비아 소재 Xencor, Inc.의 Immunofilter 프로그램). 이들 디스플레이를 검사하면 후보 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할, 즉 후보 스캐폴드 단백질의 이것의 항원에 대한 결합 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이 방식으로, 잔기는 표적 항원(들)에 대한 친화도와 같은 원하는 특성이 달성되도록 잔기가 모 및 참조 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다. 대안적으로, 또는 상기 절차에 부가하여, 다른 적절한 조작 방법이 사용될 수 있다.

[0090] ***스캐폴드 단백질의 스크리닝***

[0091] 유사한 단백질 또는 단편에 대한 특정 결합에 대해 단백질 스캐폴드를 스크리닝하는 것은 뉴클레오티드(DNA 또는 RNA 전시) 또는 펩티드 전시 라이브러리, 예를 들어 시험관 내 디스플레이를 이용하여 편의대로 달성될 수 있다. 이 방법은 원하는 기능 또는 구조를 가진 개별 멤버에 대한 펩티드의 대규모 수집품의 스크리닝을 포함한다. 표시된 뉴클레오티드 또는 펩티드 서열은 길이가 3 내지 5000개 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산, 흔히 5 내지 100개의 아미노산 길이, 종종 약 8 내지 25개의 아미노산 길이일 수 있다. 펩티드 라이브러리를 생성하기 위한 직접적인 화학적 방법 외에도 몇 가지 재조합 DNA 방법이 설명되어 있다. 한 유형은 박테리오파지 또는 세포의 표면에 펩티드 서열의 전시를 포함한다. 세포의 각 박테리오파지 또는 세포는 특정 전시된 펩티드 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이러한 방법은 국제공개 91/17271, 91/18980호, 91/19818호 및 93/08278호에 기재되어 있다.

[0092] 펩티드 라이브러리를 생성하기 위한 다른 시스템은 시험관내 화학 합성 및 재조합 방법 모두의 양태를 갖는다. 국제공개 92/05258호, 92/14843호 및 96/19256호 참조. 또한, 미국 특허 제5,658,754호; 및 제5,643,768호 참조. 펩티드 디스플레이 라이브러리, 벡터 및 스크리닝 키트는 Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재) 및 Cambridge Antibody Technologies(영국 캠브리지쇼어 소재)와 같은 공급원으로부터 상업적으로 입수 가능하다. 예를 들어, 미국 특허 제4,704,692호, 제4,939,666호, 제4,946,778호, 제5,260,203호, 제5,455,030호, 제5,518,889호, 제5,534,621호, 제5,656,730호, 제5,763,733호, 제5,767,260호, 제5856456호(Enzon에게 양도); 제5,223,409호, 제5,403,484호, 제5,571,698호, 제5,837,500호(Dyax에게 양도), 제5,427,908호, 제5,580,717호(Affymax에게 양도); 제5,885,793호(Cambridge Antibody Technologies에게 양도); 제5,750,373호(Genentech에게 양도), 제5,618,920호, 제5,595,898호, 제5,576,195호, 제5,698,435호, 제5,693,493호, 제5,698,417호(Xoma에게 양도), 상기 Colligan; 상기 Ausubel; 또는 상기 Sambrook 참조.

[0093] 본 개시내용의 스캐폴드 단백질은 광범위한 친화도(KD)로 인간 또는 기타 포유동물 단백질을 결합할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 스캐폴드 단백질은 당업자에 의해 실행되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명 또는 Kinexa 방법에 의해 결정된 바, 높은 친화도로, 예를 들어 약 $10^{-7}$ M 이하, 예컨대 비제한적으로 0.1 내지 9.9 (또는 그 안의 임의의 범위 또는 값) X $10^{-8}$, $10^{-9}$, $10^{-10}$, $10^{-11}$, $10^{-12}$, $10^{-13}$, $10^{-14}$, $10^{-15}$ 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값의 KD로 표적 단백질에 선택적으로 결합할 수 있다.

[0094] 항원에 대한 단백질 스캐폴드의 친화도 또는 결합력은 임의의 적합한 방법을 이용하여 실험적으로 결정될 수 있다. (예를 들어, 문헌[Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984)]; 문헌[Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)]; 및 본원에 기재된 방법 참조). 특정 단백질 스캐폴드-항원 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예를 들어 염 농도, pH) 하에서 측정되는 경우 달라질 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원-결합 매개변수(예를 들어, KD, Kon, Koff)의 측정은 바람직하게는 단백질 스캐폴드 및 항원의 표준화된 용액 및 표준화된 완충제, 예컨대 본원에 기재된 완충제로 수행된다.

[0095] 어떤 단백질, 항체 및 기타 길항제(antagonist)가 본 개시내용의 단백질 스캐폴드와 표적 단백질과의 결합에 대해 경쟁하고/하거나 에피토프 영역을 공유하는지 결정하기 위해, 본 발명의 단백질 스캐폴드로 경쟁적 어세이가 수행될 수 있다. 당업자에게 쉽게 알려진 이러한 어세이는 단백질 상 제한된 수의 결합 부위에 대한 길항제 또는 리간드 간의 경쟁을 평가한다. 단백질 및/또는 항체는 경쟁 전 또는 후에 고정되거나 불용화되고, 표적 단백질에 결합된 샘플은 예를 들어 디캔팅(단백질/항체가 사전불용화된 경우) 또는 원심분리(단백질/항체가 경쟁적 반응 후에 침전되는 경우)에 의해 비결합된 샘플로부터 분리된다. 또한, 경쟁적 결합은 단백질 스캐폴드의 표적 단백질에 대한 결합, 또는 그 결합의 결여에 의해 기능이 변경되는지 여부, 예를 들어 단백질 스캐폴드 분자가 예를 들어 표지의 효소적 활성을 저해 또는 강력하게 하는지 여부에 의해 결정될 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이 ELISA 및 기타 기능적 어세이가 이용될 수 있다.

[0096] ***핵산 분자***

[0097] 단백질 스캐폴드를 코딩하는 본 개시내용의 핵산 분자는 mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태와 같은 RNA의 형태, 또는 클로닝에 의해서 얻어지거나 합성으로 생성된 cDNA 및 게놈 DNA를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 DNA의 형태 또는 이들의 조합일 수 있다. DNA는 삼중-가닥, 이중-가닥, 단일-가닥 또는 이들의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 하나의 가닥의 임의의 부분은 센스 가닥으로도 알려진 코딩 가닥일 수 있거나, 안티센스 가닥으로도 지칭되는 비코딩 가닥일 수 있다.

[0098] 본 개시내용의 단리된 핵산 분자는 선택적으로 하나 이상의 인트론, 예를 들어, 비제한적으로 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 적어도 하나의 특정 부분을 갖는 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하는 핵산 분자; 표적 단백질에 결합하는 단백질 스캐폴드 또는 루프 영역에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 상기에 기재된 것과 실질적으로 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함하지만 유전자 코드의 축퇴로 인해 본원에 기재된 바와 같고/거나 당업계에 알려진 바와 같은 단백질 스캐폴드를 여전히 코딩하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론 유전자 코드는 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 특정 단백질 스캐폴드를 코딩하는 이러한 축퇴 핵산 변이체를 생성하는 것은 당업자에게 일상적일 것이다. 예를 들어, 상기 문헌[Ausubel, et al.]을 참조하기 바라며, 이러한 핵산 변이체는 본 발명에 포함된다.

[0099] 본원에 나타낸 바와 같이, 단백질 스캐폴드를 코딩하는 핵산을 포함하는 본 개시내용의 핵산 분자는 단백질 스캐폴드 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 것 자체; 전체 단백질 스캐폴드 또는 이의 일부에 대한 코딩 서열; 추가의 비코딩 서열, 예컨대, 비제한적으로 비코딩 5' 및 3' 서열, 예컨대, 전사, 스플라이싱을 비롯한 mRNA 처리 및 폴리아데닐화 신호(예를 들어, 리보좀 결합 및 mRNA의 안정성)에서 역할을 하는 전사된 미번역 서열과 함께, 단백질 스캐폴드, 단편 또는 부분에 대한 코딩 서열뿐만 아니라 추가 서열, 예컨대, 적어도 하나의 인트론과 같은 상기에 언급한 추가 코딩 서열이 있거나 없는 적어도 하나의 신호 리더 또는 융합 펩티드의 코딩 서열; 추가 아미노산을 코딩하는 추가 코딩 서열, 예컨대, 추가 기능을 제공하는 것을 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다. 따라서, 단백질 스캐폴드를 코딩하는 서열은 단백질 스캐폴드 단편 또는 부분을 포함하는 융합된 단백질 스캐폴드의 정제를 용이하게 하는 펩티드를 코딩하는 서열과 같은 마커 서열에 융합될 수 있다.

[0100] ***본원에 기재된 바와 같은 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드***

[0101] 본 개시내용은 선택적 혼성화 조건 하에서 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 본 실시형태의 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 분리, 검출 및/또는 정량화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리에서 부분 또는 전장 클론을 확인, 단리 또는 증폭하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 인간 또는 포유동물 핵산 라이브러리로부터의 cDNA에 대해 단리되거나 달리 상보적인 게놈 또는 cDNA 서열이다.

[0102] 바람직하게는, cDNA 라이브러리는 적어도 80% 전장 서열, 바람직하게는 적어도 85% 또는 90% 전장 서열, 보다 바람직하게는 적어도 95% 전장 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 정규화되어 희귀 서열의 표현을 증가시킬 수 있다. 낮은 또는 중간 엄격성 혼성화 조건은 일반적으로 상보적 서열에 비해 감소된 서열 동일성을 갖는 서열과 함께 사용되지만 배타적이지는 않다. 중간 및 높은 엄격성 조건은 더 큰 동일성의 서열에 대해 선택적으로 사용될 수 있다. 낮은 엄격성 조건은 약 70%의 서열 동일성을 갖는 서열의 선택적 혼성화를 가능하게 하고, 오쏘로그 또는 파라로그 서열을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0103] 선택적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 단백질 스캐폴드의 적어도 일부를 코딩할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 선택적 혼성화에 사용될 수 있는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어 상기 문헌[Ausubel]; 상기 문헌[Colligan]을 참조하며, 이들 각각은 본원에서 참조로 통합되어 있다.

[0104] ***핵산의 작제***

[0105] 본 개시내용의 단리된 핵산은 당분야에서 공지된 (a) 재조합 방법, (b) 합성 기법, (c) 정제 기법 및/또는 (d) 이들의 조합을 이용함으로써 제조될 수 있다.

[0106] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 이외의 서열을 편의대로 포함할 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 핵산 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중클로닝 부위를 핵산 내로 삽입하여 폴리뉴클레오티드의 단리를 도울 수 있다. 또한, 번역 가능한 서열을 삽입하여 본 개시내용의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 도울 수 있다. 예를 들면, 헥사-히스티딘 마커 서열은 본 개시내용의 단백질을 정제하는 편리한 수단을 제공한다. 코딩 서열을

제외한 본 개시내용의 핵산은 선택적으로 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터 또는 링커이다.

[0107] 추가 서열을 이러한 클로닝 및/또는 발현 서열에 추가하여 클로닝 및/또는 발현에 있어서 이들의 작용을 최적화함으로써, 폴리뉴클레오티드의 단리를 도울 수 있거나, 세포 내로의 폴리뉴클레오티드의 도입을 개선할 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터 및 링커의 사용은 당분야에서 공지되어 있다. (예를 들면, 상기 문헌[Ausubel]; 또는 상기 문헌[Sambrook] 참조).

[0108] ***핵산을 작제하는 재조합 방법***

[0109] 본 개시내용의 단리된 핵산 조성물, 예컨대, RNA, cDNA, 게놈 DNA 또는 이들의 임의의 조합은 당분야에서 숙련된 자에게 알려진 임의의 수의 클로닝 방법을 이용함으로써 생물학적 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엄격한 조건 하에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에서 원하는 서열을 확인하는 데 사용된다. RNA의 단리, 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의 작제는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지되어 있다. (예를 들면, 상기 문헌[Ausubel]; 또는 상기 문헌[Sambrook] 참조).

[0110] ***핵산 스크리닝 및 단리 방법***

[0111] 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 서열에 기반한 프로브를 사용하여 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 프로브는 게놈 DNA 또는 cDNA 서열과 하이브리드화시켜 동일한 또는 상이한 유기체에서 상동성 유전자를 단리하는 데 사용될 수 있다. 당분야에서 숙련된 자는 하이브리드화의 다양한 엄격도가 어세이에서 사용될 수 있고, 하이브리드화 또는 세척 매질이 엄격할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 하이브리드화를 위한 조건이 더 엄격해질수록, 이중체 형성이 일어나기 위해서는 프로브와 표적 사이에 더 큰 정도의 상보성이 있어야 한다. 엄격도는 온도, 이온 강도, pH 및 부분적 변성 용매, 예컨대, 포름아미드의 존재 중 하나 이상에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 하이브리드화의 엄격도는 예를 들면, 포름아미드의 농도를 0% 내지 50%의 범위 내에서 조작하여 반응물 용액의 극성을 변화시킴으로써 편의대로 변경된다. 검출 가능한 결합을 위해 요구되는 상보성(서열 동일성)의 정도는 하이브리드화 매질 및/또는 세척 매질의 엄격도에 따라 달라질 것이다. 상보성의 정도는 최적으로 100%, 또는 70% 내지 100%, 또는 이 범위 내의 임의의 범위 또는 값일 것이다. 그러나, 프로브 및 프라이머의 미미한 서열 변이는 하이브리드화 및/또는 세척 매질의 엄격도를 감소시킴으로써 보상될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0112] RNA 또는 DNA 증폭 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 본원에 제시된 교시 및 지침에 기반하여, 과도한 실험 없이 본 개시내용에 따라 이용될 수 있다.

[0113] 알려진 DNA 또는 RNA 증폭 방법은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 및 관련 증폭 방법(예를 들면, 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호, 제4,800,159호, 제4,965,188호(Mullis, et al.); 제4,795,699호 및 제4,921,794호(Tabor, et al); 제5,142,033호(Innis); 제5,122,464호(Wilson, et al.); 제5,091,310호(Innis); 제5,066,584호(Gyllensten, et al); 제4,889,818호(Gelfand, et al); 제4,994,370호(Silver, et al); 제4,766,067호(Biswas); 제4,656,134호(Ringold) 참조), 및 이중 가닥 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 대한 안티센스 RNA를 사용하는 RNA 매개 증폭(미국 특허 제5,130,238호(Malek, et al), 상표명 NASBA)을 포함하나, 이들로 제한되지 않고, 이 참고문헌들의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다. (예를 들면, 상기 문헌[Ausubel]; 또는 상기 문헌[Sambrook] 참조).

[0114] 예를 들면, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술은 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 및 관련 유전자의 서열을 직접적으로 증폭하는 데 이용될 수 있다. PCR 및 다른 시험관내 증폭 방법은 예를 들면, 발현될 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 클로닝, 샘플에서 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용할 핵산의 제조, 핵산 서열분석, 또는 다른 목적에 유용할 수도 있다. 시험관내 증폭 방법을 통해 숙련된 자를 안내하기에 충분한 기법의 예는 상기 문헌[Berger], 상기 문헌[Sambrook] 및 상기 문헌[Ausubel]뿐만 아니라, 미국 특허 제4,683,202호(Mullis, et al.)(1987) 및 문헌[Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990)]에서도 확인된다. 상업적으로 입수가능한 게놈 PCR 증폭용 키트는 당분야에서 알려져 있다. 예를 들면, 어드밴티지(Advantage)-GC 게놈 PCR 키트(Clontech)를 참조한다. 추가로, 예를 들면, T4 유전자 32 단백질(Boehringer Mannheim)을 사용하여 긴 PCR 생성물의 수율을 개선할 수 있다.

[0115] ***핵산 작제를 위한 합성 방법***

[0116] 본 개시내용의 단리된 핵산은 알려진 방법에 의한 직접적인 화학적 합성에 의해 제조될 수도 있다(예를 들면, 상기 문헌[Ausubel, et al.,] 참조). 화학적 합성은 일반적으로 상보적 서열과의 하이브리드화에 의해, 또는 주형으로서 단일 가닥을 사용하는 DNA 폴리머라제에 의한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 생성한다. 당분야에서 숙련된 자는 DNA의 화학적 합성이 약 100개 이상의 염기의 서열로 제한될 수 있지만, 더 긴 서열이 더 짧은 서열의 라이게이션에 의해 수득될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0117] ***재조합 발현 카세트***

[0118] 본 개시내용은 본 개시내용의 핵산을 포함하는 재조합 발현 카세트도 제공한다. 본 개시내용의 핵산 서열, 예를 들면, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 cDNA 또는 게놈 서열은 적어도 하나의 원하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있는 재조합 발현 카세트를 작제하는 데 사용될 수 있다. 재조합 발현 카세트는 전형적으로 의도된 숙주 세포에서 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 전사를 유도할 전사 개시 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 이종 프로모터 및 비-이종(즉, 내인성) 프로모터 둘 다가 본 개시내용의 핵산의 발현을 유도하는 데 사용될 수 있다.

[0119] 일부 실시형태에서, 프로모터, 인핸서 또는 다른 요소로서 사용되는 단리된 핵산을 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 비-이종 형태의 적절한 위치(업스트림, 다운스트림 또는 인트론)에 도입하여, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 발현을 상향 또는 하향 조절할 수 있다. 예를 들면, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체내 또는 시험관내에서 변경될 수 있다.

[0120] ***벡터 및 숙주 세포***

[0121] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 재조합 벡터로 유전적으로 조작된 숙주 세포, 및 당업계에 공지된 바와 같은 재조합 기술에 의한 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 제조에 관한 것이다. 예를 들어 상기 문헌[Sambrook, et al.]; 상기 문헌[Ausubel, et al.]을 참조하며, 이들 각각은 본원에서 참조로 통합되어 있다.

[0122] 예를 들어, PB-EF1a 벡터가 이용될 수 있다. 벡터는 하기의 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

tgtacatagattaaccctagaaagataatcatattgtgacgtacgttaaagataatcatgcgtaaaattgacgcatgtgttttatcggtctgta
tatcgaggtttatttattaatttgaatagatattaagttttattatatttacacttacatactaataataaattcaacaaacaatttatttatgtttattt
atttattaaaaaaaaacaaaaactcaaaatttcttctataaagtaacaaaacttttatcgaatacctgcagcccgggggatgcagagggac
agcccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctcccccgctaggggcagcagcgagccgcccggggctccgctccg
gtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcgggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcct
ctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggatacggggaaaagttgactgtgcctttcgatcgaaccatggaca
gttagctttgcaaagatggataaagttttaaacagagaggaatctttgcagctaatggaccttctaggtcttgaaaggagtgggaattggc
tccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcct
agagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataa
gtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggc
ctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgg
gtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgt
gcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttct
ggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtc
ccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgc
tctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaa
agatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccaca
caaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttct
cgagcttttggagtacgtcgtctttaggttggggggagggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagtta
ggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagt
ttttttcttccatttcaggtgtcgtgagaattctaatacgactcactatagggtgtgctgtctcatcattttggcaaagattggccaccaagctt
gtcctgcaggagggtcgacgcctctagacgggcggccgctccggatccacgggtaccgatcacatatgccttaattaaacactagtt
ctatagtgtcacctaaattccctttagtgagggttaatggccgtaggccgccagaattgggtccagacatgataagatacattgatgagtt
tggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaat
aaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggggaggtgtgggaggttttttcggactctaggacctgcgcatg
cgcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttca
gaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggggagcgccgga
ccggagcggagccccgggcggctcgctgctgcccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggc
tgtccctctcaccgcggtggagctccagcttttgttcgaattggggccccccctcgagggtatcgatgatatctataacaagaaaatatat
atataataagttatcacgtaagtagaacatgaaataacaatataattatcgtatgagttaaatcttaaaagtcacgtaaaagataatcatgcg
tcattttgactcacgcggtcgttatagttcaaaatcagtgacacttaccgcattgacaagcacgcctcacgggagctccaagcggcgact
gagatgtcctaaatgcacagcgacggattcgcgctatttagaaagagagagcaatatttcaagaatgcatgcgtcaattttacgcagact
[0123] atctttctagggttaatctagctagccttaagggcgcctattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagc

tgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcg
gtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaa
catgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttct
gcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaa
ggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcacc
gcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgata
gttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactg
agatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcg
gaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcg
tcgatttttgtgat ㄱ gctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctg
gcctttgctcacatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagt
aaacttggtctgacagtcagaagaactcgtcaagaaggcgatagaaggcgatgcgctgcgaatcgggagcggcgataccgtaaagc
acgaggaagcggtcagcccattcgccgccaagctcttcagcaatatcacgggtagccaacgctatgtcctgatagcggtccgccaca
cccagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcggccattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcgccatgggtcacgacg
agatcctcgccgtcgggcatgctcgccttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagcccctgatgctcttcgtccagatcatcct
gatcgacaagaccggcttccatccgagtacgtgctcgctcgatgcgatgtttcgcttggtggtcgaatgggcaggtagccggatcaag
cgtatgcagccgccgcattgcatcagccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgccccggcac
ttcgcccaatagcagccagtcccttcccgcttcagtgacaacgtcgagcacagctgcgcaaggaacgcccgtcgtggccagccacg
atagccgcgctgcctcgtcttgcagttcattcagggcaccggacaggtcggtcttgacaaaaagaaccgggcgcccctgcgctgaca
gccggaacacggcggcatcagagcagccgattgtctgttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccacccaagcggccggagaa
cctgcgtgcaatccatcttgttcaatcataatattattgaagcatttatcagggttcgtctcgtcccggtctcctcccaatgcatgtcaatattg
gccattagccatattattcattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttgtatctatatcataata

[0124] (서열번호 40)

[0125] 폴리뉴클레오티드는 선택적으로 숙주에서 증식을 위한 선택 마커를 함유하는 벡터에 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 칼슘 포스페이트 침전물과 같은 침전물에서, 또는 하전된 지질을 가진 복합체에서 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 이것은 적절한 패키징 세포주를 이용하여 시험관 내 패키징된 다음 숙주 세포내로 도입될 수 있다.

[0126] DNA 삽입물은 적절한 프로모터에 작동적으로 연결되어져야 한다. 발현 작제물은 전사 개시, 종결을 위한 부위, 및 전사된 영역 내의 번역을 위한 리보좀 결합 부위를 추가로 포함할 것이다. 상기 작제물에 의해 발현된 성숙 전사체의 코딩 부분은 바람직하게는 시작 부위의 번역 개시 코돈, 및 번역될 mRNA의 말단에 적절하게 위치된 종결 코돈(예를 들면, UAA, UGA 또는 UAG)을 포함할 것이고, 이때 UAA 및 UAG가 포유동물 또는 진핵생물 세포 발현을 위해 바람직하다.

[0127] 발현 벡터는 바람직하게는, 그러나 선택적으로 적어도 하나의 선택 마커를 포함할 것이다. 이러한 마커는 예를 들면, 앰피실린, 제오신(*Sh ble* 유전자), 퓨로마이신(*pac* 유전자), 하이그로마이신 B(*hygB* 유전자), G418/제네티신(*neo* 유전자), 마이코페놀산 또는 글루타민 신테타제(GS, 미국 특허 제5,122,464호; 제5,770,359호; 및 제5,827,739호), 블라스티시딘(blasticidin)(*bsd* 유전자), 진핵생물 세포 배양을 위한 내성 유전자뿐만 아니라, 앰피실린, 제오신(*Sh ble* 유전자), 퓨로마이신(*pac* 유전자), 하이그로마이신 B(*hygB* 유전자), G418/제네티신(*neo* 유전자), 카나마이신, 스펙티노마이신, 스트렙토마이신, 카르베니실린, 블레오마이신, 에리트로마이신, 폴리믹신 B, 또는 이. 콜라이 및 다른 세균 또는 원핵생물에서의 배양을 위한 테트라사이클린 내성 유전자도 포함하나, 이들로 제한되지 않는다(상기 특허들은 전체적으로 본원에 참고로 포함됨). 전술된 숙주 세포에 적합한 배양 배지 및 조건은 당분야에서 알려져 있다. 적합한 벡터는 숙련된 당업자에게 용이하게 자명할 것이다. 숙주 세포 내로의 벡터 작제물의 도입은 인산칼슘 트랜스펙션, DEAE-덱스트란 매개 트랜스펙션, 양이온성 지질 매개 트랜스펙션, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 이러한 방법은 당분야, 예컨대, 상기 문헌[Sambrook]의 제1장 내지 제4장 및 제16장 내지 제18장; 상기 문헌[Ausubel]의 제1장, 제9장,

제13장, 제15장 및 제16장에 기재되어 있다.

[0128] 발현 벡터는 바람직하게는, 그러나 선택적으로 본 개시내용의 조성물 및 방법에 의해 변형된 세포의 단리를 위한 적어도 하나의 선택 세포 표면 마커를 포함할 것이다. 본 개시내용의 선택 세포 표면 마커는 표면 단백질, 당단백질, 또는 세포 또는 세포의 서브세트를 세포의 또 다른 한정된 서브세트와 구별하는 일군의 단백질들을 포함한다. 바람직하게는, 선택 세포 표면 마커는 본 개시내용의 조성물 또는 방법에 의해 변형된 세포를, 본 개시내용의 조성물 또는 방법에 의해 비변형된 세포와 구별한다. 이러한 세포 표면 마커는 예를 들면, "지정의 클러스터" 또는 "분류 결정인자" 단백질(종종 "CD"로서 약칭됨), 예컨대, 절두형 또는 전체 길이 형태의 CD19, CD271, CD34, CD22, CD20, CD33, CD52 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 세포 표면 마커는 자살 유전자 마커 RQR8(문헌[Philip B et al. Blood. 2014 Aug 21; 124(8):1277-87])을 추가로 포함한다.

[0129] 발현 벡터는 바람직하게는, 그러나 선택적으로 본 개시내용의 조성물 및 방법에 의해 변형된 세포의 단리를 위한 적어도 하나의 선택 약물 내성 마커를 포함할 것이다. 본 개시내용의 선택 약물 내성 마커는 야생형 또는 돌연변이체 Neo, DHFR, TYMS, FRANCF, RAD51C, GCS, MDR1, ALDH1, NKX2.2 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0130] 본 개시내용의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드는 변형된 형태, 예컨대, 융합 단백질로 발현될 수 있고, 분비 신호뿐만 아니라 추가 이종 기능 영역도 포함할 수 있다. 예를 들면, 추가 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역을 단백질 스캐폴드의 N-말단에 추가하여, 정제 동안 또는 후속 취급 및 보관 동안 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선할 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티를 본 개시내용의 단백질 스캐폴드에 추가하여 정제를 용이하게 할 수 있다. 이러한 영역은 서열 또는 이의 적어도 하나의 단편의 최종 제조 전에 제거될 수 있다. 이러한 방법은 많은 표준 검사실 매뉴얼들, 예컨대, 상기 문헌[Sambrook]의 제17.29장 내지 제17.42장 및 제18.1장 내지 제18.74장; 및 상기 문헌[Ausubel]의 제16장, 제17장 및 제18장에 기재되어 있다.

[0131] 당분야에서 통상의 기술을 가진 자는 본 개시내용의 단백질을 코딩하는 핵산의 발현을 위해 사용될 수 있는 다수의 발현 시스템들을 잘 알고 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 핵산은 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포에서 (조작에 의해) 켜짐으로써 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,580,734호, 제5,641,670호, 제5,733,746호 및 제5,733,761호에 기재되어 있는 바와 같이 당분야에서 공지되어 있다.

[0132] 단백질 스캐폴드, 이의 특정된 부분 또는 변이체의 생성에 유용한 예시적 세포 배양물은 당분야에서 알려진 세균, 효모 및 포유동물 세포이다. 포유동물 세포 시스템은 종종 세포의 단층의 형태로 존재할 것이지만, 포유동물 세포 현탁액 또는 생물반응기도 사용될 수 있다. 온전한 글리코실화된 단백질을 발현할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주들은 당분야에서 개발되었고, 예를 들면, 버지니아주 마나사스 소재의 American Type Culture Collection(www.atcc.org)으로부터 용이하게 입수될 수 있는 COS-1(예를 들면, ATCC CRL 1650), COS-7(예를 들면, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21(예를 들면, ATCC CRL-10), CHO(예를 들면, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1(예를 들면, ATCC CRL-26) 세포주, Cos-7 세포, CHO 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포, HeLa 세포 등을 포함한다. 바람직한 숙주 세포는 림프 유래 세포, 예컨대, 골수종 및 림프종 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 P3X63Ag8.653 세포(ATCC 수탁번호 CRL-1580) 및 SP2/0-Ag14 세포(ATCC 수탁번호 CRL-1851)이다. 특히 바람직한 실시형태에서, 재조합 세포는 P3X63Ab8.653 또는 SP2/0-Ag14 세포이다.

[0133] 이 세포들을 위한 발현 벡터는 하기 발현 조절 서열들, 예컨대, 복제 기점; 프로모터(예를 들면, 후기 또는 초기 SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국 특허 제5,168,062호 및 제5,385,839호), HSV tk 프로모터, pgk(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국 특허 제5,266,491호), 적어도 하나의 인간 프로모터; 인핸서, 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예컨대, 리보좀 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위(예를 들면, SV40 큰 T Ag 폴리A 추가 부위); 및 전사 터미네이터 서열(그러나, 이들로 제한되지 않음) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 문헌[Ausubel et al.]; 및 상기 문헌[Sambrook, et al.]을 참조한다. 본 발명의 핵산 또는 단백질의 생성에 유용한 다른 세포는 예를 들면, 세포주 및 하이브리도마의 American Type Culture Collection 카탈로그(www.atcc.org), 또는 다른 알려진 또는 상업적 공급원으로부터 알려져 있고/있거나 입수될 수 있다.

[0134] 진핵생물 숙주 세포가 사용될 때, 폴리아데닐화 또는 전사 터미네이터 서열이 전형적으로 벡터 내에 포함된다. 터미네이터 서열의 일례는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이다. 전사체의 정확한 스플라이싱을 위한 서열도 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 일례는 SV40으로부터의 VP1 인트론이다(문헌[Sprague, et

al., J. Virol. 45:773-781 (1983)]). 추가로, 당분야에서 알려진 바와 같이, 숙주 세포에서 복제를 조절하는 유전자 서열이 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0135] ***단백질 스캐폴드의 정제***

[0136] 단백질 스캐폴드는 단백질 A 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 공지된 방법에 의해서 재조합 세포 배양물로부터 회수되고, 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC")가 또한 정제에 사용될 수 있다. 예를 들어, 각각의 전문이 참조에 의해 본원에 포함된 문헌[Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)](예를 들어, 챕터 1, 4, 6, 8, 9, 10) 참조.

[0137] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 자연적으로 정제된 생성물, 화학적 합성 절차의 생성물, 및 예를 들어, 이. 콜라이, 효모, 고등 식물, 곤충 및 포유동물 세포를 포함하는 원핵 또는 진핵 숙주로부터의 재조합 기술에 의해 생산된 생성물을 포함한다. 재조합 생산 절차에 사용되는 숙주에 따라, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 글리코실화되거나 글리코실화되지 않을 수 있다. 이러한 방법은 많은 표준 검사실 매뉴얼, 예컨대, 모두 전문이 참조에 의해 본원에 포함된 상기 문헌[Sambrook, Sections 17.37-17.42]; 상기 문헌[Ausubel, Chapters 10, 12, 13, 16, 18 and 20], 상기 문헌[Colligan, Protein Science, Chapters 12-14]에 기재되어 있다.

[0138] ***아미노산 코드***

[0139] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 구성하는 아미노산은 종종 약칭된다. 아미노산 표기는 당분야에서 잘 이해되는 바와 같이 아미노산을 그의 단일 문자 코드, 그의 세 문자 코드, 명칭, 또는 3개 뉴클레오티드 코돈(들)으로 표기함으로써 표시될 수 있다(문헌[Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994] 참조). 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 본원에 특정된 바와 같이 자연 돌연변이 또는 인간 조작으로부터의 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 추가를 포함할 수 있다. 기능을 위해 필수적인, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드의 아미노산은 당분야에서 알려진 방법, 예컨대, 부위 지정 돌연변이유발 또는 알라닌 스캐닝 돌연변이유발에 의해 확인될 수 있다(예를 들면, 상기 문헌[Ausubel], 제8장 및 제15장; 문헌[Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)]). 후자 절차인 알라닌 스캐닝 돌연변이유발은 분자의 모든 잔기에서 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 그 다음, 생물학적 활성, 예컨대, 적어도 하나의 중화 활성(그러나, 이것으로 제한되지 않음)에 대해 생성된 돌연변이체 분자를 시험한다. 단백질 스캐폴드 결합에 결정적인 부위도 구조 분석, 예컨대, 결정화, 핵 자기 공명 또는 광친화성 표지에 의해 확인될 수 있다(문헌[Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992)] 및 문헌[de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)]).

[0140] 숙련된 자가 인식할 바와 같이, 본 발명은 적어도 하나의 본 개시내용의 생물학적 활성 단백질 스캐폴드를 포함한다. 생물학적 활성 단백질 스캐폴드는 천연(비-합성), 내인성 또는 관련 알려진 단백질 스캐폴드의 비활성의 적어도 20%, 30% 또는 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 60% 또는 70%, 가장 바람직하게는 적어도 80%, 90% 또는 95% 내지 99% 이상의 비활성을 가진다. 효소 활성 및 기질 특이성의 측정치를 어세이하고 정량하는 방법은 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있다.

[0141] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 유기 모이어티의 공유 부착에 의해 변형된, 본원에 기재된 단백질 스캐폴드 및 단편에 관한 것이다. 이러한 변형은 개선된 약동학적 성질(예를 들면, 증가된 생체내 혈청 반감기)를 가진 단백질 스캐폴드 단편을 생성할 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지된 친수성 중합체 기, 지방산 기 또는 지방산 에스테르 기일 수 있다. 특정 실시형태에서, 친수성 중합체 기는 약 800 내지 약 120,000 달톤의 분자량을 가질 수 있고 폴리알칸 글리콜(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜(PPG)), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 기는 약 8개 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0142] 본 개시내용의 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 공유결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드 또는 단편에 결합된 각각의 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체 기, 지방산 기 또는 지방산 에스테르 기일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "지방산"은 모노카르복실산 및 디카르복실산을 포괄한다. 본원에서 사용되는 용어 "친수성 중합체 기"는 옥탄보다 물에서 더 잘 용해될 수 있는 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들면, 폴리리신은 옥탄보다 물에서 더 잘 용해

될 수 있다. 따라서, 폴리리신의 공유부착에 의해 변형된 단백질 스캐폴드는 본 개시내용에 의해 포괄된다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키기에 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지된 친수성 중합체일 수 있고, 예를 들면, 폴리알칸 글리콜(예를 들면, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜(mPEG), PPG 등), 탄수화물(예를 들면, 덱스트란, 셀룰로스, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드 등), 친수성 아미노산의 중합체(예를 들면, 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리아스파르테이트 등), 폴리알칸 옥시드(예를 들면, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게는 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 분자 독립체로서 약 800 내지 약 150,000 달톤의 분자량을 가진다. 예를 들면, 숫자가 달톤 단위의 중합체 평균 분자량인 PEG5000 및 PEG20,000이 사용될 수 있다. 친수성 중합체 기는 1개 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환된 친수성 중합체는 적합한 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 아민 기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트에 커플링될 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트(예를 들면, N,N-카르보닐 디이미다졸에 의해 활성화됨)는 중합체 상의 하이드록실 기에 커플링될 수 있다.

[0143] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키기에 적합한 지방산 및 지방산 에스테르는 포화될 수 있거나 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다.본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 데 적합한 지방산은 예를 들어 n-도데카노에이트(C12, 라우레이트), n-테트라데카노에이트(C14, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트(C18, 스테아레이트), n-에이코사노에이트(C20, 아라키데이트), n-도코사노에이트(C22, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트(C30), n-테트라콘타노에이트(C40), 시스-Δ9-옥타데카노에이트(C18, 올레에이트), 모두 시스-Δ5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트(C20, 아라키도네이트), 옥탄디산, 테트라데칸디산, 옥타데칸디산, 도코산디산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르는 선형 또는 분지형 저급 알킬 기를 포함하는 디카르복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬기는 1 내지 약 12개, 바람직하게는 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0144] 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 하나 이상의 변형제와의 반응과 같은 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "변형제"는 활성화기를 포함하는 적합한 유기기(예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 지칭한다."활성화기"는 적절한 조건 하에서 두 번째 화학기와 반응하여 기질제와 두 번째 화학기 사이에 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화기는 친전자성기, 예컨대, 토실레이트, 메실레이트, 할로(클로로, 브로모, 플루오로, 아이오도), N-하이드록시석신이미딜 에스테르(NHS) 등을 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성기는 예를 들어, 말레이미드, 아이오도아세틸, 아크릴롤릴, 피리딜 디설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올(TNB-티올) 등을 포함한다. 알데하이드 작용기는 아민- 또는 하이드라지드-함유 분자에 커플링될 수 있고, 아지드기는 3가 인기와 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포르이미드 결합을 형성할 수 있다. 활성화기를 분자에 도입하는 적합한 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)] 참조). 활성화기는 유기기(예를 들어, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접 결합되거나 링커 모이어티, 예를 들어, 하나 이상의 탄소 원자가 산소, 질소 또는 황과 같은 헤테로원자로 대체될 수 있는 2가 C1-C12 기를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티는 예를 들어, 테트라에틸렌 글리콜, -(CH2)3-, -NH-(CH2)6-NH-, -(CH2)2-NH- 및 -CH2-O-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CH-NH-을 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 변형제는 예를 들어, 모노-Boc-알킬디아민(예를 들어, 모노-Boc-에틸렌디아민, 모노-Boc-디아미노헥산)을 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)의 존재 하에 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 생성될 수 있다. Boc 보호기는 기술된 바와 같이 또 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있는 1차 아민을 노출시키기 위해 트리플루오로아세트산(TFA)으로 처리함으로써 생성물로부터 제거될 수 있거나, 말레산 무수물과 반응시킬 수 있고 생성된 생성물은 고리화되어 지방산의 활성화된 말레이미도 유도체를 생성할 수 있다. (예를 들어, Thompson 등의 국제공개 WO 92/16221호, 이의 전체 교시는 참조에 의해 본원에 포함됨)

[0145] 본 개시내용의 변형된 단백질 스캐폴드는 단백질 스캐폴드 또는 단편을 변형제와 반응시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티는 아민-반응성 변형제, 예를 들어 PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 비-부위특이적 방식으로 단백질 스캐폴드에 결합될 수 있다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드의 특정 부위에 결합된 유기 모이어티를 포함하는 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 적합한 방법, 예컨대, 역 단백질분해(문헌[Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992)]; 문헌[Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994)]; 문헌[Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997)]; 문헌[Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996)]; 문헌[Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)]), 및 문헌[Hermanson, G.

T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)]에 기재된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0146] ***추가 치료 활성 성분을 포함하는 단백질 스캐폴드 조성물***

[0147] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드 화합물, 조성물 또는 이들의 조합물은 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제, 아주반트 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 적어도 하나의 임의의 적합한 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 보조제가 바람직하다. 상기 멸균 용액의 제조 방법의 비제한적 예는 문헌[Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990]을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 문헌에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 바와 같이 단백질 스캐폴드, 단편 또는 변이체 조성물의 투여 모드, 용해도 및/또는 안정성에 적합하도록 통상적으로 선택될 수 있다.

[0148] 본 발명의 조성물에 유용한 약제학적 부형제 및 첨가제는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지방, 및 탄수화물(예를 들어, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당과 같은 당류; 알디톨, 알돈산, 에스테르화된 당 등과 같은 유도체화된 당; 및 다당류 및 당 중합체)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 이들은 단독으로 또는 조합하여 존재할 수 있고, 단독으로 또는 조합으로 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%를 구성한다. 예시적인 단백질 부형제는 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴, 카제인 등과 같은 혈청 알부민을 포함한다. 완충 용량에서도 기능할 수 있는 대표적인 아미노산/항체 성분은 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 류신, 아이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 바람직한 아미노산은 글리신이다.

[0149] 본 발명에 사용하기 적합한 탄수화물 부형제는 예를 들어 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등의 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등의 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분 등의 다당류; 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨), 마이오이노시톨 등의 알디톨을 포함한다. 본 발명에 사용하기 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스, 및 라피노스이다.

[0150] 단백질 스캐폴드는 완충제 또는 pH 조절제를 포함할 수 있으며; 일반적으로, 완충제는 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제는 시트르산, 아스코르브산, 글루콘산, 탄산, 타르타르산, 석신산, 아세트산, 또는 프탈산의 염과 같은 유기산염; Tris, 트로메타민 염산, 또는 인산염 완충제를 포함한다. 본 발명에 사용하기 바람직한 완충제는 시트레이트와 같은 유기산 염이다.

[0151] 추가로, 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 중합체 부형제/첨가제, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈, 피콜(중합체성 당), 덱스트레이트(예를 들어, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린과 같은 사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향료, 항미생물제, 감미제, 항산화제, 정균제, 계면활성제(예를 들어, "트윈 20" 및 "트윈 80"과 같은 폴리소르베이트), 지질(예를 들어, 인지질, 지방산), 스테로이드(예를 들어, 콜레스테롤), 및 킬레이팅제(예를 들어, EDTA)를 포함할 수 있다.

[0152] 본 발명에 따른 단백질 스캐폴드, 일부 또는 변이체 조성물에 사용하기 적합한 상기 및 추가의 알려진 약제학적 부형제 및/또는 첨가제는 예를 들어 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995)], 및 문헌["Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998)]에 나열된 바와 같이 당업계에 알려져 있고, 상기 문헌의 개시내용은 당업계에 알려져 있다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물(예를 들어, 당류 및 알디톨) 및 완충제(예를 들어, 시트레이트) 또는 중합체 물질이다. 예시적인 담체 분자는 뮤코다당류, 히알루론산이고, 이것은 관절내 전달에 유용할 수 있다.

[0153] ***백혈구 성분채집술 생성물로부터의 T 세포 단리***

[0154] 백혈구 성분채집술 생성물 또는 혈액은 폐쇄된 시스템 및 표준 방법(예를 들면, COBE 스펙트라 성분채집술 시스템)을 이용함으로써 임상 장소에서 대상체로부터 수집될 수 있다. 바람직하게는, 상기 생성물은 표준 병원 또는 기관 백혈구 성분채집술 절차에 따라 표준 백혈구 성분채집술 수집 백 내에 수집된다. 예를 들면, 본 개시내용의 방법의 바람직한 실시형태에서, 백혈구 성분채집술 동안 통상적으로 사용되는 항응고제 또는 혈액 첨가제 이외의 추가 항응고제 또는 혈액 첨가제(헤파린 등)는 포함되지 않는다.

[0155] 대안적으로, 백혈구 세포(WBC)/말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(바이오세이프 세팍스(Biosafe Sepax) 2(폐쇄/자동화됨)를 이용함) 또는 T 세포(CliniMACS® 프로디지(Prodigy)(폐쇄/자동화됨)를 이용함)는 전혈로부터 직접적으로

단리될 수 있다. 그러나, 일부 대상체들(예를 들면, 암으로 진단되고/되거나 암 치료를 받은 대상체들)에서, WBC/PBMC 수율은 백혈구 성분채집술에 의해 단리된 때보다 전혈로부터 단리된 때 유의미하게 더 낮을 수 있다.

[0156] 백혈구 성분채집술 절차 및/또는 직접적인 세포 단리 절차 중 어느 하나가 본 개시내용의 임의의 대상체를 위해 이용될 수 있다.

[0157] 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 절연된 용기 내에 채워 넣어져야 하고 임상 프로토콜과 함께 사용되도록 승인된 표준 병원 기관 혈액 수집 절차에 따라 조절된 실온(+19℃ 내지 +25℃)에서 보관되어야 한다. 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 냉장되지 않아야 한다.

[0158] 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 세포 농도는 수송 동안 mL당 $0.2x10^9$개 세포를 초과하지 않아야 한다. 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 강력한 혼합은 피해져야 한다.

[0159] 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 예를 들면, 하룻밤 동안 보관되어야 하는 경우, 조절된 실온(전술된 바와 동일한 온도)에서 보관되어야 한다. 보관 동안, 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 농도는 mL당 $0.2x10^9$개 세포를 초과하지 않아야 한다.

[0160] 바람직하게는, 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 세포는 자가 혈장에 보관되어야 한다. 특정 실시형태에서, 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 세포 농도가 mL당 $0.2x10^9$개 세포보다 더 높은 경우, 상기 생성물은 자가 혈장에 의해 희석되어야 한다.

[0161] 바람직하게는, 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 표지 및 분리 절차를 시작할 때 24시간보다 더 오래되지 않아야 한다. 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 폐쇄되고/되거나 자동화된 시스템(예를 들면, CliniMACS 프로디지)을 이용함으로써 세포 표지를 위해 프로세싱될 수 있고/있거나 준비될 수 있다.

[0162] 자동화된 시스템은 가능하게는 피콜레이션(ficolation)에 의한 추가 버피 코트 단리, 및/또는 세포 생성물(예를 들면, 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물)의 세척을 수행할 수 있다.

[0163] 폐쇄되고/되거나 자동화된 시스템은(예를 들면, 백혈구 성분채집술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물로부터의) T 세포 단리를 위해 세포를 준비하고 표지하는 데 이용될 수 있다.

[0164] WBC/PBMC가 직접적으로 뉴클레오펙션될 수 있을지라도(더 용이하고 추가 단계를 피하게 함), 본 개시내용의 방법은 뉴클레오펙션 전에 먼저 T 세포를 단리하는 단계를 포함할 수 있다. 더 용이한 전략인 PBMC의 직접적인 뉴클레오펙션은 T 세포를 작용적으로 소진되게 만듦으로써 생성물의 생체내 효율을 직접적으로 감소시키는 좋지 않은 확장 방법임을 그 자체로 입증하는, CAR 신호전달을 통해 매개되는 CAR+ 세포의 선택적 확장을 요구한다. 생성물은 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 단핵구 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 CAR+ 세포의 불균질한 조성물일 수 있고, 이 점은 환자와 환자 사이의 생성물의 가변성을 증가시키고 투약 및 CRS 관리를 더 어렵게 만든다. T 세포가 종양 억제 및 사멸에 있어서 일차 이펙터인 것으로 생각되기 때문에, 자가 생성물의 제조를 위한 T 세포 단리는 다른 더 불균질한 조성물에 비해 상당한 이점을 야기할 수 있다.

[0165] T 세포는 일방향 표지 절차에서 표지된 세포의 농축 또는 표지된 세포의 고갈에 의해 직접적으로 단리될 수 있거나, 2-단계 표지 절차에서 간접적으로 단리될 수 있다. 본 개시내용의 일부 농축 전략에 따라, T 세포는 세포 수집 백 내에 수집될 수 있고, 라벨링되지 않은 세포(비-표적 세포)는 음성 분획 백 내에 수집될 수 있다. 본 개시내용의 농축 전략과 대조적으로, 표지되지 않은 세포(표적 세포)는 세포 수집 백 내에 수집되고, 표지된 세포(비-표적 세포)는 각각 음성 분획 백 또는 비-표적 세포 백 내에 수집된다. 선택 물질은 항체-코팅된 비드를 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되지 않는다. 항체-코팅된 비드는 변형 및/또는 확장 단계 전에 제거될 수 있거나, 변형 및/또는 확장 단계 전에 세포 상에 보유될 수 있다. 세포 마커의 하기 비제한적 예들 중 하나 이상을 사용하여 T 세포를 단리할 수 있다: CD3, CD4, CD8, CD25, 항-바이오틴, CD1c, CD3/CD19, CD3/CD56, CD14, CD19, CD34, CD45RA, CD56, CD62L, CD133, CD137, CD271, CD304, IFN-감마, TCR 알파/베타, 및/또는 이들의 임의의 조합. T 세포를 단리하는 방법은 T 세포를 단리하는 데 사용될 수 있는 세포 마커의 하기 비제한적 예들 중 하나 이상의 세포 마커에 특이적으로 결합하고/하거나 이러한 세포 마커를 검출 가능하게 라벨링시키는 하나 이상의 물질을 포함할 수 있다: CD3, CD4, CD8, CD25, 항-바이오틴, CD1c, CD3/CD19, CD3/CD56, CD14, CD19, CD34, CD45RA, CD56, CD62L, CD133, CD137, CD271, CD304, IFN-감마, TCR 알파/베타, 및/또는 이들의 임의의

조합. 이 물질은 "우수 제조관리 기준"("GMP") 등급일 수 있거나 이러한 등급이 아닐 수 있다. 물질은 Thermo DynaBeads 및 Miltenyi CliniMACS 제품을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시내용의 T 세포 단리 방법은 표지 및/또는 단리 단계의 다회 반복을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 단리 방법에 있어서 임의의 시점에서 원치 않는 세포 및/또는 원치 않는 세포 유형에 대한 양성 또는 음성 선택으로 본 개시내용의 T 세포 생성물 조성물로부터 원치 않는 세포 및/또는 원치 않는 세포 유형을 고갈시킬 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 생성물 조성물은 CD4, CD8 및/또는 또 다른 T 세포 마커(들)를 발현할 수 있는 추가 세포 유형을 함유할 수 있다.

[0166] 본 개시내용의 T 세포 뉴클레오펙션 방법은 예를 들면, 뉴클레오펙션 후 단리 단계 또는 TCR 신호전달을 통한 선택적 확장 단계를 포함하는, WBC/PBMC의 집단 또는 조성물 중의 T 세포를 뉴클레오펙션시키는 과정으로 T 세포 단리 단계를 제거할 수 있다.

[0167] 일부 세포 집단들은 T 세포 농축 및/또는 분류 전 또는 후에 양성 또는 음성 선택에 의해 고갈될 수 있다. 세포 생성물 조성물로부터 고갈될 수 있는 세포 조성물의 예는 골수 세포, CD25+ 조절 T 세포(T Reg), 수지상 세포, 대식세포, 적혈구, 비만 세포, 감마-델타 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해(NK) 유사 세포(예를 들면, 사이토카인 유도된 살해(CIK) 세포), 유도된 자연 살해(iNK) T 세포, NK T 세포, B 세포 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0168] 본 개시내용의 T 세포 생성물 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함할 수 있다. CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 단리 또는 선택 절차 동안 별개의 수집 백 내로 단리될 수 있다. CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 따로 추가 처리될 수 있거나, 특정 비로 재구성된(동일한 조성물로 조합된) 후 처리될 수 있다.

[0169] CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포가 재구성될 수 있는 특정 비는 이용된 확장 기술의 유형 및 효능, 세포 배지, 및/또는 T 세포 생성물 조성물의 확장을 위해 사용된 성장 조건에 의해 좌우될 수 있다. 가능한 CD4+:CD8+ 비의 예는 50%:50%, 60%:40%, 40%:60%, 75%:25% 및 25%:75%를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0170] CD8+ T 세포는 강력한 종양 세포 사멸 능력을 나타내는 반면, CD4+ T 세포는 CD8+ T 세포 증식 능력 및 기능을 뒷받침하는 데 요구되는 사이토카인들의 대부분을 제공한다. 정상 공여자로부터 단리된 T 세포는 주로 CD4+ T 세포이기 때문에, T 세포 생성물 조성물은 생체내에 존재할 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 개선하기 위해 CD4+:CD8+ 비에 대하여 시험관내에서 인위적으로 조절된다. 최적화된 비는 자가 T 세포 생성물 조성물의 생체외 확장을 위해 이용될 수도 있다. T 세포 생성물 조성물의 인위적으로 조절된 CD4+:CD8+ 비에 비추어 볼 때, 본 개시내용의 생성물 조성물은 임의의 자연 발생 T 세포 집단과 상당히 상이할 수 있고 이 집단보다 상당히 더 큰 장점을 제공할 수 있다.

[0171] 바람직한 T 세포 단리 방법은 본래 그대로의 범(pan) T 세포를 수득하기 위한 음성 선택 전략을 포함할 수 있는데, 이것은 생성된 T 세포 조성물이 자연 발생 변종/비의 T 세포를 함유하는, 조작되지 않은 T 세포를 포함한다는 것을 의미한다.

[0172] 양성 또는 음성 선택을 위해 사용될 수 있는 물질은 자기 세포 분리 비드를 포함하나, 이것으로 제한되지 않는다. 자기 세포 분리 비드는 본 개시내용의 T 세포 단리 방법에서 다음 단계를 수행하기 전에 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포의 선택된 집단, 또는 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포 둘 다의 혼합된 집단으로부터 제거 또는 고갈될 수 있거나, 제거 또는 고갈되지 않을 수 있다.

[0173] T 세포 조성물 및 T 세포 생성물 조성물은 냉동보존, 표준 T 세포 배양 배지에서의 보관, 및/또는 유전자 변형을 위해 준비될 수 있다.

[0174] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극되지 않은 T 세포 조성물, 휴면 T 세포 조성물 또는 이들의 임의의 부분은 높은 회수, 생존능, 표현형 및/또는 기능 능력을 가진 인간 세포를 보관하고 회수하도록 최적화된 표준 냉동보존 방법을 이용함으로써 냉동보존될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 냉동보존 배지 및/또는 프로토콜이 이용될 수 있다. 본 개시내용의 냉동보존 방법은 냉동 관련 독성을 감소시키는 DMSO 무함유 냉동보존제(예를 들면, CryoSOfree™ DMSO 무함유 냉동보존 배지)를 포함할 수 있다.

[0175] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극되지 않은 T 세포 조성물, 휴면 T 세포 조성물 또는 이들의 임의의 부분은 배양 배지에 보관될 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 세포 보관, 세포 유전자 변형, 세포 표현형 및/또는 세포 확장을 위해 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 하나 이상의 항생제를 포함할 수 있다. 세포 배양 배지 내로의 항생제의 포함이 뉴클레오펙션을 통한 유전자 변형 후 트랜스펙션 효율 및/또는 세포 수율을 감소시킬 수 있기 때문에, 특정 항생제들(또는 이들의 조합) 및 이들 각각의 농도(들)는

뉴클레오펙션을 통한 유전자 변형 후 최적 트랜스펙션 효율 및/또는 세포 수율을 위해 변경될 수 있다.

[0176] 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 혈청을 포함할 수 있고, 게다가 혈청 조성 및 농도는 최적 세포 결과를 위해 변경될 수 있다. FBS/FCS는 본 개시내용의 T 세포 배양 배지에서 사용될 것으로 예상되지만 제노-단백질을 도입할 수 있기 때문에, 인간 AB 혈청이 T 세포의 배양에 있어서 FBS/FCS보다 선호된다. 혈청은 배양물 중의 T 세포 조성물을 투여받을 대상체의 혈액으로부터 단리될 수 있으므로, 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 자가 혈청을 포함할 수 있다. 무혈청 배지 또는 혈청 대용물도 본 개시내용의 T 세포 배양 배지에서 사용될 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 배양 배지 및 방법의 특정 실시형태에서, 무혈청 배지 또는 혈청 대용물은, 제노-혈청을 사용한 배지의 보충에 비해 더 큰 생존능을 갖고/갖거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션되고/되거나, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능을 나타내고/내거나, 더 바람직한 세포 표현형을 표시하고/하거나 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 나타내는 더 건강한 세포라는 장점을 포함하나, 이들로 제한되지 않는 장점을 제공할 수 있다.

[0177] T 세포 배양 배지는 상업적으로 입수 가능한 세포 성장 배지를 포함할 수 있다. 예시적 상업적으로 입수 가능한 세포 성장 배지는 PBS, HBSS, OptiMEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, CellGro DC 배지, CTS OpTimizer T 세포 확장 SFM, TexMACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, ImmunoCult-XF T 세포 확장 배지 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0178] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극되지 않은 T 세포 조성물, 휴면 T 세포 조성물 또는 이들의 임의의 부분은 유전자 변형을 위해 준비될 수 있다. 유전자 변형을 위한 T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극되지 않은 T 세포 조성물, 휴면 T 세포 조성물 또는 이들의 임의의 부분의 제조는 원하는 뉴클레오펙션 완충제를 사용한 세포 세척 및/또는 재현탁을 포함할 수 있다. 냉동보존된 T 세포 조성물은 해동될 수 있고 뉴클레오펙션에 의한 유전자 변형을 위해 준비될 수 있다. 냉동보존된 세포는 표준 또는 알려진 프로토콜에 따라 해동될 수 있다. 냉동보존된 세포의 해동 및 제조는, 더 큰 생존능을 갖고/갖거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션되고/되거나, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능을 나타내고/내거나, 더 바람직한 세포 표현형을 표시하고/하거나 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 나타내는 세포를 제공하도록 최적화될 수 있다. 예를 들면, Grifols Albutein(25% 인간 알부민)은 해동 및/또는 제조 과정에서 사용될 수 있다.

[0179] ***자가 T 세포 생성물 조성물의 유전자 변형***

[0180] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극되지 않은 T 세포 조성물, 휴면 T 세포 조성물 또는 이들의 임의의 부분은 예를 들면, 뉴클레오펙션 전략, 예컨대, 전기천공을 이용함으로써 유전자 변형될 수 있다. 뉴클레오펙션될 세포의 총 수, 뉴클레오펙션 반응의 총 부피, 및 샘플의 제조의 정확한 시간은, 더 큰 생존능을 갖고/갖거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션되고/되거나, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능을 나타내고/내거나, 더 바람직한 세포 표현형을 표시하고/하거나 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 나타내는 세포를 제공하도록 최적화될 수 있다.

[0181] 뉴클레오펙션 및/또는 전기천공은 예를 들면, Lonza)Amaxa, MaxCyte PulseAgile, Harvard Apparatus BTX 및/또는 Invitrogen Neon을 이용함으로써 달성될 수 있다. 플라스틱 중합체 전극을 포함하나 이것으로 제한되지 않는 비-금속 전극 시스템이 뉴클레오펙션을 위해 바람직할 수 있다.

[0182] 뉴클레오펙션에 의한 유전자 변형 전, T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극되지 않은 T 세포 조성물, 휴면 T 세포 조성물 또는 이들의 임의의 부분은 뉴클레오펙션 완충제에 재현탁될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는 상업적으로 입수 가능한 뉴클레오펙션 완충제를 포함한다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는, 더 큰 생존능을 갖고/갖거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션되고/되거나, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능을 나타내고 /내거나, 더 바람직한 세포 표현형을 표시하고/하거나 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 나타내는 세포를 제공하도록 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는 PBS, HBSS, OptiMEM, BTXpress, Amaxa 뉴클레오펙터, 인간 T 세포 뉴클레오펙션 완충제 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는, 더 큰 생존능을 갖고/갖거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션되고/되거나, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능을 나타내고/내거나, 더 바람직한 세포 표현형을 표시하고/하거나 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 나타내는 세포를 제공하기 위해 하나 이상의 보충 인자를 포함할 수 있다. 예시적 보충 인자는 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 사이토카인, 케모카인 및 인터류킨은 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN-감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 헤테로이량체, IL-

17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림프독소-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 염, 광물, 대사물질 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 염, 광물 및 대사물질은 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비-필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대용물, 항생제, pH 조절제, 얼의 염, 2-머캡토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충제, KCL, MgC12, Na2HPO4, NAH2PO4, 락토비온산나트륨, 만니톨, 석신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌 글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리비닐피롤리돈, Pop313, 크라운-5, 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 배지, 예컨대, PBS, HBSS, OptiMEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, CellGro DC 배지, CTS OpTimizer T 세포 확장 SFM, TexMACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, ImmunoCult-XF T 세포 확장 배지 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 세포 DNA 감지, 대사, 분화, 신호 전달, 세포자멸사 경로 및 이들의 조합의 저해제들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 저해제는 TLR9, MyD88, IRAK, TRAF6, TRAF3, IRF-7, NF-KB, 1형 인터페론, 염증 유발성 사이토카인, cGAS, STING, Sec5, TBK1, IRF-3, RNA pol III, RIG-1, IPS-1, FADD, RIP1, TRAF3, AIM2, ASC, 카스파제1, Pro-IL1B, PI3K, Akt 또는 Wnt3A의 저해제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 저해제(예를 들면, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 세포 전달을 향상시키고/시키거나, 핵 전달 또는 수송을 향상시키고/시키거나, 핵 내로의 핵산의 용이해진 수송을 향상시키고/시키거나, 에피-염색체 핵산의 분해를 향상시키고/시키거나, DNA 매개 독성을 감소시키는 방식으로 하나 이상의 핵산을 변형시키거나 안정화시키는 물질들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 하나 이상의 핵산을 변형시키거나 안정화시키는 예시적 물질은 pH 변형제, DNA 결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 갖거나 갖지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소, 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0183] 트랜스포존 및 트랜스포사제를 비롯한 전위 물질은 세포를 (선택적으로 뉴클레오펙션 반응 바이알 또는 큐벳 내에 함유된) 뉴클레오펙션 완충제에 첨가하기 전에, 첨가함과 동시에 또는 첨가한 후에 본 개시내용의 뉴클레오펙션 반응에 첨가될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 플라스미드 DNA, 선형화된 플라스미드 DNA, PCR 생성물, DOGGYBONE™ DNA, mRNA 주형, 단일 또는 이중 가닥 DNA, 단백질-핵산 조합 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 하나 이상의 TTAA 부위(들), 하나 이상의 역위 말단 반복부(ITR)(들), 하나 이상의 긴 말단 반복부(LTR)(들), 하나 이상의 인설레이터(들), 하나 이상의 프로모터(들), 하나 이상의 전체 길이 또는 절두형 유전자(들), 하나 이상의 폴리A 신호(들), 하나 이상의 자가-절두 2A 펩티드 절두 부위(들), 하나 이상의 내부 리보좀 진입 부위(들)(IRES), 하나 이상의 인핸서(들), 하나 이상의 조절제(들), 하나 이상의 복제 기점(들) 및 이들의 임의의 조합을 코딩하는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0184] 본 개시내용의 트랜스포존은 하나 이상의 전체 길이 또는 절두형 유전자(들)을 코딩하는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존에 의해 도입된 전체 길이 및/또는 절두형 유전자(들)는 신호 펩티드, Centyrin, 단일 사슬 가변 단편(scFv) 힌지, 막관통 도메인, 공동자극 도메인, 키메라 항체 수용체(CAR), 키메라 T-세포 수용체(CAR-T), CARTyrin 또는(Centyrin을 포함하는 CAR-T), 수용체, 리간드, 사이토카인, 약물 내성 유전자, 종양 항원, 동종 또는 자가 항원, 효소, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 형광 단백질, 뮤테인 또는 이들의 임의의 조합 중 하나 이상을 코딩할 수 있다.

[0185] 본 개시내용의 트랜스포존은 물, TAE, TBE, PBS, HBSS, 배지, 본 개시내용의 보충 인자 또는 이들의 임의의 조합에서 제조될 수 있다.

[0186] 본 개시내용의 트랜스포존은 임상 안전성을 최적화하고/하거나 제조 가능성을 개선하도록 설계될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 개시내용의 트랜스포존은 불필요한 서열 또는 영역을 제거하고/하거나 비-항생제 선택 마커를 포함시킴으로써 임상 안전성을 최적화하고/하거나 제조 가능성을 개선하도록 디자인될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 GMP 등급일 수 있거나 GMP 등급이 아닐 수 있다.

[0187] 본 개시내용의 트랜스포사제는 플라스미드 DNA, mRNA, 단백질, 단백질-핵산 조합 또는 이들의 임의의 조합의 하나 이상의 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0188] 본 개시내용의 트랜스포사제는 물, TAE, TBE, PBS, HBSS, 배지, 본 개시내용의 보충 인자 또는 이들의 임의의 조합에서 제조될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포사제 또는 이를 코딩하거나 전달하는 서열/작제물은 GMP 등급

일 수 있거나 GMP 등급이 아닐 수 있다.

[0189] 본 개시내용의 트랜스포존 및 트랜스포사제는 임의의 수단에 의해 세포에게 전달될 수 있다.

[0190] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 플라스미드 DNA(pDNA)로 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제를 세포에게 전달하는 단계를 포함하지만, 전달을 위한 플라스미드의 사용은 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제가 세포의 염색체 내로 통합될 수 있게 함으로써, 연속된 트랜스포사제 발현을 유발할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제는 임의의 염색체 통합 가능성을 제거하기 위해 mRNA 또는 단백질로서 세포에게 전달될 수 있다.

[0191] 본 개시내용의 트랜스포존 및 트랜스포사제는 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제를 뉴클레오펙션 반응 내로 도입하기 전에 단독으로, 또는 서로 조합으로 미리 인큐베이션될 수 있다. 트랜스포존 및 트랜스포사제 각각의 절대적 양뿐만 아니라, 상대적 양, 예를 들면, 트랜스포존 대 트랜스포사제의 비도 최적화될 수 있다.

[0192] 선택적으로, 바이알 또는 큐벳 내에서의 뉴클레오펙션 반응의 준비 후, 반응물은 뉴클레오펙터 장치 내로 로딩될 수 있고 제조자의 프로토콜에 따라 전기 펄스의 전달을 위해 활성화될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제(또는 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제를 코딩하는 서열)을 세포에게 전달하는 데 사용되는 전기 펄스 조건은 향상된 생존능, 더 높은 뉴클레오펙션 효율, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능, 바람직한 세포 표현형 및/또는 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 가진 세포를 제공하도록 최적화될 수 있다. Amaxa 뉴클레오펙터 기술을 이용할 때, Amaxa 2B 또는 4D 뉴클레오펙터를 위한 다양한 뉴클레오펙션 프로그램들 각각이 고려된다.

[0193] 본 개시내용의 뉴클레오펙션 반응 후, 세포는 세포 배지에 조심스럽게 첨가될 수 있다. 예를 들면, T 세포가 뉴클레오펙션 반응을 겪을 때, T 세포는 T 세포 배지에 첨가될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 임의의 하나 이상의 상업적으로 입수 가능한 배지를 포함할 수 있다. (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배지를 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 더 큰 생존능 및 더 높은 뉴클레오펙션 효율을 갖고/갖거나, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능을 갖고/갖거나, 바람직한 세포 표현형을 표시하고/하거나 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 나타내는 세포를 제공하도록 최적화될 수 있다. (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배지를 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 PBS, HBSS, OptiMEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, CellGro DC 배지, CTS OpTimizer T 세포 확장 SFM, TexMACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, ImmunoCult-XF T 세포 확장 배지 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배지를 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 생존능, 뉴클레오펙션 효율, 뉴클레오펙션 후 생존능, 세포 표현형 및/또는 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 향상시키기 위해 본 개시내용의 하나 이상의 보충 인자를 포함할 수 있다. 예시적 보충 인자는 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 사이토카인, 케모카인 및 인터류킨은 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN-감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 헤테로이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림프독소-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 염, 광물, 대사물질 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 염, 광물 및 대사물질은 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비-필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대용물, 항생제, pH 조절제, 얼의 염, 2-머캡토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충제, KCL, MgC12, Na2HPO4, NAH2PO4, 락토비온산나트륨, 만니톨, 석신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌 글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리비닐피롤리돈, Pop313, 크라운-5, 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 배지, 예컨대, PBS, HBSS, OptiMEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, CellGro DC 배지, CTS OpTimizer T 세포 확장 SFM, TexMACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, ImmunoCult-XF T 세포 확장 배지 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 세포 DNA 감지, 대사, 분화, 신호 전달, 세포자멸사 경로 및 이들의 조합의 저해제들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 저해제는 TLR9, MyD88, IRAK, TRAF6, TRAF3, IRF-7, NF-KB, 1형 인터페론, 염증유발성 사이토카인, cGAS, STING, Sec5, TBK1, IRF-3, RNA pol III, RIG-1, IPS-1, FADD, RIP1, TRAF3, AIM2, ASC, 카스파제1, Pro-IL1B, PI3K, Akt 또는 Wnt3A의 저해제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 저해제

(예를 들면, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적 보충 인자는 세포 전달을 향상시키고/시키거나, 핵 전달 또는 수송을 향상시키고/시키거나, 핵 내로의 핵산의 용이해진 수송을 향상시키고/시키거나, 에피-염색체 핵산의 분해를 향상시키고/시키거나, DNA 매개 독성을 감소시키는 방식으로 하나 이상의 핵산을 변형시키거나 안정화시키는 물질들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 하나 이상의 핵산을 변형시키거나 안정화시키는 예시적 물질은 pH 변형제, DNA 결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 갖거나 갖지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소, 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0194] (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배지를 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 실온에서 사용될 수 있거나, 예를 들면, 종점을 포함하는 32℃ 내지 37℃까지 미리 가온될 수 있다. (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배지를 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 본 개시내용의 트랜스포존 또는 이의 부분의 세포 생존능 및/또는 발현을 유지하거나 향상시키는 임의의 온도까지 미리 가온될 수 있다.

[0195] (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배지를 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배지는 조직 배양 플라스크 또는 접시, G-렉스 플라스크, 생물반응기 또는 세포 배양 백, 또는 임의의 다른 표준 용기 내에 함유될 수 있다. (본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 T 세포 배양물을 비롯한) 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후 세포 배양물은 정지된 상태로 유지될 수 있거나, 대안적으로 교란된다(예를 들면, 흔들릴 수 있거나, 휘저어질 수 있거나 진탕될 수 있다).

[0196] 뉴클레오펙션 후 세포 배양물은 유전자 변형된 세포를 포함할 수 있다. 뉴클레오펙션 후 T 세포 배양물은 유전자 변형된 T 세포를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 소정의 시간 동안 휴면될 수 있거나, 예를 들면, T 세포 확장제(T Cell Expander) 기술의 추가에 의해 확장되도록 자극될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 소정의 시간 동안 휴면될 수 있거나, 예를 들면, T 세포 확장제 기술의 추가에 의해 확장되도록 즉시 자극될 수 있다. 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 적응하기에 충분한 시간, 전위가 일어나기에 충분한 시간, 및/또는 양성 또는 음성 선택을 위한 충분한 시간을 이 세포에게 허용하여, 향상된 생존능, 더 높은 뉴클레오펙션 효율, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능, 바람직한 세포 표현형, 및/또는 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 가진 세포를 생성하도록 휴면될 수 있다. 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 예를 들면, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 또는 24시간 이상 동안 휴면될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 예를 들면, 하룻밤 동안 휴면될 수 있다. 특정 양태에서, 하룻밤은 약 12시간이다. 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 예를 들면, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일 또는 14일 이상 동안 휴면될 수 있다.

[0197] 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 뉴클레오펙션 반응 후 및 확장제 기술의 추가 전에 선택될 수 있다. 변형된 세포의 최적 선택을 위해, 세포는 유전자 변형된 세포의 확인(예를 들면, 변형된 세포와 비변형된 세포의 구별)을 용이하게 하기 위해 적어도 2일 내지 14일 동안 뉴클레오펙션 후 세포 배지에서 휴면하도록 허용될 수 있다.

[0198] 본 개시내용의 CAR/CARTyrin 및 선택 마커의 발현은 본 개시내용의 트랜스포존의 성공적인 뉴클레오펙션 시 변형된 T 세포에서 뉴클레오펙션 후 24시간만큼 일찍 검출될 수 있다. 트랜스포존의 에피-염색체 발현으로 인해, 선택 마커 단독의 발현은 변형된 T 세포(트랜스포존이 성공적으로 통합된 세포)와 비변형된 T 세포(트랜스포존이 성공적으로 통합되지 않은 세포)를 구별할 수 없다. 트랜스포존의 에피-염색체 발현이 선택 마커에 의한 변형된 세포의 검출을 모호하게 할 때, 뉴클레오펙션된 세포(변형된 세포 및 비변형된 세포 둘 다)는 세포가 발현을 중단할 수 있거나 모든 에피-염색체 트랜스포존 발현을 상실할 수 있도록 소정의 시간(예를 들면, 2일 내지 14일) 동안 휴면될 수 있다. 이 연장된 휴면 기간 후, 변형된 T 세포만이 선택 마커의 발현에 대해 양성을 유지해야 한다. 이 연장된 휴면 기간의 길이는 각각의 뉴클레오펙션 반응 및 선택 과정에 대해 최적화될 수 있다. 트랜스포존의 에피-염색체 발현이 선택 마커에 의한 변형된 세포의 검출을 모호하게 할 때, 선택은 이 연장된 휴면 기간 없이 수행될 수 있으나, 추가 선택 단계가 추후 시점에서(예를 들면, 확장 단계 동안 또는 후에) 포함될 수 있다.

[0199] 본 개시내용의 유전자 변형된 세포의 선택은 임의의 수단에 의해 수행될 수 있다. 본 개시내용의 방법의 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 변형된 세포의 선택은 특정 선택 마커를 발현하는 세포를 단리함으로써 수행될 수 있다. 본 개시내용의 선택 마커는 트랜스포존 내의 하나 이상의 서열에 의해 코딩될 수 있다. 본 개시

내용의 선택 마커는 성공적인 전위의 결과로서 변형된 세포에 의해 발현될 수 있다(즉, 트랜스포존 내의 하나 이상의 서열에 의해 코딩되지 않을 수 있다). 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 뉴클레오펙션 후 세포 배지의 유해한 화합물에 대한 내성을 부여하는 선택 마커를 함유한다. 상기 유해한 화합물은 예를 들면, 선택 마커에 의해 변형된 세포에게 부여된 내성이 부재할 때 세포 사멸을 초래할 항생제 또는 약물을 포함할 수 있다. 예시적 선택 마커는 야생형(WT) 또는 돌연변이체 형태의 하기 유전자들 중 하나 이상의 유전자를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다: neo, DHFR, TYMS, ALDH, MDR1, MGMT, FANCF, RAD51C, GCS 및 NKX2.2. 예시적 선택 마커는 Ab-코팅된 자기 비드 기술 또는 컬럼 선택에 의해 표적화될 수 있는 각각 표면-발현된 선택 마커 또는 표면-발현된 태그를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 절단 가능한 태그, 예컨대, 단백질 정제에 사용되는 절단 가능한 태그는 효율적인 컬럼 선택, 세척 및 용출을 위해 본 개시내용의 선택 마커에 첨가될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 선택 마커는 (변형된 T 세포를 포함하는) 변형된 세포에 의해 자연적으로 발현되지 않으므로, (예를 들면, 세포 분류 기법에 의한) 변형된 세포의 물리적 단리에 유용할 수 있다. 본 개시내용의 예시적 선택 마커는 (변형된 T 세포를 포함하는) 변형된 세포에 의해 자연적으로 발현되지 않고, 전체 길이, 돌연변이된 또는 절두된 형태의 CD271, CD19, CD52, CD34, RQR8, CD22, CD20, CD33 및 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0200] 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 뉴클레오펙션 반응 후 선택적으로 확장될 수 있다. 특정 실시형태에서, CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포는 CAR/CARTyrin 자극에 의해 선택적으로 확장될 수 있다. CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포는 표적에 의해 덮인 물질(예를 들면, 표적을 발현하는 종양 세포주 또는 정상 세포주, 또는 표적에 의해 덮인 확장제 비드)과 접촉함으로써 자극될 수 있다. 대안적으로, CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포는 방사선조사된 종양 세포, 방사선조사된 동종이계 정상 세포 또는 방사선조사된 자가 PBMC와 접촉함으로써 자극될 수 있다. 자극을 위해 사용된 표적 발현 세포에 의한 본 개시내용의 세포 생성물 조성물의 오염을 최소화하기 위해, 예를 들면, 상기 세포 생성물 조성물이 대상체에게 직접적으로 투여될 수 있을 때, CAR/CARTyrin 표적 단백질로 코팅된 확장제 비드를 사용하여 자극을 수행할 수 있다. CAR/CARTyrin 자극에 의한 CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포의 선택적 확장은 작용적으로 소진된 변형된 T 세포를 피하도록 최적화될 수 있다.

[0201] 본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 세포는 냉동보존될 수 있거나, 소정의 시간 동안 휴면될 수 있거나, 세포 확장제 기술의 추가에 의해 확장되도록 자극될 수 있다. 본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 세포는 냉동보존될 수 있거나, 소정의 시간 동안 휴면될 수 있거나, 세포 확장제 기술의 추가에 의해 확장되도록 즉시 자극될 수 있다. 선택된 유전자 변형된 세포가 T 세포일 때, T 세포는 T 세포 확장제 기술의 추가에 의해 확장되도록 자극될 수 있다. 본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 세포는 예를 들면, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 또는 24시간 이상 동안 휴면될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 세포는 예를 들면, 하룻밤 동안 휴면될 수 있다. 특정 양태에서, 하룻밤은 약 12시간이다. 본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 세포는 예를 들면, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일 또는 14일 이상 동안 휴면될 수 있다. 본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 세포는 임의의 시간 동안 휴면되어, 향상된 생존능, 더 높은 뉴클레오펙션 효율, 뉴클레오펙션 후 더 큰 생존능, 바람직한 세포 표현형, 및/또는 확장 기술의 추가 시 더 큰/더 빠른 확장을 가진 세포를 생성할 수 있다.

[0202] (본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 T 세포를 포함하는) 선택된 유전자 변형된 세포는 높은 회수, 생존능, 표현형 및/또는 작용 능력을 가진 인간 세포를 보관하고/하거나 회수하도록 최적화될 수 있는 임의의 표준 냉동보존 방법을 이용함으로써 냉동보존될 수 있다. 본 개시내용의 냉동보존 방법은 상업적으로 입수 가능한 냉동보존 배지 및/또는 프로토콜을 포함할 수 있다.

[0203] (본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 T 세포를 포함하는) 선택된 유전자 변형된 세포의 전위 효율은 임의의 수단에 의해 평가될 수 있다. 예를 들면, 확장제 기술의 적용 전, (본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 T 포를 포함하는) 선택된 유전자 변형된 세포에 의한 트랜스포존의 발현은 형광-활성화된 세포 분류(FACS)에 의해 측정될 수 있다. (본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 T 세포를 포함하는) 선택된 유전자 변형된 세포의 전위 효율의 측정은 트랜스포존(예를 들면, CAR)을 발현하는 선택된 세포의 퍼센트를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, T 세포의 순도, 트랜스포존 발현(예를 들면, CAR 발현)의 평균 형광 강도(MFI), CAR 리간드를 발현하는 표적 세포의 탈과립화 및/또는 사멸을 매개하는 (트랜스포존에 의해 전달된) CAR의 능력, 및/또는 (본 개시내용의 선택된 유전자 변형된 T 세포를 포함하는) 선택된 유전자 변형된 세포의 표현형은 임의의 수단에 의해 평가될 수 있다.

[0204] 본 개시내용의 세포 생성물 조성물은 일부 방출 기준을 충족시킬 때 대상체에게 투여되도록 방출될 수 있다. 예시적 방출 기준은 세포 표면 상에서 검출 가능한 수준의 CAR을 발현하는, 변형된, 선택된 및/또는 확장된 T 세포의 특정 퍼센트를 포함할 수 있으나, 이것으로 제한되지 않는다.

[0205] ***자가 T 세포 생성물 조성물의 유전자 변형***

[0206] 본 개시내용의 (유전자 변형된 T 세포를 포함하는) 유전자 변형된 세포는 확장제 기술을 이용함으로써 확장될 수 있다. 본 개시내용의 확장제 기술은 상업적으로 입수 가능한 확장제 기술을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 예시적 확장제 기술은 TCR을 통한 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포의 자극을 포함한다. 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포를 자극하기 위한 모든 수단들이 고려되지만, TCR을 통한 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포의 자극은 더 우수한 수준의 사멸 능력을 가진 생성물을 제공하는 바람직한 방법이다.

[0207] TCR을 통해 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포를 자극하기 위해, Thermo 확장제 DynaBeads를 T 세포에 대한 비드의 3:1 비로 사용할 수 있다. 확장제 비드가 생분해될 수 없는 경우, 비드는 확장제 조성물로부터 제거될 수 있다. 예를 들면, 상기 비드는 약 5일 후 확장제 조성물로부터 제거될 수 있다. TCR을 통해 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포를 자극하기 위해, Miltenyi T 세포 활성화/확장제를 사용할 수 있다. TCR을 통해 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포를 자극하기 위해, StemCell Technologies의 ImmunoCult 인간 CD3/CD28 또는 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제를 사용할 수 있다. 이 기술은 가용성 사량체 항체 복합체가 소정의 시간 후 분해될 것이고 과정으로부터의 제거를 요구하지 않을 것이기 때문에 바람직할 수 있다.

[0208] 인공 항원 제시 세포(APC)는 표적 항원을 공-발현하도록 조작될 수 있고, 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다. 인공 APC는(예를 들면, 불멸화된 골수성 백혈병 세포주 K562를 포함하는) 종양 세포주를 포함할 수 있거나 이 종양 세포주로부터 유래할 수 있고, 기술에 의해 다수의 보조자극 분자들 또는 기술들(예컨대, CD28, 4-1BBL, CD64, mbIL-21, mbIL-15, CAR 표적 분자 등)을 공-발현하도록 조작될 수 있다. 본 개시내용의 인공 APC가 공동자극 분자와 조합될 때, 조건은 바람직하지 않은 표현형 및 작용 능력, 즉 말기 분화된 이펙터 T 세포의 발생 또는 출현을 방지하도록 최적화될 수 있다.

[0209] 방사선조사된 (자가 또는 동종) PBMC는 일부 표적 항원들, 예컨대, CD19를 발현할 수 있고, 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 방사선조사된 종양 세포는 일부 표적 항원들을 발현할 수 있고, 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다.

[0210] 플레이트에 결합된 항-CD3, 항-CD2 및/또는 항-CD28은 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다.

[0211] 항원으로 코팅된 비드는 표적 단백질을 표시할 수 있고 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, CAR/CARTyrin 표적 단백질로 코팅된 확장제 비드는 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극하는 데 사용될 수 있다.

[0212] 확장 방법은 TCR 또는 CAR/CARTyrin, 및 유전자 변형된 T 세포의 표면에 발현된 CD2, CD3, CD28, 4-1BB 및/또는 다른 마커를 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포의 자극을 이끌어낸다.

[0213] 확장 기술은 뉴클레오펙션 후 대략 24시간까지 뉴클레오펙션 직후 본 개시내용의 세포에 적용될 수 있다. 다양한 세포 배지들이 확장 절차 동안 사용될 수 있지만, 본 개시내용의 바람직한 T 세포 확장 배지는 예를 들면, 더 큰 생존능, 세포 표현형, 총 확장 또는 더 큰 생체내 존속 능력, 생착 및/또는 CAR 매개 사멸을 가진 세포를 제공할 수 있다. 본 개시내용의 세포 배지는 본 개시내용의 유전자 변형된 세포의 확장, 표현형 및 작용을 개선/향상시키도록 최적화될 수 있다. 확장된 T 세포의 바람직한 표현형은 T 줄기 세포 기억 세포, T 중심 세포 및 T 이펙터 기억 세포의 혼합물을 포함할 수 있다. 확장제 Dynabeads는 주로 중심 기억 T 세포를 제공할 수 있고, 이것은 임상에서 더 우수한 성능으로 이어질 수 있다.

[0214] 본 개시내용의 예시적 T 세포 확장 배지는 부분적으로 또는 전체적으로 PBS, HBSS, OptiMEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, CellGro DC 배지, CTS OpTimizer T 세포 확장 SFM, TexMACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, ImmunoCult-XF T 세포 확장 배지 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지는 하나 이상의 보충 인자를 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지에 포함될 수 있는 보

충 인자는 생존능, 세포 표현형, 총 확장을 향상시키거나, 생체내 존속 능력, 생착 및/또는 CAR-매개 사멸을 증가시킨다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지에 포함될 수 있는 보충 인자는 재조합 인간 사이토카인, 케모카인 및/또는 인터류킨, 예컨대, IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN-감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 헤테로이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림프독소-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지에 포함될 수 있는 보충 인자는 염, 광물 및/또는 대사물질, 예컨대, HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비-필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대용물, 항생제, pH 조절제, 얼의 염, 2-머캡토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충제, KCL, MgC12, Na2HPO4, NAH2PO4, 락토비온산나트륨, 만니톨, 석신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리에틸렌 글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리비닐피롤리돈, Pop313, 크라운-5, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지에 포함될 수 있는 보충 인자는 세포 DNA 감지, 대사, 분화, 신호 전달 및/또는 세포자멸사 경로의 억제제, 예컨대, TLR9, MyD88, IRAK, TRAF6, TRAF3, IRF-7, NF-KB, 1형 인터페론, 염증유발성 사이토카인, cGAS, STING, Sec5, TBK1, IRF-3, RNA pol III, RIG-1, IPS-1, FADD, RIP1, TRAF3, AIM2, ASC, 카스파제1, Pro-IL1B, PI3K, Akt 또는 Wnt3A의 저해제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 저해제(예를 들면, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0215] 본 개시내용의 T 세포 확장 배지에 포함될 수 있는 보충 인자는 세포 전달을 향상시키고/시키거나, 핵 전달 또는 수송을 향상시키고/시키거나, 핵 내로의 핵산의 용이해진 수송을 향상시키고/시키거나, 에피-염색체 핵산의 분해를 향상시키고/시키거나, DNA 매개 독성을 감소시키는 방식으로 핵산을 변형시키거나 안정화시키는 물질, 예컨대, pH 변형제, DNA 결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 갖거나 갖지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소 또는 이들의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0216] 본 개시내용의 유전자 변형된 세포는 선택 약물 또는 화합물의 사용에 의해 확장 과정 동안 선택될 수 있다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 트랜스포존이 배양 배지에 첨가된 약물에 대한 내성을 유전자 변형된 세포에게 부여하는 선택 마커를 코딩할 수 있을 때, 선택은 확장 과정 동안 일어날 수 있고 선택이 일어나기 위해 대략 1일 내지 14일의 배양을 요구할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존에 의해 코딩된 선택 마커로서 사용될 수 있는 약물 내성 유전자의 예는 야생형(WT) 또는 돌연변이체 형태의 유전자 neo, DHFR, TYMS, ALDH, MDR1, MGMT, FANCF, RAD51C, GCS, NKX2.2 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 선택 마커가 내성을 부여할 수 있는, 배양 배지에 첨가될 수 있는 상응하는 약물 또는 화합물의 예는 G418, 퓨로마이신(Puromycin), 앰피실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 메토트렉세이트(Methotrexate), 멜팔란(Mephalan), 테모졸로마이드(Temozolomide), 빈크리스틴(Vincristine), 에토포사이드(Etoposide), 독소루비신(Doxorubicin), 벤다무스틴(Bendamustine), 플루다라빈(Fludarabine), 아레디아(Aredia)(파미드로네이트 이나트륨), 베세눔(Becenum)(카르무스틴(Carmustine)), BiCNU(카르무스틴), 보르테조밉(Bortezomib), 카르필조밉(Carfilzomib), 카르무브리스(Carmubris)(카르무스틴), 카르무스틴, 클라펜(Clafen)(사이클로포스파마이드), 사이클로포스파마이드, 사이톡산(Cytoxan)(사이클로포스파마이드), 다라투무맙(다라투무맙), 다르잘렉스(Darzalex)(다라투무맙), 독실(Doxil)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀, 독스-SL(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 엘로투주맙(엘로투주맙), 엠플리시티(Empliciti)(엘로투주맙), 에바세트(Evacet)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 파리닥(Farydak)(파노비노스타트(Panobinostat)), 익사조밉(Ixazomib) 구연산염, 키프롤리스(Kyprolis)(카르필조밉(Carfilzomib)), 레날리도마이드(Lenalidomide), 리포독스(LipoDox)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 모조빌(Mozobil)(플레릭사포르(Plerixafor)), 네오사르(Neosar)(사이클로포스파마이드), 닌라로(Ninlaro)(익사조밉 구연산염), 파미드로네이트 이나트륨, 파노비노스타트, 플레릭사포르, 포말리도마이드(Pomalidomide), 포말리스트(Pomalyst)(포말리도마이드), 레블리미드(Revlimid)(레날리도마이드), 시노비르(Synovir)(탈리도마이드), 탈리도마이드, 탈로미드(Thalomid)(탈리도마이드), 벨케이드(Velcade)(보르테조밉), 졸레드론산, 조메타(Zometa)(졸레드론산) 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0217] 본 개시내용의 T 세포 확장 과정은 WAVE 생물반응기, G-렉스 플라스크, 또는 임의의 다른 적합한 용기 및/또는

반응기 내의 세포 배양 백에서 일어날 수 있다.

[0218] 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 배양물은 정지된 상태, 흔들리는 상태, 휘저어지는 상태 또는 진탕되는 상태로 보관될 수 있다.

[0219] 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 과정은 배양 지속시간, 세포 농도, T 세포 배지 첨가/제거를 위한 일정, 세포 크기, 총 세포 수, 세포 표현형, 세포 집단의 순도, 성장하는 세포 집단 내의 유전자 변형된 세포의 퍼센트, 보충제의 사용 및 조성, 확장제 기술의 추가/제거, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는 일부 조건들을 최적화할 수 있다.

[0220] 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 과정은 생성된 확장된 세포 집단의 제형화 전에 소정의 종점까지 계속될 수 있다. 예를 들면, 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 과정은 사전 결정된 시간, 즉 적어도 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간; 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일; 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주; 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월; 또는 적어도 1년 동안 계속될 수 있다. 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 과정은 생성된 배양물이 사전 결정된 총 세포 밀도, 즉 부피(μl, ml, L)당 1개, 10개, 100개, 1000개, $10^4$개, $10^5$개, $10^6$개, $10^7$개, $10^8$개, $10^9$개, $10^{10}$개 세포, 또는 그 사이의 임의의 밀도에 도달할 때까지 계속될 수 있다. 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 과정은 생성된 배양물의 유전자 변형된 세포가 본 개시내용의 트랜스포존의 사전 결정된 발현 수준, 즉 역치 발현 수준(생성된 유전자 변형된 세포가 임상적으로 효과적임을 표시하는 최소치, 최대치 또는 평균 발현 수준)의 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%, 또는 그 사이의 임의의 퍼센트를 나타낼 때까지 계속될 수 있다. 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 과정은 비변형된 세포의 비율에 대한 생성된 배양물의 유전자 변형된 세포의 비율이 사전 결정된 역치, 즉 적어도 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 2:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 또는 그 사이의 임의의 비에 도달할 때까지 계속될 수 있다.

[0221] ***방출을 위한 유전자변형된 자가 T 세포의 분석***

[0222] 유전자 변형된 세포의 퍼센트는 본 개시내용의 확장 과정 동안 또는 후에 평가될 수 있다. 본 개시내용의 유전자 변형된 세포에 의한 트랜스포존의 세포 발현은 형광-활성화된 세포 분류(FACS)에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, FACS를 이용하여 본 개시내용의 CAR을 발현하는 세포 또는 T 세포의 퍼센트를 측정할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 유전자 변형된 세포 또는 T 세포의 순도, 본 개시내용의 변형된 세포 또는 T 세포에 의해 발현된 CAR의 평균 형광 강도(MFI), CAR 리간드를 발현하는 표적 세포의 탈과립화 및/또는 사멸을 매개하는 CAR의 능력, 및/또는 CAR+ T 세포의 표현형이 평가될 수 있다.

[0223] 대상체에게 투여될 본 개시내용의 조성물은 조성물이 약학 제품으로서의 제형화 및/또는 대상체에게의 투여를 위해 안전하고 효과적임을 표시하는 하나 이상의 "방출 기준"을 충족시킬 것을 요구받을 수 있다. 방출 기준은 본 개시내용의 조성물(예를 들면, 본 개시내용의 T 세포 생성물)이 세포 표면 상에서 검출 가능한 수준의 본 개시내용의 CAR을 발현하는 특정 퍼센트의 T 세포를 포함해야 한다는 요건을 포함할 수 있다.

[0224] 확장 과정은 특정 기준(예를 들면, 특정 총 세포 수의 달성, 특정 기억 세포 집단의 달성, 특정 크기의 집단의 달성)이 충족될 때까지 계속되어야 한다.

[0225] 특정 기준은 확장 과정이 종결되어야 하는 점을 신호로 보낸다. 예를 들면, 세포는 일단 300 fL의 세포 크기에 도달하면 제형화되거나, 재활성화되거나 냉동보존되어야 한다(그렇지 않으면, 이 역치를 초과하는 크기에 도달한 세포는 죽기 시작할 수 있다). 일단 세포의 집단이 300 fL 미만의 평균 세포 크기에 도달하면 즉시 냉동보존은 해동 및 배양 시 더 우수한 세포 회수를 제공할 수 있는데, 이는 세포가 냉동보존 전에 완전한 휴면 상태에 아직 도달하지 못하였기 때문이다(완전한 휴면 상태 크기는 대략 180 fL이다). 확장 전, 본 개시내용의 T 세포는 약 180 fL의 세포 크기를 가질 수 있으나, 그의 세포 크기를 확장 후 제3일에 대략 900 fL까지 4배 초과 증가시킬 수 있다. T 세포의 집단은 다음 6일 내지 12일에 걸쳐 세포 크기를 180 fL의 완전한 휴면 상태 크기까지 서서히 감소시킬 것이다.

[0226] 제형화를 위해 세포 집단을 준비하는 과정은 세포 집단의 세포를 농축시키는 단계, 세포를 세척하는 단계, 및/또는 약물 내성 또는 자기 비드 분류를 통해 표면에 발현된 특정 마커에 대해 세포를 추가 선택하는 단계를 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 제형화를 위해 세포 집단을 준비하는 과정은 최종 생성물의 안전성 및 순도를 보장하기 위한 분류 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 환자로부터의 종양 세포가 본 개시내

용의 유전자 변형된 T 세포를 자극하는 데 사용되었거나, 제형화를 위해 준비되고 있는 본 개시내용의 유전자 변형된 T 세포를 자극하기 위해 유전자 변형된 경우, 환자로부터의 종양 세포가 최종 생성물에 포함되지 않는 것이 매우 중요하다.

[0227] ***세포 생성물 주입 및/또는 주입을 위한 냉동보존***

[0228] 본 개시내용의 약제학적 제형은 주입, 냉동보존 및/또는 보관을 위해 백 내에 분배될 수 있다.

[0229] 본 개시내용의 약제학적 제형은 표준 프로토콜 및 선택적으로 주입 가능한 냉동보존 배지를 사용함으로써 냉동보존될 수 있다. 예를 들면, DMSO 무함유 냉동보존제(예를 들면, CryoSOfree™ DMSO 무함유 냉동보존 배지)가 냉동 관련 독성을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 본 개시내용의 냉동보존된 약제학적 제형은 나중에 환자에게 주입하기 위해 보관될 수 있다. 효과적인 치료는 본 개시내용의 약제학적 제형의 다회 투여를 요구할 수 있으므로, 약제학적 제형은 냉동된 상태로 보관될 수 있으나 개별 용량의 해동을 위해 분리될 수 있는 미리 분취된 "용량"으로 포장될 수 있다.

[0230] 본 개시내용의 약제학적 제형은 실온에서 보관될 수 있다. 효과적인 치료는 본 개시내용의 약제학적 제형의 다회 투여를 요구할 수 있으므로, 약제학적 제형은 함께 보관될 수 있으나 개별 용량의 투여를 위해 분리될 수 있는 미리 분취된 "용량"으로 포장될 수 있다.

[0231] 본 개시내용의 약제학적 제형은 동종이계 요법의 경우, 예를 들면, 병태의 관해 및 재발 후 나중에 투여를 필요로 할 수 있는 동일한 환자를 위한 추가 용량을 생성하기 위한 후속 재확장 및/또는 선택을 위해 보관될 수 있다.

[0232] ***제형***

[0233] 상기 인지된 바와 같이, 본 개시내용은 바람직하게는 식염수 또는 선택된 염을 가진 인산염 완충제뿐만 아니라, 보존제를 함유하는 보존된 용액 및 제형도 포함하는 안정한 제형뿐만 아니라, 약제학적으로 허용가능한 제형 중에 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 포함하는, 약학 또는 수의학 용도에 적합한 다용도 보존된 제형도 제공한다. 보존된 제형은 수성 희석제 중에 선택적으로 적어도 하나의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 아질산페닐수은, 페녹시에탄올, 포름알데하이드, 클로로부탄올, 염화마그네슘(예를 들면, 육수화물), 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 염화벤즈알코늄, 염화벤즈에토늄, 데하이드로아세트산나트륨 및 티메로살로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 알려진 보존제, 또는 이들의 중합체 또는 혼합물을 함유한다. 임의의 적합한 농도 또는 혼합물, 예컨대, 약 0.0015%, 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분획은 당분야에서 알려진 바와 같이 사용될 수 있다. 비제한적 예는 보존제 부재, 약 0.1% 내지 2% m-크레졸(예를 들면, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.9%, 1.0%), 약 0.1% 내지 3% 벤질 알코올(예를 들면, 0.5%, 0.9%, 1.1%, 1.5%, 1.9%, 2.0%, 2.5%), 약 0.001% 내지 0.5% 티메로살(예를 들면, 0.005%, 0.01%), 약 0.001% 내지 2.0% 페놀(예를 들면, 0.05%, 0.25%, 0.28%, 0.5%, 0.9%, 1.0%), 0.0005% 내지 1.0% 알킬파라벤(들)(예를 들면, 0.00075%, 0.0009%, 0.001%, 0.002%, 0.005%, 0.0075%, 0.009%, 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.075%, 0.09%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5%, 0.75%, 0.9%, 1.0%) 등을 포함한다.

[0234] 상기 인지된 바와 같이, 본 발명은 포장재, 및 선택적으로 수성 희석제 중에 규정된 완충제 및/또는 보존제와 함께 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 포함하는 적어도 하나의 바이알을 포함하는 제품을 제공하고, 이때 상기 포장재는 이러한 용액이 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 9시간, 12시간, 18시간, 20시간, 24시간, 30시간, 36시간, 40시간, 48시간, 54시간, 60시간, 66시간, 72시간, 또는 그 이상의 시간에 걸쳐 유지될 수 있음을 표시하는 라벨을 포함한다. 본 발명은 포장재 및 동결건조된 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 포함하는 제1 바이알, 및 처방된 완충제 또는 보존제의 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알을 포함하는 제품을 포함하고, 상기 포장재는 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제 내에 재구성하여 24시간 또는 그 초과의 시간에 걸쳐 유지될 수 있는 용액을 형성하도록 환자에게 지시하는 라벨을 포함한다.

[0235] 본 발명에 따라 사용되는 적어도 1종의 단백질 스캐폴드는 포유동물 세포 또는 트랜스제닉 제형을 포함하는 재조합 수단에 의해 제조될 수 있거나, 또는 본원에 기재되거나 당업계에 알려진 바와 같은 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다.

[0236] 본 발명의 제품에서 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 범위는 재구성 시에, 습윤/건조 시스템의 경우 약 1.0 μg/ml 내지 약 1000 mg/ml 농도를 생성하는 양을 포함하지만, 더 낮거나 높은 농도가 사용 가능하고 의도하는 전달 비히클에 의존적인데, 예를 들어 용액 제형은 경피 패치, 폐, 경점막, 또는 삼투압 또는 마이크로 펌프 방법

에 의해 달라질 것이다.

[0237] 바람직하게는, 선택적으로 수성 희석제는 약제학적으로 허용가능한 보존제를 추가로 포함한다. 바람직한 보존제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 디하이드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물로 이루어진으로부터 선택된 것을 포함한다. 제형 내에 사용되는 보존제의 농도는 항-미생물 효과를 내기에 충분한 농도이다. 그러한 농도는 선택된 보존제에 따라 결정되고, 당업자에 의해 쉽게 결정된다.

[0238] 다른 부형제, 예를 들어 등장화제, 완충제, 항산화제, 보존성 증강제는 선택적으로 바람직하게는 희석제에 첨가된다. 글리세린과 같은 등장화제는 알려진 농도에서 통상 사용된다. 생리학상 허용되는 완충제는 바람직하게는 향상된 pH 제어를 제공하기 위해 첨가된다. 제형은 약 pH 4 내지 약 pH 10과 같은 넓은 범위의 pH를 포함할 수 있고, 바람직한 범위는 약 pH 5 내지 약 pH 9이고, 가장 바람직한 범위는 약 6.0 내지 약 8.0이다. 바람직하게는 본 발명의 제형은 약 6.8 내지 약 7.8의 pH를 갖는다. 바람직한 완충제는 인산염 완충제, 가장 바람직하게는 인산나트륨, 특히 인산염 완충 염수(PBS)를 포함한다.

[0239] 약제학적으로 허용가능한 가용화제, 예를 들어 트윈 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트), 트윈 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레이트), 플루로닉(Pluronic) F68(폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 또는 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉 폴리올과 같은 비이온성 계면활성제, 다른 블록 공중합체, 및 EDTA 및 EGTA 같은 킬레이팅제와 같은 다른 첨가제가 응집을 감소시키기 위해 제형 또는 조성물에 선택적으로 첨가될 수 있다. 이들 첨가제는 펌프 또는 플라스틱 용기가 제형을 투여하기 위해 사용될 경우에 특히 유용하다. 약제학적으로 허용가능한 계면활성제의 존재는 단백질 응집 성향을 완화시킨다.

[0240] 본 발명의 제형은 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를, 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 나트륨 디하이드로아세테이트 및 티메로살 또는 수성 희석제 내의 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 보존제와 혼합하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 내의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 및 보존제의 혼합은 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 제형을 제조하기 위해, 예를 들어, 측정된 양의 완충제 용액 내의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드가 요구되는 농도의 단백질 및 보존제를 제공하기에 충분한 양의 완충 용액 내의 요구되는 보존제와 조합한다. 이 방법의 변형법은 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0241] 특허 청구되는 제형은 투명한 용액으로서, 또는 물, 보존제 및/또는 부형제, 바람직하게는 인산염 완충제 및/또는 염수 및 선택된 염을 수성 희석제 내에 포함하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결건조된 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성을 요구하는 이중 바이알은 여러 번 재사용될 수 있고 단일 또는 여러 주기의 환자 치료에 충분하고 따라서 현재 사용되는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.

[0242] 본 청구된 제품은 즉시 내지 24시간 또는 그 이상의 범위에 걸친 기간에 투여하는 것에 유용하다. 따라서, 현재 청구된 제품은 환자에게 상당한 이점을 제공한다. 본 발명의 제형은 선택적으로 약 2℃ 내지 약 40℃의 온도에서 안전하게 보관될 수 있고, 장기간 동안 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있으므로, 용액이 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 또는 96시간 이상의 기간에 걸쳐 유지되고/되거나 사용될 수 있다는 점을 지시하는 포장 라벨을 허용한다. 보존된 희석제가 사용된 경우, 상기 라벨은 최대 1 내지 12달, 반년, 1년 반, 및/또는 2년의 사용을 포함할 수 있다.

[0243] 본 발명에서 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 용액은 수성 희석제에 적어도 하나의 항체를 혼합하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있다. 혼합은 통상의 용해 및 혼합 절차를 사용하여 수행한다. 적합한 희석제를 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충제 중의 측정된 양의 적어도 하나의 항체를 단백질 및 선택적으로 보존제 또는 완충제를 요구되는 농도로 제공하기에 충분한 양으로 배합한다. 이 방법의 변형법은 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0244] 특허 청구되는 제품은 투명한 용액으로서 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알을 사용하여 재구성되는, 동결건조된 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일

용액 바이알 또는 재구성될 필요가 있는 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고 환자 치료의 단일 또는 여러 사이클을 충족시킬 수 있고 따라서 현재 이용할 수 있는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0245] 특허 청구되는 제품은 투명한 용액, 또는 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결된 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알을 약국, 병원, 또는 다른 기관 및 기구에 제공하여 환자에게 간접적으로 제공될 수 있다. 이 경우 투명한 용액은 최대 1리터 이상의 크기일 수 있고, 이는 소량의 바이알에 전달하기 위해 그로부터 소량의 적어도 하나의 항체 용액이 1회 또는 다회 회수될 수 있고 약국 또는 병원에 의해 고객 및/또는 환자에게 제공될 수 있는 큰 저장소를 제공한다.

[0246] 이들 단일 바이알 시스템을 포함하는 인식 장치는 용액 전달을 위한 펜-인젝터, 예컨대, BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen®, 및 OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, Iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, 예를 들어, Becton Dickinson(미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, www.bectondickenson.com), Disetronic(스위스 부르그도르프 소재, www.disetronic.com; Bioject(미국 오레곤주 포틀랜드 소재)(www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical(영국 피터보로우 소재, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재, www.mediject.com)로부터 제조되거나 개발된 것 및 유사한 적합한 장치를 포함한다. 이중 바이알 시스템을 포함하는 승인된 장치는 HumatroPen®과 같은 재구성 용액의 전달을 위한 카트리지 내의 동결건조된 약물을 재구성하기 위한 펜-인젝터를 포함한다. 적합한 다른 장치의 예는 사전 충전 주사기, 오토-인젝터, 무니들(needle free) 인젝터 및 무니들 IV 주입 세트를 포함한다.

[0247] 본 발명에서 특허 청구되는 제품은 포장재를 포함한다. 포장재는 규제 당국에 의해 요구되는 정보 이외에 제품을 사용할 수 있는 조건을 제공한다. 본 발명의 포장재는 2개의 바이알, 습윤/건식 제품에 대하여 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제에 재구성하여 용액을 제조하고, 용액을 2 내지 24시간 이상의 기간에 걸쳐 사용하도록 하는 지시사항을 환자에게 제공한다. 단일 바이알, 용액 제품에 대하여, 라벨은 상기 용액을 2 내지 24시간 이상의 기간에 걸쳐 사용할 수 있음을 나타낸다. 본 발명에서 특허 청구되는 제품은 인간의 제약 제품 용도로 유용하다.

[0248] 본 발명의 제형은 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 및 선택된 완충제, 바람직하게는 염수 또는 선택된 염을 함유하는 인산염 완충제와 혼합하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 내에 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 및 완충제를 혼합하는 것은 통상의 용해 및 혼합 방법에 의해 수행된다. 적합한 제형을 제조하기 위하여, 예를 들어 물 또는 완충제 중의 측정된 양의 적어도 하나의 항체를, 요구되는 농도의 단백질 및 완충제를 제공하기 충분한 양의 물 중의 요구되는 완충제와 배합한다. 이 방법의 변형법은 당업자에 의해 인식될 것이다. 예를 들어, 성분이 첨가되는 순서, 추가의 첨가제 사용 여부, 제형 제조 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단에 대해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0249] 특허 청구되는 안정한 또는 보존된 제형은 투명한 용액으로서 또는 수성 희석제 중의 보존제 또는 완충제 및 부형제를 포함하는 제2 바이알로 재구성되는, 동결건조된 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성될 필요가 있는 이중 바이알은 수회 재사용될 수 있고 환자 치료의 단일 또는 여러 사이클을 충족시킬 수 있고 따라서 현재 이용할 수 있는 것보다 더 편리한 치료 요법을 제공한다.

[0250] 단백질 스캐폴드를 안정화시키는 다른 제형 또는 방법을 통해, 단백질 스캐폴드를 포함하는 동결건조된 분말의 투명한 용액 이외의 것을 수득할 수 있다. 투명하지 않은 용액 중에는 입자 현탁액을 포함하는 제형이 존재하며, 상기 입자는 다양한 크기의 구조를 갖는 단백질 스캐폴드를 포함하는 조성물이며, 미세구, 마이크로입자, 나노입자, 나노스피어, 또는 리포좀으로 다양하게 알려져 있다. 활성 물질을 포함하는 상대적으로 균질하고 본질적으로 구형인 입자 제형은 미국 특허 제4,589,330호에 교시된 바와 같이, 활성 물질 및 중합체를 함유하는 수성 상과 비수성 상을 접촉시킨 후, 비수성 상을 증발시켜 수성 상으로부터 입자를 응결시켜 제조할 수 있다. 다공성 마이크로입자는 미국 특허 제4,818,542호에 교시된 바와 같이 연속 용매 중에 분산되어 있는 활성 물질 및 중합체를 포함하는 제1 상을 사용하고 냉동-건조 또는 희석- 추출-침전에 의해 현탁액으로부터 상기 용매를 제거하여 제조할 수 있다. 제조에 바람직한 중합체는 천연 또는 합성 공중합체 또는 중합체이고, 이는 젤라틴 아가, 전분, 아라비노갈락탄, 알부민, 콜라겐, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜라이드-L(-) 락티드, 폴리(엡실론-카프로락톤), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-락트산), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-글리콜산), 폴리(β-하이드록시 부티르산), 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌, 폴리(알킬-2-시아노아크릴레이트), 폴리(하이드록시

에틸 메타크릴레이트), 폴리아미드, 폴리(아미노산), 폴리(2-하이드록시에틸 DL-아스파르타미드), 폴리(에스테르 우레아), 폴리(L-페닐알라닌/에틸렌 글리콜/1,6-디아이소시아나토헥산) 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특히 바람직한 중합체는 폴리에스테르, 예를 들어 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜라이드-L(-) 락티드, 폴리(엡실론-카프로락톤), 폴리(엡실론-카프로락톤-코-락트산), 및 폴리(엡실론-카프로락톤-코-글리콜산)이다. 중합체 및/또는 활성 물질의 용해에 유용한 용매는 물, 헥사플루오로이소프로판올, 메틸렌클로라이드, 테트라하이드로푸란, 헥산, 벤젠, 또는 헥사플루오로아세톤 세스퀴하이드레이트이다. 제2 상과 함께 활성 물질을 포함하는 상을 분산시키는 방법은 노즐 내 오리피스를 통해 상기 제1 상에 압력을 가하여 소적 형성에 영향을 주는 것을 포함할 수 있다.

[0251] 건조 분말 제형은 동결건조 이외의 공정, 예를 들어, 결정질 조성물을 분무 건조시키거나 증발시키거나 침전에 의해 용매를 추출한 후, 수성 또는 비수성 용매를 제거하는 하나 이상의 단계에 의해 수득할 수 있다. 분무 건조된 단백질 스캐폴드의 제조는 미국 특허 제6,019,968호에 교시되어 있다. 단백질 스캐폴드-기재 건조 분말 조성물은 흡입가능한 건조 분말을 제공하기 위한 조건 하에서 용매 중의 단백질 스캐폴드, 및 선택적으로 부형제의 용액 또는 슬러리를 분무 건조시켜 제조할 수 있다. 용매는 용이하게 건조될 수 있는 극성 화합물, 예를 들어 물 및 에탄올을 포함할 수 있다. 산소의 부재 하에, 예를 들어, 질소 담요 하에 또는 건조 기체로서 질소를 사용하여 분무 건조법을 수행하여 단백질 스캐폴드 안전성을 증진시킬 수 있다. 다른 상대적으로 건조된 제형은 국제공개 WO9916419호에 교시된 바와 같이 일반적으로 하이드로플루오로알칸 추진제를 포함하는 현탁 매질 중에 분산된 복수의 천공된 미세구조의 분산액이다. 안정화된 분산액을 계량 투여 흡입기를 사용하여 환자의 폐로 투여할 수 있다. 분무 건조된 약제의 상업적 제조에 유용한 장비는 Buchi Ltd. 또는 Niro Corp.에서 제조되었다.

[0252] 본원에 기재된 안정한 또는 보존된 제형 또는 용액 내의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드는 당업계에 공지된 바와 같이 SC 또는 IM 주사; 경피, 폐, 경점막, 임플란트, 삼투 펌프, 카트리지, 마이크로 펌프, 또는 당업자가 이해하는 다른 방법을 비롯한 다양한 전달 방법을 통하여 본 발명에 따라 환자에게 투여될 수 있다.

[0253] ***치료 적용***

[0254] 본 발명은 또한 당분야에서 알려져 있거나 본원에 기재된 바와 같이 본 발명의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 사용하여, 예를 들면, 치료 유효량의 단백질 스캐폴드를 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자에게 투여하거나 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자와 접촉시킴으로써 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자에서 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자에서 악성 질환을 포함하나 이것으로 제한되지 않는 질환을 조절하거나 치료하는 방법도 제공한다.

[0255] 본 발명은 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자에서 하기 악성 질환들 중 적어도 하나의 악성 질환을 포함하나, 이들로 제한되지 않는 적어도 하나의 암 또는 악성 질환을 조절하거나 치료하는 방법을 또한 제공한다: 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 림프구성 백혈병, B 세포, T 세포 또는 FAB ALL, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 골수성 백혈병, 만성 골수구성 백혈병(CML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 모발 세포 백혈병, 골수형성이상 증후군(MDS), 림프종, 호지킨병, 악성 림프종, 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 다발성 골수종, 재발 다발성 골수종, 난치성 다발성 골수종, 카포시 육종, 대장암종, 췌장암종, 비인두암종, 악성 조직구증, 부신생물성 증후군/악성 고칼슘혈증, 고형 종양, 방광암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 결장직장암, 자궁내막암, 두부암, 경부암, 유전성 비용종성 암, 호지킨 림프종, 간암, 폐암, 비-소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 거세-저항성 전립선암, 신장세포암종, 고환암, 선암종, 육종, 악성 흑색종, 혈관종, 전이성 질환, 암 관련 골 재흡수, 암 관련 골 통증 등. 일부 실시형태에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 실시형태에서, 암은 재발 다발성 골수종이다. 일부 실시형태에서, 암은 난치성 다발성 골수종이다. 일부 실시형태에서, 암은 고형암이다. 일부 실시형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시형태에서, 암은 거세-저항성 전립선암(CRPC)이다. 일부 실시형태에서, 고형암은 유방암, 결장직장암, 폐암, 난소암, 췌장암 또는 신장암이다. 일부 실시형태에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다.

[0256] 본 개시내용은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T-세포의 집단을 포함하는 제1 조성물로서, CAR은 항원 인식 도메인을 포함하는, 제1 조성물; 및 항-CD20 작용제를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 아이오딘 i131 토시투모맙, 오비누투주맙 또는 이브리투모맙이다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 작용제는 리툭시맙(RITUXAN ®)이다.

[0257] 일부 실시형태에서, CAR-T 및 항-CD20 작용제를 대상체에게 투여하면 CAR-T 단독이 투여된 대상체와 비교할 때 대상체에서 CAR-T의 생체내 생존 및 지속이 증가된다. 일부 실시형태에서, 혈액 샘플에서 CAR-T 카피/mL 또는

CAR-T 카피/ug DNA는 지속성에 대한 프록시로서, 시간 기간에 걸쳐서 결정된다. 일부 실시형태에서, 혈장 농도 곡선의 곡선 하 면적(AUC)(즉, 상단의 혈장 농도 곡선 및 하단의 x-축(시간)에 의해 정의된 면적)은 지속성의 척도로서 사용된다. 일부 실시형태에서, 100일 후(시간) 혈장 농도 곡선의 AUC가 지속성의 척도로서 사용된다. 대상체에서 증가된 CAR-T 지속성은 치료에 대한 개선된 반응의 우수한 효과를 제공한다. 대상체에서 증가된 AUC는 치료에 대한 개선된 반응의 우수한 효과를 제공한다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이며, CAR 단독이 투여된 대상체에서의 반응보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1500%, 2000% 또는 3000%(이 사이의 모든 백분율 증분 포함, 예를 들어, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%) 더 큰 증가를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "향상된" 양은 CAR-T 단독이 투여된 대상체에서의 반응보다 1% 내지 10%, 10% 내지 20%, 20% 내지 30%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 50% 내지 60%, 60% 내지 70%, 70% 내지 80%, 80% 내지 90%, 90% 내지 100%, 100% 내지 150% 또는 150% 내지 200% 더 큰 증가를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR-T 및 항-CD20 작용제와 함께 투여된 대상체에서 CAR-T의 지속성은 CAR-T 단독이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 75% 더 높다. 일부 실시형태에서, CAR-T 및 항-CD20 작용제와 함께 투여된 대상체에서 CAR-T의 지속성은 CAR-T 단독이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 90% 더 높다.

[0258] 일부 실시형태에서, CAR 및 항-CD20 작용제를 대상체에게 투여하면 CAR 단독이 투여된 대상체와 비교할 때 대상체에서 CAR의 생체내 지속성 및 확장이 증가된다. 일부 실시형태에서, CAR 및 항-CD20 작용제를 대상체에게 투여하면 CAR 단독이 투여된 대상체와 비교할 때 대상체에서 CAR의 생체내 지속성이 증가되지만, 확장에는 영향이 없다.

[0259] 본원에서 사용되는 용어 "항-약물 항체" 또는 "ADA"는 대상체에 존재하는 치료용 단백질에 대해서 대상체에서 생성된 항체를 지칭한다. 전통적인 항-약물 항체(ADA) 반응은 대상체에 대한 재조합 치료용 단백질의 전신 투여로부터 유발된다는 것이 당업계에서 이해된다. 더욱이, CAR-T 치료제와 관련하여 본원에서 사용되는 바와 같이, ADA 반응은 본원에 기재된 연구에서 관찰된 항체 반응을 포함하도록 의도되며, 여기서 CAR-T에 결합하는 항체가 생성되었다(즉, P-BCMA-101 CAR-T에 대해서 생성된 항체).

[0260] 일부 실시형태에서, 대상체에게 CAR-T 및 항-CD20 작용제를 투여하면 CAR-T 단독이 투여된 대상체와 비교할 때 대상체에서 CAR-T에 대한 항-약물 항체(ADA) 반응기 감소되었다. 일부 실시형태에서, ADA 반응은 메조 스케일 발견(MSD: meso scale discovery) 검정을 사용하여 시간 경과에 따라서 말초 혈액에서 투여된다. 대상체에서 ADA 반응의 감소는 치료에 대한 개선된 반응의 우수한 효과를 제공한다. "감소된" 또는 "낮아진" 양은 전형적으로 "통계적으로 유의한" 양이며, CAR-T 단독이 투여된 대상체에서의 반응보다 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%(이 사이의 모든 백분율 증분 포함, 예를 들어, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%) 더 낮은 감소를 포함할 수 있다. "감소된" 또는 "낮아진" 양은 CAR-T 단독이 투여된 대상체에서 반응보다 1% 내지 10%, 10% 내지 20%, 20% 내지 30%, 30% 내지 40%, 40% 내지 50%, 50% 내지 60%, 60% 내지 70%, 70% 내지 80%, 80% 내지 90% 또는 90% 내지 100% 더 낮은 감소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR-T 및 항-CD20 작용제와 함께 투여된 대상체에서 CAR-T에 대한 항-약물 항체 반응은 CAR-T 단독이 투여된 대상체와 비교하여 적어도 50% 더 낮다.

[0261] 본 발명의 임의의 방법은 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 포함하는 유효량의 조성물 또는 약제학적 조성물을, 이러한 조절, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 장기, 동물 또는 환자에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 방법은 선택적으로 이러한 질환 또는 장애를 치료하기 위해 공동투여 또는 조합 요법을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 상기 적어도 하나의 단백질, 스캐폴드, 이의 명시된 부분 또는 변이체의 투여는 이전에, 동시에 및/또는 후에 알킬화제, 유사분열 저해제 및 방사성의약품 중 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 적합한 용량은 당분야에서 공지되어 있다. 예를 들면, 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌[Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000)]; 문헌[PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000)]; 문헌[Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, Pa., 2001]; 문헌[Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, N.J.]을 참조한다.

[0262] 바람직한 용량은 선택적으로 약 0.1 내지 99 및/또는 100 내지 500 mg/kg/투여 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분율을 포함할 수 있고, 단일 또는 다중 투여당 약 0.1 내지 5000 μg/ml의 혈청 농도를 달성하기 위해서 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분율을 포함할 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드에 대한 바람직한 투여량 범위는

약 1 mg/kg, 최대 약 3, 약 6 또는 약 12 mg/kg 환자의 체중이다.

[0263] 대안적으로, 투여량은 알려진 인자, 예를 들어, 특정 작용제의 약물동태학적 특성 및 이의 투여 방식 및 경로; 수여자의 연령, 건강 및 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료 빈도, 및 요구되는 효과에 따라 달라질 수 있다. 통상적으로, 활성 성분의 투여량은 체중 1 킬로그램당 약 0.1 내지 100 밀리그램일 수 있다. 통상적으로, 0.1 내지 50, 바람직하게는 0.1 내지 10 밀리그램/킬로그램/투여 또는 지효성 형태가 요구되는 결과를 얻는 데 효과적이다.

[0264] 비제한적인 예로서, 인간 또는 동물의 치료는 단일 주입 또는 반복 용량을 사용하여 본 발명의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 1회 또는 주기적 투여량으로서 1 내지 40일 중 적어도 하나, 대안적으로 또는 추가로 적어도 1 내지 52주 중 적어도 하나, 또는 대안적으로 또는 추가로 1 내지 20년 중 적어도 하나에 1일당 약 0.1 내지 100 mg/kg 또는 이의 임의의 범위, 값 또는 분율이 제공될 수 있다.

[0265] 체내 투여에 적합한 투여 형태(조성물)은 일반적으로 단위 또는 용기당 약 0.001 밀리그램 내지 약 500 밀리그램의 활성 성분을 함유한다. 이들 약제학적 조성물에서, 활성 성분은 대체로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.5 내지 99.999 중량%의 양으로 존재할 것이다.

[0266] 일부 실시형태에서, P-BCMA-101 CAR을 발현하는 T 세포의 집단을 포함하는 제1 조성물은 적어도 0.1x$10^6$, 0.2 x$10^6$, 0.25 x$10^6$, 0.5 x$10^6$, 0.6 x$10^6$, 0.7 x$10^6$, 0.75 x$10^6$, 0.8 x$10^6$, 0.9 x$10^6$, 1x$10^6$, 2 x$10^6$, 3 x$10^6$, 4 x$10^6$, 5 x$10^6$, 6 x$10^6$, 7 x$10^6$, 8 x$10^6$, 9 x$10^6$, 10 x$10^6$, 11 x$10^6$, 12 x$10^6$, 13 x$10^6$, 14 x$10^6$, 15 x$10^6$, 16 x$10^6$, 17 x$10^6$, 18 x$10^6$, 19 x$10^6$ 또는 20 x$10^6$개 세포/대상체 체중 kg의 총 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, CAR-T 세포는 0.25 x$10^6$개 세포/kg/용량의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, CAR-T 세포는 0.75 x$10^6$개 세포/kg/용량의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, CAR-T 세포는 2 x$10^6$개 세포/kg/용량의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, CAR-T 세포는 6 x$10^6$개 세포/kg/용량의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, CAR-T 세포는 10 x$10^6$개 세포/kg/용량의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, CAR-T 세포는 15 x$10^6$개 세포/kg/용량의 용량으로 투여된다.

[0267] 비경구 투여의 경우, 단백질 스캐폴드는 약제학적으로 허용 가능한 비경구 비히클과 함께 또는 별도로 제공되는 용액, 현탁액, 에멀젼, 입자, 분말 또는 동결건조 분말로서 제형화될 수 있다. 그러한 비히클의 예는 물, 염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 1 내지 10% 인간 혈청 알부민이다. 리포좀 및 비수성 비히클, 예를 들어 고정유가 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조 분말은 등장성(예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성(예를 들어, 완충제 및 보존제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형을 알려진 기술 또는 적합한 기술에 의해 멸균시킨다.

[0268] 적합한 약제학적 담체가 이 분야의 표준 참고서인 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol]의 최신판에 개시되어 있다.

[0269] ***대안적인 투여***

[0270] 약제학적 유효량의 본 발명에 따른 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 투여를 위해 많은 기지의 개발된 방식이 이용될 수 있다. 폐 투여가 하기 설명에서 이용되며, 다른 투여 방식이 적합한 결과로 본 발명에 따라 이용될 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드는 흡입 또는 본원에서 기재되거나 당업계에 알려진 다른 방식에 의한 투여에 적합한 임의의 다양한 장치 및 방법을 이용하여, 용액, 에멀젼, 콜로이드, 현탁액 또는 건조 분말로서 담체 중에서 전달될 수 있다.

[0271] ***비경구 제형 및 투여***

[0272] 비경구 투여를 위한 제형은 통상적인 부형제로서 살균수 또는 염수, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜, 식물 기원의 오일, 수소화 나프탈렌 등을 함유할 수 있다. 주사를 위한 수성 또는 유성 현탁액은 알려진 방법에 따라 적당한 유화제 또는 습윤화제 및 현탁제를 이용하여 제조될 수 있다. 주사를 위한 제형은 용매 중의 수성 용액 또는 살균 주사용 용액 또는 현탁액과 같은 비-독성, 비-경구 투여 가능 희석제일 수 있다. 사용 가능한 비히클 또는 용매로서, 물, 링거액, 등장성 염수 등이 허용되며; 통상적인 용매 또는 현탁 용매로서, 멸균 비휘발성 오일이 이용될 수 있다. 이 목적을 위해 천연 또는 합성 또는 반합성 지방산 오일 또는 지방산; 천연 또는 반합성의 모노- 또는 디- 또는 트리-글리세리드를 포함하는 임의의 종류의 비휘발성 오일 및 지방산이 이

용될 수 있다. 비경구 투여는 당업계에 알려져 있고, 통상적인 주사 수단, 미국 특허 제5,851,198호에 기재된 기체 압력 무-바늘 주사 장치, 및 전문이 본원에 참조에 의해 포함된 미국 특허 제5,839,446호에 기재된 레이저 천공기 장치를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0273] ***대안적인 전달***

[0274] 본 발명은 추가로, 비경구, 피하, 근내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복강내, 관절낭내, 연골내, 강내, 체강내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장주위내, 복막내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉부내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼러스, 질내, 직장내, 협측(buccal), 설하, 비강내, 또는 경피 수단에 의한 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 투여에 관한 것이다. 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물은 특히 액체 용액 또는 현탁액의 형태로의 비경구(피하, 근내 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여를 위해; 특히 크림제 및 좌제(이에 제한되지 않음)와 같은 반고체 형태로의 질내 또는 직장내 투여에서의 사용을 위해; 정제 또는 캡슐제(이에 제한되지 않음)의 형태로의 협측 또는 설하 투여를 위해; 또는 분말, 또는 비점적제 또는 에어로졸 또는 특정 제형(이에 제한되지 않음)의 형태로 비강내로; 또는 젤, 연고, 로션, 현탁액 또는 피부 구조를 변경시키거나 경피 패치에서의 약물 농도를 증가시키기 위한 디메틸 설폭사이드와 같은 화학적 증진제를 갖거나 (문헌[Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994], 그리고 당업계에 널리 알려진 바와 같음), 또는 단백질 및 펩티드를 함유하는 제형의 피부 적용을 가능하게 하는 산화제를 갖거나 (국제공개 WO 98/53847호), 또는 전기천공과 같은 일시적 수송 경로를 형성하거나 또는 이온영동법과 같이 피부를 통해 하전된 약물의 이동을 증가시키는 전기장의 적용 또는 초음파 치료와 같은 초음파의 적용을 갖는 (미국 특허 제4,309,989호 및 제4,767,402호)(상기 문헌 및 특허는 당업계에 널리 알려져 있으며, 당업계에 널리 알려진 바와 같음) 패치 전달 시스템과 같이(이에 제한되지 않음) 경피적 사용을 위해 제조될 수 있다.

[0275] ***폐/비강 투여***

[0276] 폐 투여에 대해, 바람직하게는 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물은 폐 또는 동(sinus)의 더 낮은 기도에 도달하기에 효과적인 입자 크기로 전달된다. 본 발명에 따라, 적어도 1종의 단백질 스캐폴드는 흡입에 의한 치료제의 투여를 위해 당업계에 알려진 임의의 다양한 흡입 또는 비내 투여 장치에 의해 전달될 수 있다. 환자의 공강(sinus cavity) 또는 꽈리 내에 에어로졸화된 제형을 침적시킬 수 있는 상기 장치는 계량 투여 흡입기, 네불라이저, 건조 분말 생성기, 스프레이어 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드의 폐 또는 비내 투여에 적합한 기타 장치는 당업계에 알려져 있다. 그러한 모든 장치는 단백질 스캐폴드를 에어로졸로 분배하기 위해 투여에 적합한 제형을 이용할 수 있다. 그러한 에어로졸은 용액 (수성 및 비수성 모두) 또는 고체 입자로 구성될 수 있다.

[0277] Ventolin 계량 투여 흡입기와 같은 계량 투여 흡입기는 일반적으로 추진제 기체를 이용하며, 흡기 동안의 발동(actuation)을 필요로 한다(예를 들어, 국제공개 WO 94/16970호, WO 98/35888호 참조). Turbuhaler™(Astra), Rotahaler®(Glaxo), Diskus®(Glaxo), Spiros™ 흡입기(Dura), nhale Therapeutics에 의해 판매되는 장치, 및 Spinhaler® 분말 흡입기(Fisons)와 같은 건조 분말 흡입기는 혼합된 분말의 호흡-발동을 이용한다(전문이 참조에 의해 본원에 포함된 미국 특허 4,668,218, Astra, 유럽특허 제237507호 Astra, 국제공개 WO 97/25086호 Glaxo, WO 94/08552호 Dura, 미국 특허 제5,458,135호 Inhale, 국제공개 WO 94/06498호 Fisons). AERx™ Aradigm, Ultravent® 네불라이저(Mallinckrodt) 및 Acorn II® 네불라이저(Marquest Medical Products)(미국 특허 제5404871호 Aradigm, 국제공개 WO 97/22376호, 상기 참고 문헌은 전문이 참조에 의해 본원에 포함됨)와 같은 네불라이저는 용액으로부터 에어로졸을 생성시키고, 계량 투여 흡입기, 건조 분말 흡입기 등은 소입자 에어로졸을 생성한다. 상업적으로 이용 가능한 흡입 장치의 이러한 특별한 예는 본 발명의 실시를 위 해 적합한 특정 장치의 대표적인 것으로 의도되며, 본 발명의 범위가 이로 제한되는 것은 아니다.

[0278] 바람직하게는, 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 포함하는 조성물은 건조분말 흡입기 또는 스프레이어에 의해 전달된다. 본 발명의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 투여하기 위한 흡입 장치에는 몇몇 바람직한 특성이 있다. 예를 들어, 흡입 장치에 의한 전달은 유리하게 신뢰 가능하고, 재생산가능하고 정확하다. 흡입 장치는 선택적으로 우수한 흡입성을 위해, 예를 들어 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 내지 5 μm의 작은 건조 입자를 전달할 수 있다.

[0279] ***스프레이로서의 단백질 스캐폴드 조성물의 투여***

[0280] 단백질 스캐폴드 조성물을 포함하는 스프레이는 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 현탁액 또는 용액을 압력 하에서 노즐을 통과시켜 생산될 수 있다. 노즐 크기 및 입체형태, 적용되는 압력 및 액체 공급 속도는 요구되는 결

과 및 입자 크기를 달성하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 전기스프레이는 모세관 또는 노즐 공급부와 연결된 전기장에 의해 생산될 수 있다. 유리하게는, 스프레이에 의해 전달되는 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물의 입자는 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm, 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm의 범위의 입자 크기를 갖는다.

[0281] 스프레이어로의 사용에 적합한 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물의 제형은 일반적으로 용액 1 ml 당 또는 mg/gm 기준으로 약 0.1 mg 내지 약 100 mg 또는 그 내의 임의의 범위, 값 또는 분율의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물의 농도로 수용액 중의 단백질 스캐폴드 조성물을 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장성 작용제, 보존제, 계면활성제 및 바람직하게는 아연과 같은 시약을 포함할 수 있다. 제형은 또한 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물과 같은, 단백질 스캐폴드 조성물의 안정화를 위한 부형제 또는 물질을 포함할 수 있다. 단백질 스캐폴드 조성물의 제형화 시에 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드 조성물 제형화 시에 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드 조성물 제형은 또한 에어로졸을 형성함에 있어서 용액의 연무화(atomization)에 의해 야기되는 단백질 스캐폴드의 표면-유도된 응집을 감소하거나 방해할 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 그리고 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르와 같은 다양한 통상적인 계면활성제가 이용될 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 0.001 내지 14 중량%일 것이다. 본 발명의 목적을 위해 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 단백질 스캐폴드 또는 명시된 부분 또는 변이체와 같은 단백질의 제형화를 위해 당업계에 알려진 추가의 물질이 또한 제형 중에 포함될 수 있다.

[0282] ***네불라이저에 의한 단백질 스캐폴드 조성물의 투여***

[0283] 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 제트 네불라이저 또는 초음파 네불라이저와 같은 네불라이저에 의해 투여될 수 있다. 전형적으로, 제트 네불라이저에서는, 압축된 공기 원료가 구멍을 통해 고속 공기 제트를 형성하기 위해 이용된다. 노즐 너머로 기체를 팽창시켜, 낮은 압력 영역이 형성되고, 이 영역이 항체 조성물 용액을 액체 저장소와 연결된 모세관을 통해 배출시킨다. 모세관으로부터의 액체 흐름은 관을 나감으로써 불안정한 필라멘트 및 소적으로 전단되어, 에어로졸을 형성한다. 일정 범위의 입체형태, 유속 및 배플 유형이 소정의 제트 네불라이저로부터 요구되는 성능 특성을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 초음파 네불라이저에서, 고주파 전기에너지가 일반적으로 압전 변환기를 사용하여, 진동성의 기계적 에너지를 형성하기 위해 이용된다. 이 에너지는 직접 또는 커플링 용액을 통해 항체 조성물의 제형으로 전달되어 항체 조성물을 포함하는 에어로졸을 형성시킨다. 유리하게는, 네불라이저에 의해 전달되는 항체 조성물의 입자는 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm, 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm의 범위의 입자 크기를 갖는다.

[0284] 제트 또는 초음파 네불라이저에 사용하기 적합한 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 제형은 일반적으로 용액 1 ml 당 약 0.1 mg 내지 약 100 mg의 농도의 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 단백질을 포함한다. 제형은 부형제, 완충제, 등장성 작용제, 보존제, 계면활성제 및 바람직하게는 아연과 같은 시약을 포함할 수 있다. 제형은 또한 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물과 같은, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 안정화를 위한 부형제 또는 물질을 포함할 수 있다. 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물의 제형화 시에 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 제형화 시에 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 제형은 또한 에어로졸을 형성함에 있어서 용액의 연무화에 의해 야기되는 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 표면-유도된 응집을 감소하거나 방해할 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알코올, 그리고 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르와 같은 다양한 통상적인 계면활성제가 이용될 수 있다. 양은 일반적으로 제형의 약 0.001 내지 4 중량%일 것이다. 본 발명의 목적을 위해 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 단백질 스캐폴드와 같은 단백질의 제형을 위해 당업계에 알려진 추가의 물질이 또한 제형 중에 포함될 수 있다.

[0285] ***계량 투여 흡입기에 의한 단백질 스캐폴드 조성물의 투여***

[0286] 계량 투여 흡입기(MDI)에서는, 추진제, 적어도 1종의 단백질 스캐폴드, 및 임의의 부형제 또는 기타 첨가제가 액화 압축 기체를 포함하는 혼합물로서 캐니스터(canister) 내에 함유된다. 계량 밸브의 작동은 혼합물을, 바람직하게는 약 10 μm 미만, 바람직하게는 약 1 μm 내지 약 5 μm, 가장 바람직하게는 약 2 μm 내지 약 3 μm의 크기 범위의 입자를 함유하는 에어로졸로서 방출한다. 요구되는 에어로졸 입자 크기는 제트-연마, 스프레이 건조, 임계점 응축 등을 포함하는, 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 생산된 단백질 스캐폴드 조성물의 제형을

사용하여 얻을 수 있다. 바람직한 계량 투여 흡입기는 3M 또는 Glaxo에 의해 제조된 것 및 하이드로플루오로카본 추진제를 이용하는 것을 포함한다. 계량 투여 흡입기 장치에 사용하기 위한 적어도 1종의 단백질 스캐폴드의 제형은 일반적으로, 예를 들어 계면 활성제의 도움을 받는 추진제 중에 현탁된 비수성 매질 중의 현탁액으로서 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 함유하는 미분할된 분말을 포함할 것이다. 추진제는 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, HFA-134a(하이드로플루오로알칸-134a), HFA- 227(하이드로플루오로알칸-227) 등을 포함하는 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본 또는 하이드로카본과 같은 추진제가 상기 목적을 위해 사용되는 임의의 통상적인 물질일 수 있다. 바람직하게는 추진제는 하이드로플루오로카본이다. 계면활성제는 화학적 분해 등에 대해 활성 물질을 보호하기 위해 추진제 중의 현탁액으로서 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 안정화할 수 있도록 선택된다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트, 대두 레시틴, 올레산 등을 포함한다. 일부 경우에서, 용액 에어로졸은 에탄올과 같은 용매를 이용하는 것이 바람직하다. 단백질의 제형을 위해 당업계에 알려진 추가의 물질이 또한 제형 중에 포함될 수 있다. 당업자는 본 발명의 방법이 본원에서 설명되지 않은 장치를 통한 적어도 1종의 단백질 스캐폴드 조성물의 폐 투여에 의해 달성될 수 있음을 인식할 것이다.

[0287] ***경구 제형 및 투여***

[0288] 경구 투여용 제형은 장벽의 투과성을 인공적으로 증가시키기 위한 보조제(예를 들어, 레소르시놀 및 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르 및 n-헥사데실폴리에틸렌 에테르와 같은 비이온성 계면활성제)의 동시 투여 및 효소에 의한 분해를 저해하기 위한 효소 저해(예를 들어, 췌장 트립신 저해제, 디이소프로필플루오로포스페이트(DFF) 및 트라실롤)의 동시 투여에 따라 결정된다. 경구, 협측, 점막, 비강, 폐, 질내 막이동, 또는 직장내 투여가 의도되는, 단백질 및 항체 및 적어도 2종의 계면활성제의 조합물을 포함하는 친수성 물질의 전달을 위한 제형은 미국 특허 제6,309,663호에 교시되어 있다. 경구 투여를 위한 고형 투여 형태의 활성 성분 화합물은 수크로스, 락토스, 셀룰로스, 만니톨, 트레할로스, 라피노스, 말티톨, 덱스트란, 전분, 아가, 아르기네이트, 키틴, 키토산, 펙틴, 트라가칸트 고무, 아라비아 고무, 젤라틴, 콜라겐, 카제인, 알부민, 합성 또는 반합성 중합체 및 글리세리드를 포함하는 적어도 하나의 첨가제와 함께 혼합될 수 있다. 이들 투여 형태는 또한 다른 유형(들)의 첨가제, 예를 들어, 불활성 희석제, 스테아르산마그네슘과 같은 윤활제, 파라벤, 소르브산, 아스코르브산과 같은 보존제, 알파-토코페롤, 시스테인과 같은 항산화제, 붕해제, 결합제, 비후제, 완충제, 감미제, 향미제, 방향제 등을 함유할 수 있다.

[0289] 정제 및 환제는 장용 코팅된 제제로 추가로 처리될 수 있다. 경구 투여를 위한 액체 제제는 의학적 용도에 대해 허용 가능한 에멀젼, 시럽, 엘릭시르, 현탁액 및 용액 제제제를 포함한다. 이러한 제제는 상기 분야에서 통상적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어, 물을 함유할 수 있다. 리포좀은 또한 인슐린 및 헤파린에 대한 약물 전달 시스템으로서 설명되어 있다(미국 특허 제4,239,754호). 보다 최근에는, 혼합된 아미노산 (프로테노이드)의 인공 중합체의 미세구가 약물을 전달하기 위해 사용되어 왔다(미국 특허 제4,925,673호). 또한, 생물학적 활성제를 경구 전달하기 위해 이용되는, 미국 특허 제5,879,681호 및 미국 특허 제5,871,753호에 기재된 담체 화합물이 당업계에 알려져 있다.

[0290] ***점막 제형 및 투여***

[0291] 마이크로캡슐을 생성시키는 하나 이상의 생체적합성 중합체 또는 공중합체 부형제, 바람직하게는 생분해성 중합체 또는 공중합체 내에 캡슐화되는 생활성 물질을 경구 투여하기 위한 제형에서는, 상기 작용제가 생성되는 마이크로캡슐의 적당한 크기에 의해 위장관을 통과하는 물질에 의해 효율성이 손실되지 않으면서, 달리는 "페이어(Peyer)의 패치" 또는 "GALT"로 알려진 동물의 집합림프소절(lymphatic aggregati)에 도달되고 여기에서 흡수된다. 유사한 집합림프소절을 기관지관(BALT) 및 대장에서 찾아볼 수 있다. 상기에 기재된 조직은 일반적으로 점막에 관련된 림프세망 조직(MALT)으로 언급된다. 점막 표면을 통한 흡수를 위해 적어도 1종의 단백질 스캐폴드를 투여하는 조성물 및 방법은 복수의 미크론 미만의 입자, 점막부착 거대분자, 생물활성 펩티드, 및 에멀젼 입자의 점막부착을 달성함으로써 점막 표면을 통한 흡수를 증진시키는 수성 연속상을 포함하는 에멀젼을 포함한다(미국 특허 제5,514,670호). 본 발명의 에멀젼 적용에 적합한 점막 표면은 각막, 결막, 협측, 설하, 비내, 질내, 폐, 위, 장, 및 직장내 투여 경로를 포함할 수 있다. 질내 또는 직장내 투여를 위한 제형, 예를 들어 좌제는 부형제로서, 예를 들어 폴리알킬렌글리콜, 바셀린, 코코아 버터 등을 포함할 수 있다. 비강내 투여를 위한 제형은 고체일 수 있으며, 부형제로서, 예를 들어 락토스를 포함할 수 있거나, 또는 비내 점적제의 수성 또는 유성 용액일 수 있다. 협측 투여를 위한 부형제는 당, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 전호화 전분(pregelinatined starch) 등을 포함한다(미국 특허 제5,849,695호).

[0292] ***경피 제형 및 투여***

[0293] 경피 투여를 위해, 적어도 1종의 단백질 스캐폴드는 리포좀 또는 중합체 나노입자, 마이크로입자, 마이크로 캡슐, 또는 미세구(달리 언급하지 않으면 마이크로입자로서 집합적으로 언급됨)와 같은 전달 장치에 캡슐화된다. 폴리하이드록시산(예컨대 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 이의 공중합체), 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 및 폴리포스파진과 같은 합성 중합체, 및 콜라겐, 폴리아미노산, 알부민과 기타 단백질, 알지네이트와 기타 다당류와 같은 천연 중합체, 및 이의 조합으로 만들어진 마이크로입자를 포함하는 많은 수의 적합한 장치가 알려져 있다(미국 특허 제5,814,599호).

[0294] ***연장된 투여 및 제형***

[0295] 연장된 기간 동안, 예를 들어, 단일 투여로부터 1주 내지 1년의 기간 동안 대상체에게 본 발명의 화합물을 전달하는 것이 종종 바람직할 수 있다. 다양한 서방형, 데포, 임플란트 투여 형태가 이용될 수 있다. 예를 들어, 투여 형태는 예를 들어 (a) 인산, 황산, 시트르산, 타르타르산, 탄닌산, 파모산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌 모노- 또는 디-설폰산, 폴리갈락투론산 등과 같은 폴리염기산의 산 부가염, (b) 아연, 칼슘, 비스무트, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴 등과 같은 다가 금속 양이온을 갖거나, 예를 들어, N,N'-디벤질-에틸렌디아민 또는 에틸렌디아민으로부터 형성된 유기 양이온을 갖는 염; 또는 (c) 예를 들어, 탄닌산아연염과 같은 (a) 및 (b)의 조합물과 같은 체액 중에서 낮은 정도의 용해도를 갖는 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 비독성 염을 함유할 수 있다. 추가로, 본 발명의 화합물, 바람직하게는 상기 설명된 것과 같은 비교적 불용성의 염은 겔로, 예를 들어, 주사에 적합한, 예를 들어 참깨유를 갖는 알루미늄 모노스테아레이트 겔로 제형화될 수 있다. 특히 바람직한 염은 아연염, 탄닌산아연염, 파모산염 등이다. 주사를 위한 서방형 데포 제형의 다른 유형은 예를 들어 미국 특허 제3,773,919호에 기재된 폴리락트산/폴리글리콜산 중합체와 같은 서서히 분해되는, 비독성의 비항원성 중합체 중에 캡슐화를 위해 분산된 화합물 또는 염을 함유한다. 본 발명의 화합물, 바람직하게는 상기 기재된 바와 같이 비교적 불용성인 염은 특히 동물에서, 콜레스테롤 매트릭스 실라스틱(silastic) 펠렛 중에 제형화될 수도 있다. 추가의 서방제, 데포제 또는 임플란트 제형, 예를 들어, 기체 또는 액체 리포좀은 문헌에 알려져 있다(미국 특허 제5,770,222호 및 문헌["Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978]).

[0296] ***입양 세포 요법으로서 변형된 세포의 주입***

[0297] 본 개시내용은 선택된 및/또는 확장된 본 개시내용의 하나 이상의 CAR 및/또는 CARTyrin을 발현하는 변형된 세포로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위한 변형된 세포를 제공한다. 본 개시내용의 변형된 세포는 실온 및 체온을 포함하는 임의의 온도에서 보관되도록 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 냉동보존 및 후속 해동을 위해 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 멸균 포장물로부터 대상체에게 직접적으로 투여되도록 약제학적으로 허용 가능한 담체에 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 최소 수준의 세포 작용 및 CAR/CARTyrin 발현을 보장하기 위해 세포 생존능 및/또는 CAR/CARTyrin 발현 수준의 표시자와 함께 약제학적으로 허용 가능한 담체에 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 추가 확장을 억제하고/하거나 세포 사멸을 예방하는 하나 이상의 물질과 함께, 소정의 밀도로 약제학적으로 허용 가능한 담체에 제형화될 수 있다.

[0298] ***유도성 세포자멸사촉진(proapoptotic) 폴리펩티드***

[0299] 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 훨씬 덜 면역원성이기 때문에, 기존의 유도성 폴리펩티드보다 우수하다. 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이고, 따라서 비-자연적으로 발생하지만, 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드를 생성하도록 재조합된 서열들은 숙주 인간 면역계가 "비-자기"로서 인식하여, 그 결과 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드, 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드를 포함하는 세포, 또는 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드, 또는 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드를 포함하는 세포를 포함하는 조성물을 수여하는 대상체에서 면역 반응을 유도시킬 수 있는 비인간 서열을 포함하지 않는다.

[0300] 본 개시내용은 리간드 결합 영역, 링커 및 세포자멸사촉진 펩티드를 포함하는 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드를 제공하며, 이때 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포자멸사촉진 펩티드는 카스파제 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 9 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 카스파제 9 폴리펩티드는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드이다. 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 비-자연 발생적

일 수 있다.

[0301] 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 비제한적으로 카스파제 1, 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 4, 카스파제 5, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 카스파제 10, 카스파제 11, 카스파제 12, 및 카스파제 14를 포함한다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 비제한적으로 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 및 카스파제 10를 포함하는 세포자멸사와 연관된 카스파제 폴리펩티드를 포함한다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 비제한적으로 카스파제 2, 카스파제 8, 카스파제 9, 및 카스파제 10를 포함하는 세포자멸사를 개시하는 카스파제 폴리펩티드를 포함한다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 비제한적으로 카스파제 3, 카스파제 6, 및 카스파제 7를 포함하는 세포자멸사를 실행하는 카스파제 폴리펩티드를 포함한다.

[0302] 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교 시 하나 이상의 변형을 갖는 아미노산 또는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 코돈 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 아미노산 및/또는 핵산 서열에 대한 하나 이상의 변형은 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교 시 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 상호작용, 가교, 가교-활성화 또는 활성화를 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 아미노산 및/또는 핵산 서열에 대한 하나 이상의 변형은 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교 시 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 면역원성을 감소시킬 수 있다.

[0303] 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 야생형 카스파제 폴리펩티드와 비교 시 절두될 수 있다. 예를 들어, 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 활성화 및 모집 도메인(CARD: Caspase Activation and Recruitment Domain)을 코딩하는 서열을 제거하도록 절두되어 본 개시내용의 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 세포에서 세포자멸사를 개시하는 것 외에도 국소 염증 반응을 활성화할 가능성을 제거하거나 최소화할 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 스플라이싱되어 야생형 카스파제 폴리펩티드와 비교되는 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 변이체 아미노산 서열을 형성할 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 재조합 및/또는 키메라 서열에 의해 코딩될 수 있다. 본 개시내용의 재조합 및/또는 키메라 카스파제 폴리펩티드는 하나 이상의 상이한 카스파제 폴리펩티드로부터의 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 본 개시내용의 재조합 및/또는 키메라 카스파제 폴리펩티드는 하나 이상의 종으로부터의 서열(예를 들어 인간 서열 및 비인간 서열)을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 비-자연적으로 발생할 수 있다.

[0304] 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 리간드 결합 영역은 본 개시내용의 제1 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 본 개시내용의 제2 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드와의 이량체화를 용이하게 하거나 촉진하는 임의의 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있으며, 이때 상기의 이량체화는 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 가교 및 세포 내 세포자멸사의 개시를 유도한다.

[0305] 리간드-결합("이량체화") 영역은 자연 또는 비자연 리간드(즉, 및 유도제), 예를 들어 비자연 합성 리간드를 이용한 유도를 허용하는 임의의 폴리펩티드 또는 그의 기능적 도메인을 포함할 수 있다. 리간드-결합 영역은 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 본성 및 리간드(즉, 유도제)의 선택에 따라 세포막의 내부 또는 외부에 있을 수 있다. 수용체를 포함하여 매우 다양한 리간드-결합 폴리펩티드 및 그의 기능 도메인이 알려져 있다. 본 개시내용의 리간드-결합 영역은 수용체로부터의 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 특히 흥미로운 것은 리간드(예를 들어, 소형 유기 리간드)가 알려져 있거나 손쉽게 생성될 수 있는 리간드-결합 영역이다. 이들 리간드-결합 영역 또는 수용체는 비제한적으로 FKBP 및 사이클로필린 수용체, 스테로이드 수용체, 테트라사이클린 수용체, 등뿐 아니라 "비자연" 수용체를 포함할 수 있으며, 이는 항체, 특히 중쇄 또는 경쇄 소단위, 그의 돌연변이된 서열, 확률적 절차, 조합 합성 등에 의해 수득된 랜덤 아미노산 서열로부터 수득될 수 있다. 특정 실시형태에서, 리간드-결합 영역은 FKBP 리간드-결합 영역, 사이클로필린 수용체 리간드-결합 영역, 스테로이드 수용체 리간드-결합 영역, 사이클로필린 수용체 리간드-결합 영역, 및 테트라사이클린 수용체 리간드-결합 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0306] 하나 이상의 수용체 도메인(들)을 포함하는 리간드-결합 영역은 비자연 도메인 또는 이의 절두된 활성 부위로서 적어도 약 50개의 아미노산 및 약 350개 미만의 아미노산, 통상적으로는 200개 미만의 아미노산일 수 있다. 결합 영역은 예를 들어 작을 수 있고(25 kDa 미만, 바이러스 벡터에서 효율적인 트랜스펙션을 허용하도록), 단량체, 비면역원성이며, 합성적으로 접근가능하고, 세포 투과성이며, 이량체화를 위해 구성될 수 있는 비독성 리간드를 가질 수 있다.

[0307] 하나 이상의 수용체 도메인(들)을 포함하는 리간드-결합 영역은 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 설계 및

적절한 리간드(즉, 유도제)의 이용가능성에 따라 세포내 또는 세포외에 있을 수 있다. 소수성 리간드의 경우, 결합 영역은 막의 양쪽에 있을 수 있으나, 친수성 리간드의 경우, 특히 단백질 리간드의 경우, 결합 영역은 결합에 이용가능한 형태로 리간드를 내재화하기 위한 수송 시스템이 존재하지 않는 한, 통상적으로 세포막에 대해 외부에 있을 것이다. 세포내 수용체의 경우, 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드, 또는 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드를 포함하는 트랜스포존 또는 벡터는 신호 펩티드 및 수용체 도메인 서열의 막관통 도메인 5' 또는 3'을 코딩할 수 있거나, 수용체 도메인 서열의 지질 부착 신호 서열 5'를 가질 수 있다. 수용체 도메인이 신호 펩티드와 막관통 도메인 사이에 존재하는 경우, 수용체 도메인은 세포외에 있을 수 있다.

[0308] 항체 및 항체 소단위, 예를 들어 중쇄 또는 경쇄, 특히 단편, 보다 특히 가변 영역의 전부 또는 일부, 또는 고친화성 결합을 생성하기 위한 중쇄 및 경쇄의 융합부는 본 개시내용의 리간드 결합 영역으로서 이용될 수 있다. 고려되는 항체는 면역 반응을 유발하지 않고 일반적으로 말초(즉, CNS/뇌 영역의 외부)에서 발현되지 않는 세포외 도메인과 같은 이소성 발현된 인간 생성물인 것을 포함한다. 이러한 예는 비제한적으로 저친화성 신경 성장 인자 수용체(LNGFR), 및 배아 표면 단백질(즉, 암배아 항원)을 포함한다. 또한 나아가, 항체는 생리학적으로 허용가능한 합텐 분자 및 결합 친화도에 대해 스크리닝된 개별 항체 소단위에 대해 제조될 수 있다. 소단위를 코딩하는 cDNA는 불변 영역, 가변 영역의 일부의 결실, 가변 영역의 돌연변이 등에 의해 단리되고 변형될 수 있어 리간드에 대해 적절한 친화도를 갖는 결합 단백질 도메인이 수득될 수 있다. 이러한 방식으로, 거의 모든 임의의 생리학적으로 허용가능한 합텐 화합물이 리간드로서 사용될 수 있거나, 리간드에 대한 에피토프를 제공할 수 있다. 항체 단위 대신에, 결합 영역 또는 도메인이 알려져 있고, 결합에 유용하거나 알려져진 리간드가 존재하는 자연 수용체가 이용될 수 있다.

[0309] 수용체를 다량체화하기 위해, 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 리간드-결합 영역/수용체 도메인에 대한 리간드는 리간드가 적어도 2개의 결합 부위를 가질 수 있고, 결합 부위 각각이 리간드 수용체 영역과 결합할 수 있다는 점(즉, 제1 결합 부위를 가진 리간드는 제1 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 리간드-결합 영역에 결합할 수 있고, 제2 결합 부위는 제2 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 리간드-결합 영역에 결합할 수 있으며, 이때 제1 및 제2 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 리간드-결합 영역은 동일하거나 뚜렷하게 구별됨)에서 다량체일 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다량체 리간드 결합 영역"은 다량체 리간드에 결합하는 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 리간드-결합 영역을 지칭한다. 본 개시내용의 다량체 리간드는 이량체 리간드를 포함한다. 본 개시내용의 이량체 리간드는 리간드 수용체 도메인에 결합할 수 있는 2개의 결합 부위를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 다량체 리간드는 작은 합성 유기 분자의 이량체 또는 고차 올리고머, 통상적으로는 대략 사량체 이하로, 개별 분자는 전형적으로 적어도 약 150 Da 및 약 5 kDa 미만, 통상적으로 약 3 kDa 미만이다. 합성 리간드 및 수용체의 각종 쌍이 활용될 수 있다. 예를 들어, 자연 수용체를 포함하는 실시형태에서, 이량체 FK506은 FKBP12 수용체와 함께 사용될 수 있고, 이량체화 사이클로스포린 A는 사이클로필린 수용체와 사용될 수 있고, 이량체화 에스트로겐은 에스테로겐 수용체, 이량체화 글루코코르티코이드는 글루코코르티코이드 수용체와, 이량체화 테트라사이클린은 테트라사이클린 수용체와, 이량체화 비타민 D는 비타민 D 수용체와, 기타 등등이 사용될 수 있다. 대안적으로 고차의 리간드, 예컨대 트라이머가 사용될 수 있다. 비자연 수용체, 예를 들어 항체 소단위, 변형된 항체 소단위, 가요성 링커에 의해 분리되어진, 탠덤의 중쇄 및 경쇄 가변 영역으로 이루어진 단일 사슬 항체, 또는 변형된 수용체 및 이의 돌연변이 서열 등을 포함하는 실시형태의 경우, 임의의 다양한 화합물이 이용될 수 있다. 본 개시내용의 다량체 리간드를 포함하는 단위의 유의미한 특징은 각각의 결합 부위가 고 친화도로 수용체에 결합할 수 있고, 바람직하게는 이들이 화학적으로 이량체화될 수 있다는 점이다. 또한, 리간드의 소수성/친수성의 균형을 맞추는 방법을 이용가능할 수 있어, 이들은 기능 수준에서 혈청에 용해될 수 있지만, 대부분의 응용 분야에서 원형질막을 통해 확산될 수 있다.

[0310] 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 활성화는 예를 들어 조건적으로 제어된 단백질 또는 폴리펩티드를 생성하기 위해 유도제에 의해 매개되는 화학적으로 유도된 이량체화(CID)를 통해 달성될 수 있다. 본 개시내용의 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 유도성일뿐 아니라, 불안정성 이량체화제의 분해 또는 이량체 경쟁 저해제의 투여로 인해 이들 폴리펩티드의 유도도 가역적이다.

[0311] 특정 실시형태에서, 리간드 결합 영역은 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 리간드 결합 영역은 위치 36에서 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 갖는 FKBP12 폴리펩티드를 포함한다. 리간드 결합 영역이 위치 36에서 페닐알라닌(F)에 대한 발린(V)의 치환(F36V)을 갖는 FKBP12 폴리펩티드를 포함하는 특정 실시형태에서, 유도제는 AP1903, 합성 약물 (CAS 인덱스 명칭: 2-피페리딘카르복실산, 1-[(2S)-1-옥소-2-(3,4,5-트리메톡시페닐)부틸]-, 1,2-에탄디일비스[이미노(2-옥소-2,1-에탄디일)옥시-3,1-페닐렌

[(1R)-3-(3,4-디메톡시페닐)프로필리덴]]에스테르, [2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R*]]]]-(9Cl) CAS 등록 번호: 195514-63-7; 분자식: C78H98N4O20; 분자량: 1411.65))을 포함할 수 있다. 리간드 결합 영역이 위치 36에서 페닐알라닌(F)에 대한 발린(V)의 치환(F36V)을 갖는 FKBP12 폴리펩티드를 포함하는 특정 실시형태에서, 유도제는 AP20187 (CAS 등록 번호: 195514-80-8 및 분자식: C82H107N5O20)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 유도제는 예를 들어 AP1510과 같은 AP20187 유사체이다. 본원에서 사용되는 유도제 AP20187, AP1903 및 AP1510는 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0312] AP1903 API는 Alphora Research Inc.에서 제작되고, AP1903 주사용 약물 제품은 Formatech Inc.에서 제조된다. 이는 비이온성 가용화제인 Solutol HS 15 (250 mg/mL, BASF)의 25% 용액 중 AP1903의 5 mg/mL 용액으로서 제형화된다. 실온에서, 이 제형은 투명하고, 약간 황색 용액이다. 냉장 시, 이 제형은 가역적 상 전이를 겪어 유백색(milky) 용액이 된다. 이러한 상 전이는 실온으로 다시 가온되면 반전된다. 충전물은 3 mL 유리 바이알에서 2.33 mL이다(대략적으로 바이알 당 총 주입에 대해 10 mg AP1903). AP1903을 투여할 필요성이 결정되면, 환자는 예를 들어 비-DEHP, 비-에틸렌 옥시드 멸균 주입 세트를 이용하여, 2시간에 걸쳐 IV 투입을 통해 주입용 AP1903의 단일 고정 용량(0.4 mg/kg)이 투여될 수 있다. AP1903의 용량은 모든 환자에 대해 개별적으로 계산되며, 체중이 10% 이상 변동되지 않는 한 다시 계산되지 않는다. 계산된 용량은 투입 전 0.9% 생리식염수에서 100 mL로 희석된다. AP1903의 이전 1상 연구에서, 24명의 건강한 지원자는 2시간에 걸쳐 IV 투입되는 주입용 AP1903을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/kg의 용량 수준에서 단일 용량으로 치료되었다. AP1903 혈장 수준은 용량에 정비례하였으며, 평균 Cmax 값은 0.01 내지 1.0 mg/kg 용량 범위에 걸쳐 대략 10 내지 1275 ng/mL 범위였다. 초기 투입 기간 후, 혈장 수준이 각각 투약 후 2 및 10시간에 0.5 mg/kg의 최대 농도의 대략 18, 7, 및 1%로 감소된 혈액 농도는 빠른 분포 상을 보였다. 주사용 AP1903은 모든 용량 수준에서 안정적이고, 내약성이 양호한 것으로 나타났으며, 유리한 약동학적 프로파일을 나타내었다(문헌[Iuliucci J D, et al., J Clin Pharmacol. 41: 870-9, 2001]).

[0313] 사용된 주사용 AP1903의 고정된 용량은 예를 들어 2시간에 걸쳐 정맥 투입되는 0.4 mg/kg일 수 있다. 세포의 효과적인 신호전달을 위해 시험관 내 필요한 AP1903의 양은 10 내지 100 nM(1600 Da MW)이다. 이는 16 내지 160 μg/L 또는 약 0.016 내지 1.6 μg/kg(1.6 내지 160 μg/kg)에 해당한다. 최대 1 mg/kg의 용량이 상기에 기재된 AP1903의 1상 연구에서 내약성이 양호하였다. 따라서, 0.4 mg/kg은 치료 세포와 조합된 상기 1상 연구를 위해 AP1903의 안전하고 효과적인 용량일 수 있다.

[0314] 본 개시내용의 리간드 결합을 코딩하는 아미노산 및/또는 핵산 서열은 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교 시 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 리간드 결합을 코딩하는 아미노산 및/또는 핵산 서열은 코돈-최적화 서열일 수 있다. 하나 이상의 변형은 야생형 폴리펩티드에 비해 본 개시내용의 리간드 결합 영역에 대한 리간드(예를 들어 유도제)의 결합 친화성을 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 또는 부가적으로, 하나 이상의 변형은 야생형 폴리펩티드에 비해 본 개시내용의 리간드 결합 영역의 면역원성을 감소시킬 수 있다. 본 개시내용의 리간드 결합 영역 및/또는 본 개시내용의 유도제는 비-자연적으로 발생할 수 있다.

[0315] 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 리간드 결합 영역, 링커 및 세포자멸사촉진 펩티드를 포함하며, 여기서 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 링커는 리간드 결합 영역의 이량체화 시 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 상호작용, 가교, 교차 활성화 또는 활성화를 허용하여 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 상호작용 또는 활성화가 세포에서 세포자멸사를 개시하도록 하는 임의의 유기 또는 무기 물질을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 링커는 G/S 풍부 아미노산 서열("GS" 링커)을 포함하는 폴리펩티드이다. 특정 실시형태에서, 링커는 아미노산 서열 GGGGS(서열번호 25)를 포함하는 폴리펩티드이다. 바람직한 실시형태에서, 링커는 폴리펩티드이고, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 제한 엔도뉴클레아제에 대한 제한 부위를 함유하지 않는다. 본 개시내용의 링커는 비-자연적으로 발생할 수 있다.

[0316] 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 세포에서 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 발현을 개시 및/또는 조절할 수 있는 임의의 프로모터의 전사 조절 하에서 그 세포에서 발현될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "프로모터"는 유전자를 전사하기 위해 RNA 폴리머라제에 대한 초기 결합 부위로서 작용하는 프로모터를 지칭한다. 예를 들어, 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 비제한적으로 천연, 내인성, 외인성 및 이종 프로모터를 포함하는 포유동물 세포에서 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 발현을 개시 및/또는 조절할 수 있는 임의의 프로모터의 전사 조절 하에서 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 바람직한 포유동물 세포는 인간 세포를 포함한다. 따라서, 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드는 이에 제한되는 것은 아니나 인간 프로모터 또는 바이러스 프로모터를 포함하는, 인간 세포에서 본 개시

내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 발현을 개시 및/또는 조절할 수 있는 임의의 프로모터의 전사 조절 하에서, 인간 세포에서 발현될 수 있다. 인간 세포에서 발현을 위한 예시적인 프로모터는 이에 제한되는 것은 아니나, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉각적 초기 유전자 프로모터, SV40 초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복, β-액틴 프로모터, 래트 인슐린 프로모터 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제 프로모터를 포함하고, 이들 각각은 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 고수준 발현을 수득하는 데 사용될 수 있다. 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 발현을 달성하기 위해 당업계에 공지되어진 다른 바이러스 또는 포유동물 세포 또는 박테리아 파지 프로모터의 사용도, 세포에서 세포자멸사를 개시하기에 충분한 발현 수준이라는 조건에서 고려될 수 있다. 공지된 특성을 가진 프로모터를 활용함으로써, 트랜스펙션 또는 형질전환 후 관심 단백질의 발현 수준 및 패턴이 최적화될 수 있다.

[0317] 특정 생리적 또는 합성 신호에 반응하여 조절되는 프로모터의 선택은 본 개시내용의 유도성 세포자멸사촉진 폴리펩티드의 유도성 발현을 허용할 수 있다. 엑디손 시스템(미국 캘리포니아 칼스배드 소재, Invitrogen)이 그러한 한 시스템이다. 이 시스템은 포유동물 세포에서 관심 유전자의 조절된 발현을 허용하도록 설계된다. 이것은 사실상 전이유전자의 기본 수준 발현을 허용하지 않지만 200배 이상의 유도성을 허용하는 단단하게 조절된 발현 기전으로 이루어진다. 시스템은 초파리(*Drosophila*)의 헤테로이량체 엑디손 수용체를 기반으로 하며, 엑디손 또는 유사체, 예컨대 뮤리스테론 A가 상기 수용체에 결합할 때, 수용체는 프로모터를 활성화시켜 하류 전이유전자의 발현을 켜 고수준의 mRNA 전사체가 얻어진다. 이 시스템에서, 헤테로이량체 수용체의 두 단량체는 하나의 벡터로부터 구성적으로(constitutively) 발현되는 반면에 관심 유전자의 발현을 구동시키는 엑디손-반응적 프로모터는 또 다른 플라스미드 상에 존재한다. 이러한 유형의 시스템의 관심 벡터로의 조작이 그리하여 유용할 수 있다. 유용할 수 있는 또 다른 유도성 시스템은 Gossen 및 Bujard가 원래 개발한 Tet-Off™ 또는 Tet-On™ 시스템(미국 캘리포니아 팔로 알토 소재, Clontech)이다(문헌[Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992]; 문헌[Gossen et al., Science, 268:1766-1769, 1995]). 이 시스템은 또한 테트라사이클린 또는 테트라사이클린 유도체, 예컨대 독시사이클린에 대한 반응으로 높은 수준의 유전자 발현이 조절되도록 한다. Tet-On™ 시스템에서, 독시사이클린의 존재 하에서는 유전자 발현이 켜지는 반면에, Tet-Off™ 시스템에서 유전자 발현은 독시사이클린의 부재 하에서 켜진다. 이들 시스템은 *이. 콜라이*(*E. coli*)의 테트라사이클린 저항성 오페론으로부터 유래된 2개의 조절 요소, 즉 테트라사이클린 작동자 서열(여기에 테트라사이클린 리프레서가 결합함) 및 테트라사이클린 리프레서 단백질을 기반으로 한다. 관심 유전자는 테트라사이클린-반응성 요소가 존재하는 프로모터 뒤의 플라스미드로 클로닝된다. 제2 플라스미드는 Tet-Off™ 시스템에서 단순 헤르페스 바이러스로부터의 VP16 도메인 및 야생형 테트라사이클린 리프레서로 이루어진 테트라사이클린-제어 트랜스활성화제(transactivator)라고 불리는 조절 요소를 함유한다. 따라서, 독시사이클린의 부재 하에서, 전사는 구성적으로 켜진다. Tet-On™ 시스템에서, 테트라사이클린 리프레서는 야생형이 아니며, 독시사이클린의 존재 하에서 전사를 활성화시킨다. 유전자 치료 벡터 생성을 위해, Tet-Off™ 시스템이 이용되어 생성자 세포가 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재 하에서 성장될 수 있고, 잠재적으로 독성인 전이유전자의 발현을 방지할 수 있지만, 벡터가 환자에 도입될 때 유전자 발현은 구성적으로 켜질 것이다.

[0318] 일부 상황에서, 유전자 치료 벡터에서 전이유전자의 발현을 조절하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 다양한 강도의 활성을 지닌 상이한 바이러스 프로모터들이 원하는 발현 수준에 따라 사용된다. 포유동물 세포에서, CMV 즉각적 초기 프로모터가 종종 사용되어 강력한 전사 활성화를 제공한다. CMV 프로모터는 문헌[Donnelly, J. J., et al., 1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48]에서 검토된다. 덜 강력한 CMV 프로모터의 변형된 버전은 전이유전자의 감소된 수준의 발현이 요구되는 경우에 사용되어 왔다. 조혈 세포에서 전이유전자의 발현이 요구되는 경우, 레트로바이러스 프로모터, 예컨대 MLV 또는 MMTV로부터의 LTR이 종종 사용된다. 원하는 효과에 따라 사용되는 기타 바이러스 프로모터는 SV40, RSV LTR, HIV-1 및 HIV-2 LTR, 아데노바이러스 프로모터, 예컨대 E1A, E2A, 또는 MLP 영역의 것, AAV LTR, HSV-TK, 및 조류 육종 바이러스를 포함한다.

[0319] 다른 예에서, 발달적으로 조절되고 특히 분화된 세포에서 활성인 프로모터가 선택될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 프로모터는 다능성 줄기 세포에서 활성이 아닐 수 있지만, 예를 들어 다능성 줄기 세포가 더 성숙한 세포내로 분화되는 경우, 프로모터는 활성화될 수 있다.

[0320] 유사하게 조직 특이적 프로모터는 비표적화된 조직에 대한 잠재적인 독성 또는 바람직하지 않은 효과를 감소시키기 위해 특정 조직 또는 세포에서 전사를 수행하는 데 사용된다. 이들 프로모터는 CMV 프로모터와 같은 더 강한 프로모터와 비교 시 발현이 감소될 수 있지만, 또한 더욱 제한된 발현 및 면역원성을 초래할 수 있다(문헌[Bojak, A., et al., 2002. Vaccine. 20:1975-79]; 문헌[Cazeaux, N., et al., 2002. Vaccine 20:3322-31]). 예를 들어, 조직 특이적 프로모터, 예컨대 PSA 관련 프로모터 또는 전립선-특이적 샘 칼리크레인, 또는 근육 크

레아틴 키나제 유전자가 적절한 경우 이용될 수 있다.

[0321] 조직 특이적 또는 분화 특이적 프로모터의 예는 비제한적으로 B29 (B 세포); CD14 (단핵구 세포); CD43 (백혈구 및 혈소판); CD45 (조혈 세포); CD68 (대식세포); 데스민 (근육); 엘라스타제-1 (이자외분비세포); 엔도글린 (내피 세포); 피브로넥틴 (분화 세포, 치유 조직); 및 Flt-1 (내피 세포); GFAP (성상 세포)를 포함한다.

[0322] 특정 적응증에서, 유전자 치료 벡터의 투여 후 특정 시간에 전사를 활성화하는 것이 바람직하다. 이것은 호르몬 또는 사이토카인 조절가능한 것으로서 이러한 프로모터를 이용하여 수행된다. 사용될 수 있는 사이토카인 및 염증성 단백질 반응성 프로모터는 K 및 T 키니노겐(문헌[Kageyama et al., (1987) J. Biol. Chem., 262, 2345-2351)], c-fos, TNF-알파, C-반응성 단백질(문헌[Arcone, et al., (1988) Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207]), 합토글로빈(문헌[Oliviero et al., (1987) EMBO J., 6, 1905-1912]), 혈청 아밀로이드 A2, C/EBP 알파, IL-1, IL-6(문헌[Poli and Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 8202-8206]), 보체 C3(문헌[Wilson et al., (1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191]), IL-8, 알파-1 산 글리코단백질(문헌[Prowse and Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8, 42-51]), 알파-1 안티트립신, 리포단백질 리파제(문헌[Zechner et al., Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988]), 안지오텐시노겐(문헌[Ron, et al., (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895]), 피브리노겐, c-jun (TNF-알파, UV 방사선, 레티노산, 및 과산화수소, 포르볼 에스테르에 의해 유도가능), 콜라게나제(포르볼 에스테르 및 레티노산에 의해 유도됨), 메탈로티오네인(중금속 및 글루코코르티코이드 유도성), 스트로멜리신(인터류킨-1, EGF 및 포르볼 에스테르에 의해 유도가능), 알파-2 마크로글로불린 및 알파-1 안티-키모트립신을 포함한다. 기타 프로모터는 예를 들어 SV40, MMTV, 인간 면역결핍 바이러스 (MV), 몰로니 바이러스, ALV, 엡스타인 바 바이러스, 라우스 육종 바이러스 인간 액틴, 미오신, 헤모글로빈 및 크레아틴을 포함한다.

[0323] 상기 프로모터들 중 임의의 프로모터는 단독으로 또는 또 다른 프로모터와 조합으로 원하는 작용에 따라 유용할 수 있을 것으로 예상된다. 프로모터 및 다른 조절 요소는 이들이 원하는 세포 또는 조직에서 기능하도록 선택된다. 추가로, 프로모터의 이 목록은 완전한 또는 제한적인 것으로 해석되어서는 안 되고; 다른 프로모터가 본원에 개시된 프로모터 및 방법과 함께 사용된다.

[0324] **실시예**

[0325] **실시예 1 - P-BCMA-101(A/K/A 항-BCMA CARTYRIN(A08))의 특징규명**

[0326] 본 개시내용의 CARTyrin의 발현을 CARTyrin을 코딩하는 서열의 T 세포 내로의 mRNA 전기천공 후에 평가하였다. CARTyrin-발현 T 세포의 기능성을 종양 세포주에 대한 탈과립화에 의해 측정하였다. 특징규명은 기능과의 상관관계를 추가로 검정한다.

[0327] 도 4는 A08 항-BCMA CARTyrin의 구조를 도시한다.

[0328] 도 5 내지 도 8은 P-BCMA-101(A08 항-BCMA CARTyrin을 코딩함)의 시험관내 및 생체내 특징규명을 입증한다.

[0329] A08 CARTyrin의 시험관내 평가는, 인간 1차 T 세포의 렌티바이러스 형질도입 후 높은 수준의 표면 발현 및 BCMA+ 종양 세포에 대한 강력한 세포독성 기능(예를 들어, 증식)을 입증하였다(도 5a 내지 도 5c 참조). 시험관내에서 이러한 강력한 성능 후에, 생체내에서 기능하는 A08 CARTyrin의 능력을 평가하였다.

[0330] 도 6은 A08 CARTyrin을 사용한 마우스에서의 생체내 연구를 위한 치료 일정을 도시한다. 본 연구의 결과는 P-BCMA-101(A08 CARTyrin을 코딩함)로 처리된 마우스의 100%가 21일까지 생존했음을 나타낸다(도 7 참조). 제21일에 처리된 동물의 이러한 완전한 생존은 (제21일에 이들 동물에서 검출될 수 없는 M-단백질 존재비에 의해 평가된 바와 같이) 0의 종양 부하의 표시를 동반하였다(도 7 참조). 도 8은 대조군 동물뿐만 아니라 P-BCMA-101로 처리된 동물에서의 종양 부하를 추가로 예시하는 일련의 사진을 제공한다. A08 CARTyrin을 발현하는 동물은 대조군에 비해 종양 부하가 감소함을 입증한다.

[0331] **실시예 2 - 인간 범 T-세포에 iC9 안정 스위치를 통합한 PIGGYBAC의 발현 및 기능**

[0332] 4개의 piggyBac 트랜스포존 중 하나를 갖는 Amaxa 4D 뉴클레오펙터를 사용하여 인간 범 T-세포를 뉴클레오펙션하였다. "모의" 조건을 제공받은 변형된 T 세포를 빈 piggyBac 트랜스포존으로 뉴클레오펙션하였다. 변형된 T 세포에게 치료제 단독을 함유하는 piggyBac 트랜스포존(CARTyrin을 인코딩하는 서열) 또는 통합된 iC9 서열 및 치료제(CARTyrin을 인코딩하는 시퀀스)를 함유하는 piggyBac 트랜스포존을 제공하였다.

[0333] 도 8은 리간드 결합 영역, 링커 및 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 iC9 안전 스위치의 개략도를 제공

한다. 구체적으로, iC9 폴리펩티드는 위치 36(F36V)에서 페닐알라닌(F)에 대한 발린(V)의 치환을 포함하는 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 리간드 결합 영역을 함유한다. iC9 폴리펩티드의 FKBP12 폴리펩티드는
GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVE LLKLE (SEQ ID NO: 23)를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 FKBP12 폴리펩티드는
GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGGGGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAG
AAAGTGGACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAAGTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTC
GGCCAGCGGGCCAAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATCATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT
GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG (SEQ ID NO: 24)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 링커 영역은 GGGGS(SEQ ID NO: 25)를 포함하는 아미노산 및 GGAGGAGGAGGATCC(SEQ ID NO: 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 링커 영역을 코딩하는 핵산 서열은
GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILS
HGCQASHLQFPGAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTP
SDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (서열번호 27)를 포함하는 아미노산에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 링커 영역을 코딩하는 핵산 서열은
TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTG
AACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTG
AAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCAC
GGGTGCCAGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCT
TGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGAC
GAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGT
GACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGAACAG
TGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTG
AGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열번호 28)을 포함하는 핵산 서열에 의해서 코딩된다.

[0334] iC9 안전 스위치를 시험하기 위해, 4개의 변형된 T 세포 각각을 0, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM 또는 1000 nM AP1903(AP1903에 대한 유도제)과 함께 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포자멸사를 겪는 세포에 대한 마커로서 형광 인터칼레이터인 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)를 사용하여 유동세포 분석에 의해 생존능을 평가하였다.

[0335] 세포 생존능을 제12일에 평가하였다(도 9 참조). 데이터는 iC9 작제물을 함유하는 세포에서 유도제의 농도가 증가함에 따라 우측 아래 사분면에서 좌측 위 사분면으로 세포 집단의 이동을 나타내지만; 이 효과는 유도제의 농도에 관계없이 세포가 이 두 영역에 고르게 분포되어 있는 iC9 구조(CARTyrin만 제공받는 세포)가 없는 세포에서는 관찰되지 않는다. 추가로, 세포 생존능을 제19일에 평가하였다(도 10 참조). 이 데이터는 도 9에 도시된 것과 동일한 경향을 나타내지만(뉴클레오펙션 후 12일); 좌측 위 사분면으로의 집단 이동은 이 후반 시점(뉴클레오펙션 후 19일)에서 더 두드러진다.

[0336] 집계된 결과의 정량화를 수행하여 도 11에 제공하는데, 이것은 제12일(도 9 및 좌측 그래프) 또는 제19일(도 10 및 우측 그래프)에 각각의 변형된 세포 유형에 대한 iC9 스위치의 유도제(AP1903) 농도의 함수로서 iC9 안전 스위치가 세포 생존율에 미치는 유의한 영향을 도시한다. iC9 안전 스위치의 존재는 제12일까지 대다수의 세포에서 세포자멸사를 유도하고 그 효과는 제19일까지 훨씬 더 극적이다.

[0337] 본 연구의 결과는, AP1903이 연구의 가장 낮은 농도(0.1 nM)에서도 세포자멸사를 유도하기 때문에 iC9 안전 스위치가 유도제(예를 들어, AP1903)와 접촉 시 활성 세포를 제거하는 데 매우 효과적이라는 것을 나타낸다. 추가로, iC9 안전 스위치는 삼시스트론성(tricistronic) 벡터의 일부로 기능적으로 발현될 수 있다.

[0338] **실시예 3: 재발/난치성 다발성 골수종(MM)을 갖는 대상체에서 P-BCMA-101의 안정성을 평가하기 위한 공개, 다기관 1상 연구, 그 다음 반응 및 안전성의 2상 평가(PRIME)**

[0339] *임상시험용 의약품의 명칭:* P-BCMA-101 및 리미듀시드

[0340] TCR ζ 및 4-1BB 신호 도메인에 커플링된 항-B세포 성숙 항원(BCMA) Centyrin(CARTyrin)을 함유하도록 조작된 자가 CAR-T 세포.

[0341] *임상시험용 의약품의 간단한 설명:* P-BCMA-101은 piggyBac™(PB) DNA 변형 시스템으로 불리는 전기천공 기반 비-바이러스(DNA 트랜스포존) 유전자 전달 시스템을 사용하여 유전자 변형된 T 세포로 구성되며, 이는 "잘라내기

및 붙여넣기(cut and paste)" 기전을 통해 플라스미드에서 염색체로 DNA를 효율적으로 이동시킨다. 렌티바이러스 또는 γ-레트로바이러스 형질도입에 비해, PB는 더 안전한 삽입 프로필, 더 높은 수준의 트랜스진 발현, 안정적이고 더 긴 기간의 트랜스진 발현, 고도로 풍부하고 유리한 T 줄기 세포 기억(Tscm) 표현형을 포함하는 이점을 제공한다.

[0342] P-BCMA-101 세포는 대상체로부터 수거되고, 다음 3가지 주요 성분을 함유하도록 변형된 자가 T 세포임: 항-BCMA Centyrin 키메라 항원 수용체(CARTyrin) 유전자, 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 내성 유전자 및 유도성 카스파제 9(iC9)-기반 안전 스위치 유전자.

[0343] CARTyrin 발현 카세트는 CD8a 신호/리더 펩티드, CD8a 힌지/스페이서, CD8a 막관통 도메인, 세포내 4-1BB 신호 도메인 및 T 세포 수용체(TCR) ζ 쇄 신호전달 도메인에 융합된 세포외 BCMA-결합 Centyrin 단백질을 코딩한다(예를 들어, 도 4 참조). 항체-기반 단일 사슬 가변 영역(scFv)으로 이루어진 결합 도메인과 비교할 때, CARTyrin 결합 도메인은 더 작고 더 안정적이며 잠재적으로 면역원성이 덜한 완전 인간 단백질이지만, 특정 인식 및 BCMA-발현 MM 세포의 사멸을 가능하게 하는 유사한 항원 결합 특징을 갖는다. CARTyrin은 또한 T 세포 고갈을 회피하도록 설계된다.

[0344] DHFR 선택 유전자를 전이된 P-BCMA-101 T 세포의 생체외 선택을 위해 제조하는 동안 사용하여 더 균일한 제품을 생산한다.

[0345] "안전 스위치"는 제시된 경우 활성화제, 리미듀시드, 합성 소분자 이량체화 약물의 정맥내 투여에 의해서, P-BCMA-101 세포의 신속한 제거를 허용하도록 설계된 대부분의 CAR-T 세포에서 발견되지 않는 추가적인 안전 특징부이다(섹션 15.3 참조).

[0346] *시험 제품, 용량 및 투여 경로* 1상: 단일 투여 - 단일 용량으로 정맥내 투여되는 P-BCMA-101의 용량 수준. 용량 수준은 연구 설계에 기술된 3+3 증량 설계에서 코호트에 의해 시험될 것이다.

[0347] 1상: 주기 투여 - P-BCMA-101의 다중 용량이 각각 2주의 2주기(코호트 A 및 코호트 C) 또는 3주기(코호트 B)로 정맥내 투여됨. 투여되는 총 용량은 단일 용량 증량 동안 결정된 바와 같이 최대 내약 용량(MTD) 이하에서 시작하는 3+3 설계를 따를 것이다. 코호트 A 및 B 둘 다에 대한 제1 주기에서, 총 용량의 1/3이 투여될 것이다. 코호트 A에서 총 용량의 최대 2/3가 제2 주기에 투여될 것이다. 코호트 B에서 총 용량의 최대 1/3가 총 용량이 제2 및 제3 주기 각각에 투여될 것이다. 코호트 C에서 총 용량의 최대 2/3가 제1 주기에 투여되고, 총 용량의 최대 1/3이 제2 주기에 투여될 것이다.

[0348] 1상: 병용 투여 - P-BCMA-101은 하기 승인된 요법과 조합으로 투여될 것이다: 레날리도마이드(코호트 R: P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 10 내지 25 mg 및 코호트 RP: 성분채집술 전 1주 동안 매일, 그 다음 P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일에 경구로 10 내지 25 mg) 및 리툭시맙(코호트 RIT: P-BCMA-101 주입 12일 및 5일 전, 그 다음 8주마다 375 $mg/m^2$). 투여되는 P-BCMA-101의 용량은 용량 증량 동안 결정된 MTD 이하에서 시작하는 3+3 설계를 따를 것이다.

[0349] 2상: P-BCMA-101을 6 내지 15 x $10^6$개 세포/kg의 총 용량으로 정맥내 투여.

[0350] 리미듀시드는 임상적으로 필요한 경우 0.4 mg/kg으로 정맥내 투여될 수 있다.

[0351] 섹션 15.4의 기준을 충족하는 대상체는 P-BCMA-101의 또 다른 주입을 받을 자격이 있을 수 있다.

[0352] *참조 요법:* 없음

[0353] *1차 목적:* 본 연구의 1차 목적은 다음과 같다:

[0354] 1상 - 용량 제한 독성(DLT)에 기초하여 P-BCMA-101의 안전성 및 최대 내약 용량(MTD)을 결정하기 위해

[0355] 2상 - P-BCMA-101의 안전성 및 효능 평가

[0356] *1차 평가변수*:

[0357] 1상 - MTD를 정의하기 위한 각각의 용량 수준에서 DLT를 갖는 대상체의 수

[0358] 2상 - 이상 반응(AE: adverse event), 검사 및 표준 검사실 연구에 기초한 안전성 및 내약성

[0359] 독립 검토 위원회(IRC: independent review committee)에 의해 평가된 국제 골수종 실무 그룹 기준

(International Myeloma Working Group Criteria)(문헌[Kumar, 2016])에 의한 전체 반응률(ORR) 및 반응 기간(DOR)

[0360] 2차 목적: 본 연구의 2차 목적은 다음을 평가하는 것이다:

[0361] 1상 - P-BCMA-101의 안전성 및 실행 가능성; P-BCMA-101의 항골수종 효과; 2/3상 연구에서 추가 평가를 위한 용량 선택을 안내하는 세포 용량의 효과

[0362] 2상 - 사이토카인 방출 증후군(CRS)의 발생률 및 중증도; 추가 효능 평가변수

[0363] *2차 평가변수:* 다음 2차 평가변수를 평가할 것이다:

[0364] 1상 - P-BCMA-101의 프로토콜 금지 용량을 생성하는 능력; AE, 검사 및 표준 검사실 연구에 기초한 한 안전성 및 내약성; Lee 기준을 사용하여 등급이 매겨진 CRS(문헌[Lee, 2014]); 국제 골수종 실무 그룹(IMWG) 통일 반응 기준(Uniform Response Criteria)에 기초한 효능(문헌[Rajkumar, 2011]; 문헌[Kumar 2016]; 문헌[Cavo, 2017]); 전체 반응률(ORR); 반응까지의 시간(TTR); 반응 기간(DOR); 무진행 생존(PFS); 및 전체 생존(OS).

[0365] 2상 - Lee 기준을 사용하여 등급이 매겨진 CRS(문헌[Lee, 2014]); IL-6 길항제, 코르티코스테로이드 및 리미듀시드 사용; OS, PFS, TTR, 최소 잔존 질환(MRD) 음성률

[0366] *탐색 목표:* 본 연구의 탐색 목표는 다음과 같다:

[0367] 1상 - MM 형질 세포 BCMA 발현, 순환 가용성 BCMA 및 임상 반응 간의 관계 평가

[0368] 1상 및 2상 - P-BCMA-101 세포의 확장 및 기능 지속성을 특징규명함. 추정 CRS 마커와 유효성 또는 안전성 사이의 관계를 평가함; 지시된 경우 P-BCMA-101 관련 이상 반응에 대한 리미듀시드의 효과를 평가함

[0369] *탐색적 평가변수:* 연구 과정 동안 하기 탐색적 평가변수를 평가할 것이다:

[0370] 1상 - 골수에서 BCMA 및/또는 기타 바이오마커; 혈액 중의 가용성 BCMA 및/또는 기타 바이오마커 수준

[0371] 1상 및 2상 - P-BCMA-101 세포(예를 들어, P-BCMA-101 세포의 혈액 및 골수에서 벡터 카피 수/mL); P-BCMA-101 세포 하위세트 조성 및 클론성; CRS 마커: C-반응성 단백질(CRP), 페리틴, IL-6, IL-2, TNF-α 및 인터페론 감마(IFN-γ)

[0372] *대상체 집단 및 수:* 확인된 재발/난치성 MM을 갖는 성인. 최대 대략 120명의 대상체가 1상에 계획되어 있다. 대략 100명의 평가 가능한 대상체가 2상에서 치료될 것이다.

[0373] *연구 설계*

[0374] 연구는 다중 부분, 즉 1상, 공개, 단일 상승 용량(SAD) 단계; 1상, 다중 용량, 주기 투여 단계; 1상, 레날리도마이드 또는 리툭시맙과 병용 투여 단계; 및 재발/난치성 MM을 갖는 성인 대상체에서 2상, 공개, 효능 및 안전성 단계.

[0375] 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포 투여로 예상되는 유형의 급성 응급 사건을 관리하기 위한 자원을 사용하여 종양학 대상체 및 줄기 세포/골수 이식을 관리하는 데 경험이 있는 현장만 본 연구에 참여하도록 선택될 것이다. 안전 위원회는 연구 전반에 걸쳐 데이터를 검토하기 위해 정기적으로 모임을 가질 것이다.

[0376] 프로토콜 항목 기준을 충족하는 대상체는 본 연구에 등록할 자격이 있을 것이다. 대상체가 등록한 후 P-BCMA-101 CARTyrin-T 세포를 생산하기 위해 제조 현장으로 보내질 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 얻기 위해 백혈구 성분채집술을 수행할 것이다. 그런 다음 세포를 임상시험 현장으로 반환하고, 표준 화학요법 기반 컨디셔닝 요법 후 아래에 설명된 대로 대상체에게 투여될 것이다.

[0377] 1상 - 연구의 1상은 공개, 다기관, 단일 상승 용량(SAD), 다중 코호트 연구; 다중 용량 주기 투여 코호트 연구; 및 최대 대략 120명의 성인 대상체를 대상으로 한 병용 투여 연구로 구성된다. 연구의 1상은 용량 증량 코호트의 3+3 설계를 따를 것이며, 여기서 3명의 대상체는 초기에 각각의 코호트에 대해 P-BCMA-101 T 세포를 투여받을 계획이다(표 1). 안전 위원회는 해당 용량 수준에서 관찰된 결과를 추가로 평가하기 위해 코호트에 추가 대상체를 등록하도록 권장할 수 있다. 처음 2개의 코호트 각각에 대해 처음 3명의 대상체의 투여는 시차를 둘 것이다. 3등급-관련 독성, CRS 또는 DLT가 보고되면, 안전 위원회에서 데이터를 검토하고 다음 주제에 대해 진행할지 여부를 결정한다. 안전 위원회는 다음 코호트로의 진행을 결정하기 위해 각각의 코호트가 끝날 때 데이터를 검토할 것이다. 안전 위원회의 재량에 따라 제3 코호트부터 시작하여 각 코호트의 첫 번째 및 두 번째 대상

체의 투여는 시차를 둘 것이다.

[0378] DLT는 P-BCMA-101 세포의 제어할 수 없는 확장을 포함하여 P-BCMA-101과 적어도 관련 가능성이 있는 임의의 국립 암 연구소 - 이상 반응에 대한 공통 용어 기준(NCI CTCAE: National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events) 3이상의 등급으로 정의되며, 다음 예외를 제외하고 마지막 P-BCMA-101 주입 후 처음 28일 이내에 발병하는 기저 질환 또는 림프구제거 화학요법에 기인하지 않음:

[0379] 마지막 P-BCMA-101 세포 주입 후 28일 이내에 해소되는 호중구감소성 열을 동반하거나 동반하지 않는 3등급 또는 4등급 호중구감소증

[0380] 3등급 발열

[0381] 마지막 P-BCMA-101 세포 주입 후 28일 이내에 해결되는 혈소판감소증으로 인한 출혈이 동반되거나 동반되지 않은 3등급 또는 4등급 혈소판감소증

[0382] 3등급 또는 4등급 빈혈 및 림프구감소증

[0383] 3등급 또는 4등급 저감마글로불린혈증

[0384] 탈모증

[0385] 24시간 이내에 치료에 반응하는 3등급 또는 4등급 구역, 구토 또는 설사

[0386] 표준 항히스타민 기반 요법으로 세포 투여 6시간 이내에 2등급 이하로 가역적인 세포 주입(세포 주입과 관련됨) 2시간 이내에 발생하는 즉각적인 과민 반응(발열, 발진, 기관지경련)

[0387] 28일 이내에 2등급 미만으로 회복되는 3등급 뇌병증

[0388] 14일 이내에 해결되는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])에 따른 3등급 CRS

[0389] 14일 이내에 2등급 이하로 회복되는 3등급 비혈액학적 검사실 이상

[0390] 7일 이내에 2등급 이하로 회복되는 4등급 비혈액학적 검사실 이상

**표 1: 용량 증량 가이드라인**

[0391]

| ***결과:*** **(# DLT 를 갖는 대상체)** | ***행동:*** |
|---|---|
| 3 명의 대상체 중 0 명 | 3 명의 대상체의 다음 코호트에 대해 용량을 증량함 |
| 3 명의 대상체 중 1 명 | 동일한 용량의 다음 3 명의 대상체 치료 |
| 3 명의 대상체 중 2 명 이상 | 용량 증량 중단; MTD 를 결정하기 위해서 적어도 6 명의 대상체를 치료함 [1] |
| 6 명의 대상체 중 1 명 | 3 명의 대상체의 다음 코호트에 대해 용량을 증량함 |
| 6 명의 대상체 중 2 명 이상 | 용량 증량 중단; MTD 를 결정하기 위해서 적어도 6 명의 대상체를 치료함 [1] |

[0392] 1. MTD - 치료 대상체 6명 중 1명 이하가 DLT를 나타내는 최고 용량

[0393] 3 + 3 용량 증량은 결과를 결정하기 위해 각각의 코호트의 끝에서 데이터를 검토하는 안전 위원회와 함께 다음과 같이 수행된다. 코호트 1부터 시작하여 코호트에서 적어도 3명의 대상체에게 투여될 것이다. 마지막 투여 후 28일까지 DLT가 처음 3명의 대상체에서 관찰되지 않는 경우, 증량이 다음 코호트로 진행될 수 있다. 처음 3명의 대상체 중 1명에서 DLT가 관찰되면 적어도 3명의 추가 대상체가 이 용량 수준으로 치료될 것이다. 더 이상 DLT가 관찰되지 않으면 증량이 진행될 수 있다. 3명 또는 6명의 대상체 중 2명 이상에서 DLT가 관찰되는 경우, MTD는 다음 더 낮은 용량 수준으로 간주되고 더 낮은 용량 수준에서 추가 등록이 이루어지거나 안전 위원회의 재량에 따라 중간 용량 수준에서 시험될 수 있다. 2명 이상의 대상체가 코호트 1에서 DLT를 경험하는 경우, 안전 위원회는 이용 가능한 데이터를 검토한 후 동일한 3 + 3 확장 규칙으로 코호트 -1에서 3명의 대상체를 투여하도록 선택할 수 있다. 2명 이상의 대상체가 코호트 -1에서 DLT를 경험하는 경우, 안전 위원회는 유해 대 유익을 평가하기 위해서 안전성 및 효능 데이터를 고려하여 동일한 3 + 3 확장 규칙으로 더 낮은 용량으로 3명의 대상체에게 투여하도록 선택할 수 있거나 연구를 중단할 수 있다.

[0394] 제안된 용량(P-BCMA-101 세포/kg/용량)은 다음을 포함한다:

[0395] 코호트 -1: $0.25 \times 10^6$

[0396] 코호트 1: 0.75 × $10^6$

[0397] 코호트 2: 2 × $10^6$

[0398] 코호트 3: 6 × $10^6$

[0399] 코호트 4: 10 × $10^6$

[0400] 코호트 5: 15 × $10^6$

[0401] 용량이 MTD를 초과하지 않는 한, P-BCMA-101의 효과를 추가로 평가하기 위해 해당 코호트로부터의 안전성 및 효능 데이터에 기초하여 안전 위원회의 지시에 따라 코호트에서 추가 대상체에게 투여될 수 있다. 코호트 5가 전체 MTD를 마치지 않고 완료되면, 안전 위원회는 5 내지 10 × $10^6$개의 P-BCMA-101 세포/kg 증분으로 추가 증량 코호트를 평가하도록 선택할 수 있다.

[0402] *1상 - 주기 투여:* 연구의 1상 주기 용량 투여 부분에서, P-BCMA-101의 다중 용량을 각각 2주의 2주기(코호트 A 및 코호트 C) 또는 3주기(코호트 B)로 정맥내 투여할 것이다. 투여되는 총 용량은 단일 용량 증량 동안 결정된 바와 같이 MTD 이하에서 시작하는 3+3 설계를 따를 것이다. 코호트 A 및 B 둘 다에 대한 제1 주기에서, 총 용량의 1/3이 투여될 것이다. 코호트 A에서 총 용량의 최대 2/3가 제2 주기에 투여될 것이다. 코호트 B에서 총 용량의 최대 1/3가 총 용량이 제2 및 제3 주기 각각에 투여될 것이다. 코호트 C에서 총 용량의 최대 2/3가 제1 주기에 투여되고, 총 용량의 최대 1/3이 제2 주기에 투여될 것이다. 단일 투여에 대해서 기재된 동일한 3+3 용량 증량 및/또는 감소 규칙이 섹션 15.5에 상세하게 기재된 이들 절차에서 사용될 것이다.

[0403] *1상 - 병용 투여* 병용 투여에서, P-BCMA-101이 승인된 요법인 레날리도마이드(코호트 R 및 코호트 RP) 및 리툭시맙(코호트 RIT)과 조합으로 투여될 것이다. 투여되는 P-BCMA-101의 용량은 용량 증량 동안 결정된 :5 MTD에서 시작하는 3+3 설계를 따를 것이다. 단일 투여에 대해서 기재된 동일한 3+3 용량 증량 및/또는 감소 규칙을 사용할 것이다. 이러한 절차는 섹션 15.6에 상세하게 기재되어 있다.

[0404] *2상* - 연구의 2상은 재발 및/또는 난치성 MM을 갖는 대략 100명의 성인 대상체에 대한 공개, 다기관 연구이다. 대상체는 6 내지 15 × $10^6$개 세포/kg의 총 용량을 제공받을 것이다(1상에서 결정된 일정에 따라).

[0405] *연구 방문* - 1상 및 2상에서 치료된 대상체는 안전성, 내약성 및 반응(골수종 병기)의 일련의 측정이 진행될 것이다. 이러한 측정치는 스크리닝, 등록 또는 기준선 방문 및 컨디셔닝 화학요법 기간에 얻을 것이다. 1상 및 2상 모두에서 P-BCMA-101 투여 기간 및 10일, 2, 3, 4, 6, 8주, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개월, 그 후 P-BCMA-101 투여 후 최대 24개월 동안 3개월마다 후속 방문. 이 프로토콜을 완료하거나 철회한 후, P-BCMA-101을 제공받은 사전동의 대상체는 장기 안전성을 평가하기 위해 마지막 투여 후 총 15년 동안 지속적인 추적관찰을 허용하는 별도의 프로토콜에 등록해야 한다.

[0406] *스크리닝 방문* - 사전동의 대상체는 적격성을 결정하기 위해 스크리닝 방문을 수행할 것이다. 모든 포함 기준을 충족하고 제외 기준 중 어느 것도 충족하지 않는 대상체는 등록 및 백혈구성분채집술 방문을 위해 다시 방문할 것이다.

[0407] *등록 방문* - 적격 대상체는 백혈구 성분채집술 전에 수집해야 하는 샘플 및 측정을 제공하기 위해 등록 방문을 위해 다시 방문할 것이다. 등록 평가는 백혈구 성분채집술의 14일 전(± 3일)에 수행하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다.

[0408] *백혈구 성분채집술 방문* - 등록한 적격 대상체는 P-BCMA-101 제조를 위한 PBMC를 얻기 위해 복귀하여 백혈구 성분채집술을 받을 것이다. 이 방문은 스크리닝 방문 후 약 28일 이내에 이루어져야 한다. 일단 의약품이 제조되면 대상체는 병용 요법(해당되는 경우), 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 세포 투여 기간을 위해 백혈구 성분채집술 방문 후 대략 4주 후에 다시 방문할 것이다. 공급 기준을 충족하는 P-BCMA-101 세포를 백혈구 성분채집술 샘플에서 제조할 수 없는 경우 두 번째 백혈구 성분채집술 및 제조를 시도할 수 있다. 두 번째 시도도 실패하면 대상체는 연구에서 제외되고 연구 치료를 받지 않은 것으로 간주된다.

[0409] 백혈구 성분채집술 방문 후 및 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 세포 투여 기간 이전에 급속한 질환 진행을 경험한 대상체는 연구자의 재량에 따라 구제 요법을 투여받을 수 있다. 구제 요법은 필요한 경우가 아니면 사용되어서는 안 되며 연구자의 재량에 따라 대상체의 임상 병력(이전에 사용된 약제가 선호되고 의료 모니터의 승인

이 필요함)에 의해 결정된다. 대상체가 구제 요법을 받는 경우, 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 세포 투여 기간은 구제 요법의 마지막 치료일로부터 적어도 2주 또는 5 반감기로 예정되어야 하며, 대상체는 항목 기준(측정 가능한 MM 포함) 및 병용 의약에 관한 섹션 4 및 6에 기재된 기준을 충족해야 한다. 구제 요법에 대한 대상체의 반응은 대상체가 임상시험용 의약품을 제공받을 자격이 있는지 여부를 결정하기 위해 연구자 및 의료 모니터에 의해 평가될 것이다.

[0410] 대상체는 연구 기간 전체에서 일시적인 처방 목적을 위해서 방사선 요법 또는 혈장분리교환술 및 교환을 제공받는 것이 허용될 것이다.

[0411] *기준선 방문(-12일 - -6일)* - 일단 의약품이 제조되면, 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 주 동안, 대상체는 기준선 평가를 위해 다시 방문하여 계속 적격성이 확인될 것이다. 다음 평가는 -제5일 전 72시간 이내에 반복해야 함: 간이 정신 상태 검사(MMSE: Mini Mental Status Exam), 신체 검사, 활력 징후, 전해질 및 마그네슘을 포함한 화학 패널, B 및 T 세포 수를 포함한 혈액학, 응고, 순환 골수종 평가 /형질 세포 및 임신 검사(해당되는 경우). 기준선 골수종 반응 평가는 컨디셔닝 화학요법 및 병용 요법을 시작한 후 7일 이내에 수행되어야 한다. 골수 및 종양의 기준선 신선한 샘플은 적격성을 확인하는 데 사용되지 않으며 7일의 윈도우(window)는 대상체와 연구자에게 유연성을 제공하기 위한 것이며; 새로운 골수 생검/흡인이 수행되고 스크리닝 중에 제공된 경우 이것은 기준선 방문 동안 반복할 필요가 없다.

[0412] *컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 세포 투여 기간* - P-BCMA-101 세포 주입을 투여하기 전에, 대상체는 사이클로포스파마이드 300 mg/$m^2$ 및 플루다라빈 30 mg/$m^2$의 컨디셔닝 림프구제거 화학요법 치료요법을 제공받을 것인데, 각각의 화학요법제는 연속 3일 동안(-5일부터 -3일까지) 매일 정맥내로 제공된다. 대상체는 컨디셔닝 화학요법을 시작할 때 등록 기준을 계속 충족하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 코호트 R, 코호트 RP 및 코호트 RIT의 대상체의 경우, 병용 요법은 해당 날짜에 화학요법을 컨디셔닝하기 전에 투여되어야 한다.

[0413] 림프구제거 화학요법 치료요법 후 2일 휴식 후, 대상체는 대략 5 내지 20분(0일)에 걸쳐 정맥내 투여되는 P-BCMA-101을 투여받을 것이다(대상체는 아세트아미노펜 및 디펜하이드라민이 사전 투여되어야 함). CAR-T 요법으로 수행된 이전 연구에서는 임상시험용 의약품 투여 후 3 내지 7일 이내에 최대 독성이 발생하는 것을 관찰하였다. 연구 대상체는 주입 도중 및 주입 후와 주입 후 대략 7일 동안 면밀히 모니터링될 것이다. 이 관찰 기간에는 모든 대상체에 대한 CRS와 같은 P-BCMA-101 세포 관련 독성의 출현을 포함하여 AE의 일련의 평가가 포함될 것이다. CRS는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다. AE의 등급 및 관리에 관한 지침은 이 프로토콜의 섹션 8 및 연구 참조 매뉴얼에서 찾을 수 있다. 유의한 P-BCMA-101 관련 독성에 대한 리미듀시드 사용에 대한 지침은 섹션 15.3 및 연구 참조 매뉴얼에서 찾을 수 있다.

[0414] 연구자가 개별 환자의 위험에 기초하여 적절하다고 판단하는 경우 대상체는 P-BCMA-101 투여를 위해 병원에 입원할 수 있다. 입원은 필요하지 않지만, 대상체는 P-BCMA-101의 마지막 투여 후 대략 14일 동안 병원에서 50마일 이내에 머물러야 하며, CRS 증상 또는 발열과 같은 신경독성의 경우 입원 여부를 평가해야 한다. 입원하는 경우, 대상체는 연구자에 의해 안정적인 것으로 평가될 때까지 퇴원하지 않을 것이다. 대상체는 림프구제거 화학요법 동안 또는 연구자가 적절하다고 판단하는 경우 상기 기준이 충족된 후 P-BCMA-101 투여 전에 입원 환자로 유지될 수 있다.

[0415] 추적관찰 방문: 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 12개월, 15개월, 18개월, 21개월 및 24개월. P-BCMA-101의 마지막 투여 후 정기적인 추적관찰을 위해서 환자는 다시 방문하고, 사건 일정에 명시된 대로 안전성, 내약성 및 항골수종 반응에 대한 일련의 평가를 받을 것이다.

[0416] *반복 투여:* 대상체의 질환이 진행될 때 제조로부터 충분한 P-BCMA-101 세포가 남아 있는 경우, 안전 위원회 승인으로 추가 세포를 용량-제한 독성 평가를 성공적으로 완료한 최고 용량 수준까지 투여할 수 있다. 추가 P-BCMA-101 T 세포 주입을 제공받기 위해, 대상체에게 새로운 대상체 식별 번호를 지정하고, 그들은 초기 투여에 대해 설명된 모든 적격성 기준을 충족해야 하며, 백혈구 성분채집술을 제외한 동일한 스크리닝, 등록, 컨디셔닝 화학요법 및 추적관찰 절차가 수행될 것이다. 재처리 절차는 섹션 15.4절에 설명되어 있다.

[0417] *안전성 모니터링:* 연구자 및 의뢰자의 임상 대표자로 구성된 안전 위원회가 설립되고, 모든 대상체 및 각각의 코호트에 대한 데이터를 정기적으로 검토하여 용량 증량 및 등록을 결정할 것이다.

[0418] *포함 기준:*

[0419] 1. 서면 대상자 동의서에 서명해야 함;

[0420] 2. 18세 이상의 남성 또는 여성;

[0421] 3. 초기 진단 시 IMWG 기준에 정의된 활동성 MM 진단이 확인되어야 함(문헌[Rajkumar, 2014]);

[0422] 4. 다음 기준 중 적어도 하나에 의해 정의된 측정 가능한 MM을 가져야 함:

[0423] 1상:

[0424] 0.5 g/dL(5 g/L) 이상의 혈청 M-단백질;

[0425] 200 mg/24h 이상의 소변 M-단백질;

[0426] 혈청 유리 경쇄(FLC) 검정: 혈청 FLC 비율이 비정상인 경우 10 mg/dL(100 mg/L) 이상의 관련된 FLC 수준;

[0427] 총 골수 세포의 30% 초과의 골수 형질 세포 또는 기타 측정 가능한 골 질환(예를 들어, PET 또는 CT로 측정 가능한 형질세포종)(의료 모니터 승인 필요)

[0428] 2상:

[0429] 1.0 g/dL(10 g/L) 이상의 혈청 M-단백질;

[0430] 200 mg/24h 이상의 소변 M-단백질;

[0431] 혈청 FLC 검정: 혈청 FLC 비율이 비정상인 경우 10 mg/dL(100 mg/L) 이상의 관련된 FLC 수준;

[0432] 5. 하기에 의해서 정의된 재발/난치성 MM을 가져야 함:

[0433] 1상:

[0434] 프로테아좀 저해제 및 면역조절제(IMiD)를 함유해야 하는 적어도 3회의 사전 요법 라인을 제공받음; 또는

[0435] 이들 작용제로의 치료 60일에 또는 60일 이내에 진행하는 것으로 정의된 프로테아좀 저해제 및 IMiD에 대해 "이중 난치성"인 경우 적어도 2회의 사전 요법 라인을 제공받음.

[0436] 2상:

[0437] 삼중 조합물의 형태의 적어도 2회의 사전 라인으로 프로테아좀 저해제, IMiD 및 CD38 표적화 요법을 함유해야 하는 적어도 3회의 사전 요법을 받았고, PD가 가장 양호한 반응이 아닌 한 각각의 라인의 2주기 이상을 겪음; 그리고

[0438] 가장 최근의 요법 라인에 난치성임; 그리고

[0439] ASCT를 받았거나 ASCT 후보가 아님.

[0440] 참고: 유도 요법, 자가 줄기 세포 이식(ASCT) 및 유지 요법은 중간 진행 없이 순차적으로 제공되는 경우 단일 라인으로 간주되어야 함.

[0441] 6. 스크리닝 시점부터 연구 전체에 걸쳐서 피임을 수행할 의향이 있어야 함(가임 여성 및 남성 모두).

[0442] 코호트 R, RP 또는 RIT의 여성은 치료를 시작하기 4주 전, 치료 중, 용량 중단 중에 그리고 레날리도마이드 중단 후 4주 동안 그리고 리툭시맙의 마지막 투여 후 12개월 동안 지속적으로 성교를 중단하거나 두 가지 신뢰할 수 있는 피임 방법을 사용하기로 약속해야 함.

[0443] 코호트 R 또는 RP의 남성은 성공적인 정관절제술을 받았더라도 레날리도마이드를 복용하는 동안 그리고 레날리도마이드 중단 후 최대 4주 동안 가임 여성과 성적 접촉을 하는 동안 항상 라텍스 또는 합성 콘돔을 사용해야 함. 레날리도마이드를 복용 중인 남성 환자는 정자를 기증해서는 안됨.

[0444] 7. 스크리닝 시에 혈청 임신 검사가 음성이고, 림프구제거 화학요법 치료요법을 시작하기 전 3일 이내에 소변 검사가 음성이어야 함(가임 여성).

[0445] 코호트 R 및 RP의 여성 대상체는 레날리도마이드를 시작하기 전에 2번의 임신 검사 결과가 음성이어야 함. 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 첫 번째 검사는 10 내지 14일 이내에, 두 번째 검사는 대상체가 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 24시간 이내에 수행해야 하며, 첫 번째 달에는 매주, 그 후 월경 주기가 규칙적인 여성의 경우 매월 또는 월경이 불규칙한 여성의 경우 2주마다 수행되어야 함.

[0446] 8. 자가 줄기 세포 이식을 수행한 경우 적어도 90일이 경과해야 함.

[0447] 9. 다음과 같이 정의된 적절한 중요한 장기 기능을 가져야 함(또는 의료 모니터 승인):

[0448] 2.0 mg/dL 미만의 혈청 크레아티닌 및 30 mL/분 초과의 추정 크레아티닌 청소율(Cockcroft-Gault 공식을 사용하여 계산하고 투석에 의존하지 않음).

[0449] 1000개/μL 초과의 절대 호중구 수치 및 50,000개/μL 초과의 혈소판 수치(골수 형질 세포가 세포질의 50% 초과인 경우 30,000개/μL 초과).

[0450] 투여량 코호트에 기초한 표적 세포 용량을 얻기 위해 추정된 적절한 절대 CD3 수치(2상: 300개/μL 초과의 절대 림프구 수치)

[0451] 8 g/dL 초과의 헤모글로빈(수혈 및/또는 성장 인자 지원이 허용됨).

[0452] 혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제(SGOT) < 3 × 정상 및 총 빌리루빈의 상한 < 2.0 mg/dL(분자적으로 문서화된 길버트 증후군 병력이 없는 경우).

[0453] 45% 초과의 좌심실 박출률(LVEF). LVEF 평가는 등록 후 4주 이내에 수행되어야 함.

[0454] 10. NCI CTCAE 버전 4.03 기준 또는 대상체의 이전 기준선에 따라 2등급 미만의 등급으로, 말초 신경병증을 제외하고 사전 요법으로 인한 독성에서 회복되어야 함.

[0455] 11. 0 내지 1의 동부 협력 종양 학회(ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태.

[0456] *제외 기준:*1. 임신 또는 수유 중임; 2. 부적절한 정맥 접근 및/또는 백혈구 성분채집술에 대한 금기 사항이 있음; 3. 활동성 용혈성 빈혈, 형질 세포 백혈병, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, POEMS 증후군(다발신경병증, 기관비대, 내분비병증, 단클론성 단백질 및 피부 변화), 파종성 혈관내 응고, 백혈구 정체 또는 아밀로이드증이 있음; 4. 비전이성 기저 세포 또는 편평 세포 피부 암종과 같은 저위험 신생물을 제외하고 MM 외에 활동성 2차 악성 종양(적어도 5년 동안 무질환이 아님)을 가짐; 5. 건선, 다발성 경화증, 루푸스, 류마티스 관절염 등과 같은 활동성 자가면역 질환이 있음(의료 모니터가 질환이 활동성 및 자가면역성인지 판단할 것임); 6. 뇌졸중, 간질 등과 같은 중대한 중추신경계(CNS) 질환의 병력이 있음(중대한 경우 의료 모니터가 결정함);7. 활동성 전신 감염이 있는 있음(예를 들어, 발열을 유발하거나 항균 치료가 필요한 경우); 8. B형 또는 C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 인간 T-림프친화성 바이러스(HTLV) 감염 또는 면역결핍 증후군이 있음; 9. 뉴욕 심장 협회(NYHA: New York Heart Association) 클래스 III 또는 IV 심부전, 불안정 협심증, 또는 심근 경색 또는 심각한 부정맥(예를 들어, 심방 세동, 지속적인 [30초 초과] 심실 빈맥 등)의 병력; 10. 연구자 또는 의료 모니터의 의견에 따라, 프로토콜(적절한 백혈구 성분채집술, 컨디셔닝 화학요법 및/또는 CAR-T 세포 투여에 대한 자격이 없거나 이것이 불가능한 상당한 가능성을 나타내는 의학적 병태 또는 검사실 소견 포함)에 대한 안전한 참여 및/또는 준수를 방해할 임의의 정신 또는 의학적 장애(예를 들어, 심혈관, 내분비, 신장, 위장관, 비뇨생식기, 면역결핍 또는 달리 명시되지 않은 폐 장애)를 가짐; 11. 사전 유전자 요법 또는 유전자-변형 세포 면역요법을 제공받은 적이 있음(또는 의료 모니터의 승인을 받음). 대상체는 항골수종 치료와 관련하여 유전자 변형되지 않은 자가 T 세포 또는 줄기 세포를 제공받았을 수 있음; 12. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 시점으로부터 2주 또는 5 반감기(둘 중 더 긴 기간 또는 의료 모니터 승인을 받음) 이내에 항암 의약을 제공받은 적이 있음; 13. 백혈구 성분채집술 시작 시점으로부터 2주 이내에 면역억제 의약을 제공받은 적이 있고/하거나 연구 중에 이를 필요로 할 것으로 예상된 적이 있음(의료 모니터는 의약이 면역억제제로 간주되는지의 여부를 결정할 것임). 일반적으로, 모든 비필수 의약(보충제, 한약 등 포함)은 인지되지 않은 면역억제 효과의 가능성으로 인해 P-BCMA-101 투여 후 2개월까지 백혈구 성분채집술 2주 전부터 중단되어야 함; 14. 필요한 백혈구 성분채집술 2주 이내 또는 P-BCMA-101 투여의 1주 또는 5 반감기(둘 중 더 짧은 기간) 이내에 5 mg/일 이상의 프레드니손 또는 동등한 용량의 또 다른 코르티코스테로이드의 전신 코르티코스테로이드 요법을 제공받은 적이 있음 또는 연구 과정 중에 이것이 필요할 것으로 예상됨. (국소 및 흡입 스테로이드는 허용됨. 전신 코르티코스테로이드는 연구 특정 지침 이외의 P-BCMA-101 세포를 제공받은 후에는 금기임); 15. 골수종의 CNS 전이 또는 증후성 CNS 침범(연수막 암종증, 두개골 신경병증 또는 종괴 병변 및 척수 압박 포함)이 있음; 16. 본 연구에 사용된 임의의 작용제에 대해 중증의 즉각적인 과민 반응의 병력이 있음; 17. 동종이계 줄기세포 이식 또는 임의의 다른 동종이계 또는 이종발생성(xenogeneic) 이식을 겪은 병력이 있음 또는 90일 이내에 자가 이식을 경험한 적이 있음;18. 예방적 항응고제로 매일 아세틸살리실산(ASA)(325 mg)을 복용할 수 없음. ASA에 과민증이 있는 환자는 와파린 또는 저분자량 헤파린을 사용할 수 있음)(코호트 R 및 RP만); 19. 항응고제와 관계없이 지난 6개월 이내

에 혈전색전성 질환의 병력(코호트 R 및 RP만).

[0457] *연구 기간:* 대상체는 본 연구에서 마지막 투여 후 최대 2년 동안 추적관찰될 것이며, 사전동의한 대상체는 마지막 투여 후 총 15년 추적관찰 동안 장기 안전성 추적관찰 프로토콜에 롤오버된다.

[0458] *사건 일정:* 표 2, 단일 투여 사건 일정 - 컨디셔닝 화학요법을 통한 스크리닝 및 표 3, 사건 일정 - P-BCMA-101 투여 및 추적관찰 참조. P-BCMA-101로의 대상체의 재치료를 위한 사건 일정은 표 8 및 표 9에 기재되어 있다(섹션 15.4 참조). 리미듀시드 치료에 대해서는 표 7의 사건 일정을 참조하기 바란다. 주기 투여 코호트의 대상체에 대한 사건 일정은 표 10, 표 11, 표 12 및 표 13에 기재되어 있다(섹션 15.5 참조). 병용 투여 코호트의 대상체에 대한 사건 일정은 표 14 및 표 15에 기재되어 있다(섹션 15.6 참조).

[0459] 투여 일시 중지 또는 연구 중단 기준: 연구-정의된 DLT 또는 임의의 치료 관련 사망이 발생하는 경우, 안전 위원회가 만나 사건(들)을 검토하고 향후 계획을 결정할 때까지 새로운 대상체의 투여를 일시 중지하며, 향후 계획은 연구 중단, 후속 용량 수준 감소, 추가 안전 절차 또는 연구 수정안 도입, 계획된 연구 지속 또는 사건에 적절한 다른 조치를 포함할 수 있다. 상기에 기재된 바와 같이, 1상 동안 코호트에서 2명 이상의 대상체가 DLT를 갖고, 4등급 이상의 발생률이 10% 이상이거나 3등급 이상의 CRS의 발생률이 30% 이상이거나 10명 초과의 환자가 치료되는 2상에서 상응하는 용량 수준 이하에서 신경독성을 갖는 경우, 그 용량 수준은 MTD를 초과하고 더 낮은 용량 수준에서 임의의 추가 투여가 수행될 것이다.

[0460] *통계학적 방법론:* 적절한 기술 통계를 사용하여 인구통계학적 및 기준선 특징, 안전성 및 효능 데이터를 요약할 것이다. 데이터 분석은 용량 코호트뿐만 아니라 적절한 경우 조합된 모든 대상체에 대해 제공될 것이다. 연속 변수에 대해 평균, 중앙값, 표준 편차 및 범위를 포함한 기술 통계가 계산될 것이고, 범주 데이터가 개수치 및 백분율을 사용하여 요약될 것이다. 반응률 평가변수의 경우, 점 추정치 및 양측 정확한 이항 95% 신뢰 구간이 계산될 것이다. 사건까지의 시간 변수는 Kaplan-Meier 방법을 사용하여 요약될 것이다.

[0461] 코호트에 의한 대상체의 개수치 및 백분율을 사용하여 치료-응급 AE(TEAE)를 요약할 것이고, 모든 대상체에 대해서 조합할 것이다. TEAE는 또한 중증도 및 관계별로 요약될 것이다. 병용 의약은 용량 코호트에 의한 대상체의 수치 및 백분율을 사용하여 요약될 것이다.

[0462] 활력 징후, 심전도(ECG) 측정 및 검사실 결과는 코호트에 의해 관찰된 값 및 기준선 값으로부터의 변화에 대한 기술 통계를 사용하여 요약될 것이다. 검사실 결과는 또한 코호트별로 정상 범위(미만, 이내 또는 초과)와 관련하여 요약될 것이다.

[0463] 연구의 1상 부분은 DLT 발생률이 33% 미만인 용량을 결정하기 위해서 의도된 용량 코호트의 표준 3+3 설계이다. 따라서, DLT 평가 기간이 완료되기 전에 중단한 대상체를 대체하기 위해 또는 코호트에서 소견을 추가로 평가하기 위해서 등록될 수 있는 대상체뿐만 아니라 용량 증량, 주기 투여 및 병용 투여 동안 6명의 대상체의 18개 코호트 가능성을 포함하도록 최대 120명의 대상체가 등록될 수 있다.

[0464] 연구 반응률 종점의 2상 부분에 대해, $p<0.05$에서 최근 승인된 치료 표준 작용제인 다라투무맙으로 얻어진 바와 같이 30% 이하의 반응률을 배제하기 위해 반응률 평가변수를 시험할 것이다. 사건까지의 시간 변수는 Kaplan-Meier 방법을 사용하여 요약될 것이다. 100명의 대상체 샘플을 사용하여, 시험의 2상 부분은 30% 반응률보다 15% 포인트 개선을 검출할 수 있는 90%의 검정력을 가질 것이다. 이 검정력 계산은 단측 유의 수준이 0.05인 이항 비율에 대한 정확 검정에 기초한다. 35명의 대상체가 등록하고 P-BCMA-101을 제공받고 4개월 동안 추적관찰되거나 4개월 추적관찰 전에 진행되면 무용성(futility) 분석을 수행할 것이다. 이 분석 세트를 무용성 분석 세트(FAS: Futility Analysis Set)라고 불린다. 무용성 분석은 FAS에서 관찰된 BOR의 비율에 기초하여 1- 조건 검정력(CP)과 동일한 무용성 지수(FI)를 사용할 것이다. FI가 0.80를 초과하는 경우(즉, CP가 0.20 미만인 경우) 연구를 중단할 수 있다.

[0465] P-BCMA-101의 추가 주입을 제공받는 대상체는 또한 추후 모든 결과에 대해 별도의 하위군으로 분석될 것이다.

[0466]

1. **표 2:** 사건 일정 - 컨디셔닝 화학요법을 동반한 스크리닝(단일 투여)

| 절차 | 스크리닝(백혈구 성분채집술 전 28 일 이내) | 등록 [12] (백혈구 성분채집술의 2 주 ± 3 일 전) | 백혈구 성분채집술 [1, 3] | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 7 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 72 시간 이내) | 컨디셔닝 화학요법 [11] 일수 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 대상자 동의 | X | | | | | | | | | |
| 포함/제외 기준 | X | | | | | X | | | | |
| 병력 및 질환 평가 [1] | X | | | | | | | | | |
| ECOG 성능 상태 | X | | | | | X | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | | | | X | X | | | | |
| 신장 및 체중 [2] | X | X[12] | X | | | | | | | |
| 12-리드 ECG[3] | X | | | | | | | | | |
| 심장초음파 | X | | | | | | | | | |
| 중앙 연구소 보관 종양 | X | | | | | | | | | |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [4, 14] | X[4] | | | X[4] | | | | | | |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [4, 14] | X[4] | | | X[4] | | | | | | |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | | | | X | X | | | | |
| 활력 징후(BP, HR, RR, $O^2$ 포화, 온도) | X | | | | X | X | X | X | | |
| 임신 검사(혈청 또는 소변)[5] | X | | | | X | | | | | |
| HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝을 위한 혈액 샘플 [14] | X | | | | | | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [6] | X | X | | | X | | X | X | | |
| 순환 골수종/형질 세포 [6] | X | X | | | X | | | | | |
| 백혈구 성분채집술 | | | X[13] | | | | | | | |

[0467]

| 절차 | 스크리닝(백혈구 성분채집술 전 28 일 이내) | 등록 [12] (백혈구 성분채집술의 2 주 ± 3 일 전) | 백혈구 성분채집술 [1] [3] | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 7 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 72 시간 이내) | 컨디셔닝 화학요법 [11] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 일수 | | | | |
| | | | | | | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 플루다라빈/사이클로포스파마이드 | | | | | | X | X | X | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [7, 14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)[8]: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [8, 14] | | X[12] | | | | | | | | |
| PET/CT[4, 9] | | | | X[4, 9] | | | | | | |
| 이상 반응 | | X | X | X | X | X | X | X | | |
| 병용 의약 [10] | X[10] | X[12] | X | X | X | X | X | X | | |

1. 필요한 스크리닝 전 6 개월 동안의 MM 측정 결과 포함(가능한 경우, 혈청 단백질 전기영동[SPEP], 뇨단백질 전기영동[UPEP], 혈청면역고정[SIFE], 뇨면역고정[UIFE], 혈청 유리 경쇄[FLC], 최소 잔존 질환[MRD] 및 임상적으로 지시된 바와 같은, PET/CT 및/또는 골수/종양 생검/흡인물[골수 생검]).
2. 스크리닝 방문 시에서만 얻은 신장
3. 스크리닝 시에서 얻은 12-리드 ECG 및 심장초음파.
4. 골수종 반응은 스크리닝(마지막 달 내의 임의의 결과로부터 얻을 수 있음), 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선(참고: 구제 요법을 비롯한 마지막 골수종 요법 완료와 림프구갈 화학요법의 개시 사이에 2 회 이상의 평가를 수행해야 함), 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함)에 대해서 그리고 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라 임상적으로 지시되고 SPEP, UPEP, SIFE, UIFE 및 혈청 FLC 를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 MRD(중앙 검사실에서 분석)는 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 수행한 다음, 임상적으로 지시된 바와 같이 수행하거나 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. 새로운 골수 생검/흡인이 수행되고 스크리닝 중에 제공된 경우 이것은, 기준선 방문 동안 반복할 필요가 없다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.
5. 가임 여성은 스크리닝 시 혈청 임신 검사를 받고 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 72 시간(3 일) 이내에 소변 임신 검사를 받는다.



공개특허 10-2023-0011295

[0468]

6. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다.
   혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치(CBC)
   - 혈소판
   - -3 일, -4 일을 제외한 모든 시점에서 B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
   - P-BCMA-101 투여 전 시점에서 순환 골수종/혈장 세포의 평가(예를 들어, 유세포 분석법 또는 수동 감별법을 사용한 CBC)가 필요하다. 등록 및 기준선 샘플에서 순환 골수종/혈장 세포가 식별되는 경우 의뢰자에게 연락하고 제외 기준 #3 및 #10 을 참조한다.
7. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
8. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
9. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 얻어진 PET/CT.
10. 스크리닝 전 30 일 동안 대상체가 복용한 알레르기 및 모든 처방 및 비처방 의약, 비타민, 약초 및 영양 보조제를 스크리닝 방문 시 기록할 것이다. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다. 불필요한 의약/보충제는 가능한 경우 연구자의 판단에 따라 스크리닝 전에 중단해야 한다.
11. 대상체는 컨디셔닝 화학요법을 시작할 때 등록 기준을 계속 충족하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 다음 평가는 항목 기준을 재평가하기 위해 -5 일의 72 시간 이내에 반복되어야 한다: MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함); 신체검사; 활력 징후; 임신; 및 화학 패널, B 및 T 세포 수치를 포함한 혈액학, 응고.
12. 등록 평가는 백혈구 성분채집술의 14 일 전(± 3 일)에 수행하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다.
13. 백혈구 성분채집술은 스크리닝 후 약 28 일 이내에 실시하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 백혈구 성분채집술을 수행하기 위한 지침은 섹션 5.1 및 연구 참조 매뉴얼에서 찾아볼 수 있다(특히 수동 감별법을 사용한 CBC 로의 중간 및 최종 수치, 혈소판, B 및 T 세포(CD4 및 8), 골수종 세포, 유세포 분석법의 특징규명, 기계 성능은 성분채집술 동안 조사 현장 성분채집술 센터에서 수행되며 P-BCMA-101 세포의 분석, 특징규명 및 제조를 위해 성분채집술 센터에서 다른 위치로 성분채집술 제품을 배송하기 전에 보고됨).
14. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.



공개특허 10-2023-0011295

[0469]

2. 표 3: 사건 일정 - P-BCMA-101 투여 및 추적관찰(단일 투여)

| 절차 | P-BCMA-101 투여 [8] | | | | | 제 0 일과 비교한 치료 후 추적관찰 방문(방문 허용기간)[8] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 일수 | | | | | 2 및 3 주 (± 2 일) | 4 주 (± 7 일) | 6 및 8 주 (± 7 일) | 3 개월 (±2 주) | q3 개월 (± 2 주) 내지 24 개월 |
| | 0[7] | 1 | 4 | 7 | 10[9] | | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| 12-리드 ECG[1] | X | X | X | X | | | X | | X | X |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [2, 11] | X2 | | | | | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [2, 11] | | | | | | | X | | X | Mo 6, 12 |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | X | X | X | X | X |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 활력 징후(BP, HR, RR, $O^2$ 포화, 온도) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 임신 검사(소변)[3] | | | | | | X | X | X | X | X |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [4] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| P-BCMA-101 세포 주입 (IV) | X | | | | | | | | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [5, 11] | X5 | | X | X | X | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | X | X | X | X |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [11] | | | | | | X | X | | X | X |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)6: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [6, 11] | X | X | X | X | X | X | X | X | Mo 3,4,5 | X |
| PET/CT[12] | | | | | | | | (X[12]) | (X[12]) | (X[12]) |
| 이상 반응 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 병용 의약 [10] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

1. 12-리드 ECG 는 제 0 일, 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 4 주, 제 3 개월 및 그 후 3 개월마다 수행됨.

2. 골수종 반응은 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함), 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주 및 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월, 18 개월, 21 개월 및 24 개월에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위해서 반응을 입증한 평가 후 1 주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라서 그리고 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역 고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC)를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 최소 잔존 질환(MRD)(중앙 검사실에서 분석)은 4 주, 3 개월, 6 개월 및 12 개월에 수행한 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.

3. 가임 여성은 스크리닝 후 모든 제시된 방문 시에 소변 임신 검사를 받을 것이다.

4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 종양 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치
   - 혈소판
   - B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
5. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 에를 들어, 등록 시 백티 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 기준선, 제 0 일(P-BCMA-101 투여 1 시간 후), 제 4 일, 제 7 일, 제 10 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월 및 그 후 3 개월마다. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
6. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
7. 제 0 일에 MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함), 12-리드 ECG, 신체 검사, 화학 패널, 혈액학 및 응고는 P-BCMA-101 투여 전 및 투여 후 대략 1 시간(+/- 15 분)에 얻어질 수 있어야 한다. 활력 징후(체온, 호흡률, 맥박, O2 포화도 및 혈압)는 P-BCMA-101 투여 전후에 그 다음 적어도 1 시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15 분(+/- 5 분)마다 측정될 것이다. 다른 제 0 일 평가 및 샘플은 달리 제시되지 않는 한 P-BCMA-101 투여 전에 얻어야 한다. P-BCMA-101 의 투여 후, 이들 평가(또는 연구자가 임상적으로 제시한 것으로 간주되는 임의의 다른 평가)는 표 3 에 기재된 바와 같이 그리고 관찰된 이상 반응에 의해서 또는 기관 표준에 의해서 임상적으로 지시된 만큼 자주 수행될 것이다.
8. 대상체가 P-BCMA-101 투여 후 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 프로토콜 P-BCMA-101-002 에 등록하는 경우, 그 대상체는 프로토콜 P-BCMA-101-001 을 중단한 후에 해당 프로토콜에 사전동의하고 등록되어야 하고, 프로토콜 P-BCMA-101-002 의 제 1 방문에 대한 사건이 수행되고, 이러한 프로토콜에 대한 P-BCMA-101 의 투여와 관련하여 해당 프로토콜에 규정된 일정에 따라 기록된다.
9. 제 10 일 평가는 필요한 경우 제 10 일 후 최대 2 일까지 수행할 수 있지만, 제 2 주차 평가와 같은 날에는 수행할 수 없다.
10. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현 제 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다.
11. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
12. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 기준선에서 연조직 형질세포종이 발견되어 반응 평가의 일부로 또는 반응을 확인하기 위해 영상화가 필요한 경우 8 주마다) 얻어진 PET/CT.

[0470]

[0471] **실시예 4 - 다발성 골수종에서의 P-BCMA-101 T 세포 요법**

[0472] *1. 도입부*

[0473] 다발성 골수종(MM)은 일반적으로 다수의 재발 및 재발생의 과정을 전형적으로 실행하는 불치병 및 치명적인 질환이다. 현재 이용 가능한 요법은 부적절하며, 효과적이고 지속적인 MM 치료법에 대한 미충족 요구가 남아있다. 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T) 면역요법은 MM을 포함한 암에 대한 중요한 잠재적인 치료 접근법으로 부상하고 있다. B-세포 성숙 항원(BCMA)은 BCMA가 MM 세포에서 발현된다는 점에서 매력적인 표적이지만, 비악성 세포 중에서 BCMA 발현은 주로 형질 세포와 B 세포의 하위세트에로 제한된다. MM 환자의 임상 데이터는 최근 두 가지 유사한 BCMA-표적화 CAR-T 세포 제품(NCI/NIH, University of Pennsylvania 및 BlueBird Bio 연구)을 사용하여 공개되었는데, 이는 이러한 접근법의 안전성 및 효능을 입증하였다(문헌[Ali, 2016]; 문헌[Cohen, 2016]; 문헌[Berdeja, 2016]). 시험관내 및 생체내 연구는 P-BCMA-101 T 세포가 높은 친화도 및 특이성으로 BCMA+ 종양 세포주에 결합하여, 강력한 탈과립화 및 세포독성을 일으키는 것으로 나타났다. 이용 가능한 전임상 및 임상 데이

터, 그리고 이러한 작제물의 잠재적인 안전성 및 효능 이점과 함께, 충족되지 않은 의학적 요구는 재발생성 또는 재발성 MM을 갖는 환자에서 P-BCMA-101을 평가하는 근거를 제공한다. 하기 정보는 임상시험자 자료집(연구자's Brochure)에도 자세히 설명되어 있다.

[0474] *1.1 다발성 골수종*

[0475] 다발성 골수종(MM)은 종종 공격적이고, 치명적인 임상 과정을 진행하는 치료 가능하지만 전형적으로 치료 불가능한 형질 세포 악성종양이다. 2015년 미국에서 약 26,850건의 새로운 MM 사례가 발생하여 대략 11,240명이 사망한 것으로 추정된다. 이러한 진단은 60 내지 70대에 가장 흔하다(문헌[Howlader, 2015]).

[0476] MM의 특징은 혈청 단백질 전기영동에서 "M 스파이크"를 생성하는 단클론성 항체(mAb)의 과도한 생산을 수반하는 골수에서 형질 세포의 단클론성 확장이다(문헌[Raab, 2009]). 질환의 임상적 특징은 악성 클론에 의한 골수 침윤, 높은 수준의 순환 단클론성 항체(mAb) 및/또는 자유 경쇄, 억제된 면역 및 말단 기관 손상으로 인해 발생한다. MM의 전형적인 징후 및 증상은 빈혈, 혈소판감소증으로 인한 출혈, 백혈구감소증 및 낮은 항체 생산으로 인한 빈번한 감염, 골 병변 및 골절로 인한 골 통증 및 높은 수준의 M 단백질 축적 및 고칼슘혈증으로 인한 신장 손상을 포함한다.

[0477] MM의 병태생리학에 대한 이해의 최근 진보 및 신규한 치료제의 도입은 지난 20년 동안 관찰된 생존율의 극적인 향상과 함께 이 질환의 관리에 기여하였다. 생존 기간의 중앙값은 1980년대 약 2년에서 오늘날 5 내지 6년 이상으로 증가하였다(문헌[Engelhardt, 2010]). 치료 요법은 2 내지 3개의 작용제로 구성되는 경향이 있고; 대부분의 모든 환자는 질환 치료 과정의 초기 및 후기에 프로테아좀 저해제(보르테조밉 또는 카르필조밉) 및 면역조절제(IMiD)(레날리도마이드, 포말리도마이드, 탈리도마이드)를 제공받는다. 또한, 적격한 환자는 자가 조혈 줄기세포 이식 및/또는 흔하지는 않지만 동종이계 조혈 줄기세포 이식을 받을 수 있다. 2015년, 미국에서 2개의 mAb(다라투무맙 및 엘로투주맙), 범(pan) 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 저해제(파나비노스타트) 및 경구 프로테아좀 저해제(익사조밉)를 포함한 몇몇 새로운 요법이 승인되었다. 이러한 최근 승인의 장기적인 영향이 결정되어 있지만, 이들은 재발 및/또는 난치성 환경에서 치유를 생성하는 것으로 보이지 않으며, 대부분의 환자는 궁극적으로 재발하여 사망할 것이다(문헌[Kumar, 2008]). 재발하는 종양은 재발할 때마다 더 공격적으로 재발하는 경향이 있다.

[0478] 치료에 대한 반응은 생존 시간 단축과 관련된 치료-난치성 질환을 초래하는 후속 질환 진행으로 인해서 더 낮게 지속 가능하다(문헌[Kumar, 2012]).

[0479] *1.2 다발성 골수종에서의 P-BCMA-101 T 세포 요법에 대한 근거*

[0480] *1.2.1. P-BCMA-101 T 세포 요법*

[0481] P-BCMA-101은 CARTyrin T 세포라고 하는 자가 Centyrin 기반 CAR-T 세포 요법이다. 이것은 세포 표면 항원 BCMA를 발현하는 MM 세포를 표적으로 하고, 표적 세포에 대한 세포독성 효과를 지시하도록 설계된 생물학적 제품이다(문헌[Tai, 2015]). P-BCMA-101의 작용 기전은 다른 CAR-T 접근법과 동일하다(예를 들어, 문헌[Ali, 2016]; 문헌[Berdeja, 2016]). 각각의 환자의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 백혈구 성분채집술에 의해서 수거되고, 그 다음 CARTyrin을 보유하는 PB 트랜스포존(즉, piggyBac™ (PB) DNA 변형 시스템)을 코딩하는 DNA 플라스미드와 함께 트랜스포사제 리보핵산(RNA)의 전기천공, 그 다음 배양/확장을 통해 해당 개별 환자를 위한 PBCMA-101 임상시험용 의약품을 생성하는 데 사용된다.

[0482] P-BCMA-101 세포는 3가지 주요 성분을 발현하도록 설계되어 있다: 항-BCMA Centyrin 키메라 항원 수용체(CARTyrin) 유전자, 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 내성 유전자 및 유도성 카스파제 9(iC9)-기반 안전 스위치 유전자(문헌[Hermanson, 2016]).

[0483] CARTyrin 발현 카세트는 CD8a 신호/리더 펩티드, CD8a 힌지/스페이서, CD8a 막관통 도메인, 세포내 4-1BB 신호 도메인 및 T 세포 수용체(TCR) ζ 쇄 신호전달 도메인에 융합된 세포외 BCMA-결합 Centyrin 단백질을 코딩한다. 항체-기반 단일 사슬 가변 영역(scFv)으로 이루어진 결합 도메인과 비교할 때, CARTyrin 결합 도메인은 더 작고 더 안정적이며 잠재적으로 면역원성이 덜한 완전 인간 단백질이지만, 인식 및 BCMA-발현 MM 세포의 사멸을 가능하게 하는 유사한 항원 결합 특징을 갖는다. 이러한 작제물은 또한 T 세포 고갈을 회피하도록 설계된다.

[0484] DHFR 저항성 유전자는 효력(potency) 및 안전성을 향상시키려는 의도로 보다 균질한 생성물을 생성하기 위해 CARTyrin 발현 T 세포의 생체외 선택을 위해서 T 세포의 제조 동안 사용된다.

[0485] "안전 스위치"는 리미듀시드, 합성 이량체화 약물의 정맥내 투여에 의해서, P-BCMA-101 세포의 신속한 제거를 허용하도록 설계된 대부분의 CAR-T 세포에서 발견되지 않는 추가적인 안전 특징부이다(섹션 15.3 참조).

[0486] 2019년 7월 14일 현재, 36명의 대상체가 P-BCMA-101 세포로 치료되었고(1상에서 34명, 2상에서 2명), 이들 중 3명은 P-BCMA-101의 두 번째 투여를 제공받았다. 모든 1상 용량 증량 코호트(1 내지 5: 0.75 내지 15 × $10^6$개 P-BCMA-101 세포/kg/용량)는 최고 용량 수준을 통해 보고된 우수한 안전성 및 효능으로 성공적으로 완료되었다. DLT는 보고되지 않았으며, 코호트 확장에서 새로운 대상체의 등록이 계속되고 있는데, 이는 추가 코호트를 평가해야 함을 시사한다. 환자는 사전 치료를 많이 받았고(이전 요법 3 내지 18회), 대부분 IMiD, 프로테아좀 저해제, 다라투무맙 및 ASCT에 실패하였다. 환자는 48 내지 1545 × $10^6$개의 총 P-BCMA-101 세포/kg으로 치료되었다. 순환 P-BCMA-101 세포가 PCR에 의해 환자의 혈액에서 검출되었으며, 확장은 2 내지 3주에 최고점에 도달하였다. 코호트 2 내지 3에서 도달한 역치 수준 초과에서, 더 넓은 피크를 가진 환자에서 더 큰 반응이 발생하는 것으로 보이는데, 이는 반복 또는 분할 투여에서 추가 이점이 있을 수 있음을 시사한다. 의미는 알 수 없지만, 일부 환자에서 항 CAR-T 항체의 징후가 나타났다. 가장 흔한 TEAE(30% 초과)는 호중구감소증, WBC 감소, 혈소판감소증, 빈혈, 메스꺼움, 변비 및 열성 호중구감소증이었다. 4명의 대상체만 CRS 사례(1명의 대상체는 2 × $10^6$개 세포/kg에서 2등급, 3명의 대상체는 15 × $10^6$개 세포/kg에서 2등급)를 가졌고, 1명의 CRES 사례(6 × $10^6$개 세포/kg에서 2등급, 일시적 혼란)이 보고되었다. P-BCMA-101의 반복 투여도 또한 내약성이 양호하였다. 1상 대상체 중 29명은 IMWG 기준에 따라 반응을 평가할 수 있었고, 적어도 하나의 골수종 반응 평가를 완료했으며, 지금까지 17명은 반응을 입증하였다(약 0.75 × $10^6$개 세포/kg에서 1/2, 약2 × $10^6$개 세포/kg에서 5/7, 약 6 × $10^6$개 세포/kg에서 4/9(+ 2 MR), 약 10 × $10^6$개 세포/kg에서 3/4 (+ 1 MR) 그리고 약 15 × $10^6$개 세포/kg에서 4/7). 이러한 결과에 기초하여, 용량 수준 3 내지 5에서 안전성 및 효능을 추가로 특징규명하기 위해서 연구를 2상 부분으로 추가 확장하였다.

[0487] ### *1.2.2. CAR-T 세포에 대한 치료 표적으로서의 BCMA*

[0488] 골수종은 입양 T 세포 요법으로 치료하기에 적합하게 만드는 몇 가지 특성을 갖는다. 첫째, 골수종은 주로 골수 질환이며, CD19를 표적으로 하는 입양 T 세포 요법은 급성 림프구성 백혈병(ALL)과 같은 골수-우세 질환에서 특히 성공적이었다(문헌[Brentjens, 2013]). 둘째, 자가 줄기세포 이식은 골수종 치료의 표준이며 림프구제거는 입양 T 세포 요법의 효능을 향상시킬 수 있다(문헌[Brentjens, 2011]; 문헌[Pegram, 2012]). 셋째, 골수종에 대한 다른 모든 치료법과 달리, 동종-SCT는 잠재적으로 치료적이지만, 이식-연관 독성, 사망률, 환자 적격성 및 적합한 공여자의 가용성에 따라 적용이 제한된다. CAR-T 세포 요법은 이러한 항종양 효능을 달성하는 더 안전한 방법이 될 가능성이 있다(문헌[Milone, 2015]).

[0489] 표적으로서 CD19의 유용성은 그것이 MM의 악성 형질 세포에서 드물게 발현된다는 사실에 의해 제한되고; 따라서 종양 세포에 의해 발현되지만 정상 조직에 의해 발현되지 않는 항원에 특히 주의하면서 다른 항원을 탐색하였다. 매력적인 목표 중 하나는 BCMA이다. 이 표적을 선택하는 근거는 BCMA가 MM 세포에서 검출되지만, 비-악성 세포 중에서 BCMA 발현은 주로 형질 세포 및 B 세포의 하위세트에로 제한되므로 표적내, 종양외 효과에 대한 가능성이 낮을 수 있다.

[0490] MM 종양 세포 인식은 P-BCMA-101 T 세포의 표면에 발현된 BCMA-특이적 CAR이 MM 종양 세포의 표면에 발현된 BCMA 항원에 결합할 때 일어난다. 신호전달 및 활성화는 CAR 내에 코딩된 세포질내 신호전달 도메인 4-1BB 및 CD3-에 의해 매개된다. 활성화는 그랜자임 및 퍼포린의 CAR-T 세포-매개 방출에 의해 표적화된 MM 종양의 직접적인 세포독성을 유발할 수 있다. 종양 살해는 또한 CD4+ T 세포에 의한 사이토카인의 방출을 통한 면역계의 다른 성분의 활성화에 의해 매개될 수 있다. 종양 재발에 대한 장기간 근절 및 예방은 즉각적인 종양 제거 또는 초기 종양 반응 후에 남아있는 장기 기억 CAR-T 세포에 의해 제공될 수 있다. 따라서, T 줄기 세포 기억 표현형(Tscm) 및 T 중앙 기억 표현형(Tcm)인 CAR-T 세포를 갖는 것이 특히 유리할 수 있다. 또한, CAR-T 매개 종양 세포 용해 동안 비-BMCA 종양-연관 항원의 방출은 적응 면역계의 조작되지 않은 종양-특이적 세포의 프라이밍 및/또는 재활성화로 이어질 수 있는데, 이는 '에피토프- 퍼짐'이라고 지칭되는 현상이며, 그것은 또한 종양 재발에 대한 장기 근절 및 예방에 도움이 될 수 있다.

[0491] Carpenter 등에 의해서 수행된 비임상 연구(문헌[Carpenter, 2013])에서, 항-BCMA-CAR T 세포는 사이토카인 생산, 증식, 세포독성 및 생체내 종양 박멸을 비롯한 특정 항-BCMA 기능을 나타내었다. 중요하게도, 항-BCMA-CAR T 세포는 1차 MM 세포를 인식하고 사멸시켰다. 이 저자는 BCMA가 CAR-발현 T 세포에 적합한 표적이며, 항-BCMA-

CAR T 세포의 입양 전달이 MM 치료를 위한 유망한 새로운 전략이라고 결론지었다(문헌[Carpenter, 2013]).

[0492] 국립 암 연구소(NCI)에서 수행된 연구로부터 재발/난치성 MM을 갖는 대상체에서 항-BCMA CAR을 발현하는 T 세포에 대한 최초의 임상적 개념 증명을 입증한 데이터가 공개되었다. 환자(N=16)를 0.3 × $10^6$; 1 × $10^6$; 3 × $10^6$ 및 9 × $10^6$개 세포/kg-체중을 포함한 4개 용량 수준에 등록하였다. 반응은 용량 의존적이었고, 부분 반응(N=3), 매우 양호한 부분 반응(N=4) 및 엄격한 완전 반응(N=1)을 포함하였다. 최고 용량 수준에서, 반응률은 100%였다. 반응 기간에 대한 데이터는 아직 사용 가능하지 않다. 내약성은 다른 CAR-T 연구로부터의 기대치와 일치하였다. 항-BCMA CAR-T 세포로 인한 독성은 저용량 수준에서 치료된 환자에서 최소였다. 그 후, 환자는 용량 수준과 상관관계가 있는 CRS 징후를 나타내었다. 비-조혈 기관에 대한 예상치 못한 손상은 관찰되지 않았다(문헌[Ali, 2016]; 문헌[Kochenderfer, 2016]). Cohen 등의 항-BCMA CAR-T 세포를 이용한 또 다른 연구(문헌[Cohen, 2016])의 초기 결과가 최근 발표되었다. 본 연구에서, 6명의 환자가 1 내지 5 × $10^8$개 CAR-T 세포로 치료되었다. 4명의 환자가 응답하였다: 최소 반응(N=2), 매우 양호한 부분 반응(N=1) 및 최소 잔존 질환 음성(MRD 음성) 엄격한 완전 반응(N=1). 5명의 환자에서 CRS가 발생하였고, 그 중 1명은 후유증 없이 치료에 반응한 신경독성을 가진 3등급이었다. CAR-T 세포 확장은 효능과 상관관계가 있는 것으로 나타났다. Berdeja 등이 제시한 세 번째 항-BCMA CAR-T 작제물의 진행 중인 연구에서, 11명의 환자가 3가지 고정 용량 수준으로 등록되었다: 환자당 5 × $10^7$; 15 × $10^7$ 및 45 × $10^7$개의 CAR-T+ 세포(환자당 80 × $10^7$ 및 120 × $10^7$개의 CAR-T+ 세포가 다음 코호트에 대해 계획됨). 반응률은 부분 반응(N=4), 매우 양호한 부분 반응(N=1) 및 엄격한 완전 반응(N=2)을 포함하여 인상적이고 용량 의존적이었고, 2명의 환자가 MRD 음성이 되었다. 내약성은 다른 CAR-T 연구에서 보고된 것보다 더 양호하였다. CRS는 환자의 70 내지 80%에서 보였지만, 그것은 등급 1 내지 2에 제한되었다. 신경독성 또는 다른 유의하거나 예상치 못한 독성은 보고되지 않았다(문헌[Berdeja, 2016]). 이러한 연구에서 독성의 상대적 부족은 대부분의 간행물에서 생성된 백혈병에 사용되는 항-CD19 제품과 비교하여 4-1BB 공자극 도메인의 사용, 질환 부담 감소 및/또는 골수종 세포에 대한 T-세포의 보다 점진적인 노출에 다양하게 기인하는데, 이는 대부분의 간행물에 나타나 있다.

[0493] 레날리도마이드(레날리도마이드, 2019)는 골수종에 대한 상당한 활성 및 면역계에 대한 다발성 효과로 알려진 면역조절 이미드 약물(IMiD) 클래스의 구성원이며, 미국에서 골수종, 골수이형성 증후군 및 림프종의 치료에 대해서 승인되었다(문헌[Moreau, 2019; Fink, 2015]). 직접적인 항-골수종 특성 외에도, 레날리도마이드가 P-BCMA-101과 같은 CAR-T 세포의 효능을 향상시킬 수 있다는 가설이 있다. 레날리도마이드 치료는 나이브 및 줄기세포 기억 T 세포의 빈도를 증가시키며, 이러한 2개의 T 하위세트는 P-BCMA-101 제조 공정에서 선호되는 출발 물질일 뿐만 아니라 CAR-T 세포 제품에서 개선된 임상 결과와 관련이 있다(문헌[Fostier, 2018]; 문헌[Barnett, 2016a]; 문헌[Cohen, 2019]). 레날리도마이드를 제조 공정에 직접 포함시키는 것은 이 접근법이 생산된 CAR-T 세포의 수와 효과기 기능을 증가시킬 수 있으므로 제안되지 않았다(문헌[Wang, 2018]). 따라서, 성분채집술 전에 레날리도마이드 치료를 포함하는 것은 입력 물질 및 이후에 제조된 CAR-T 세포 제품에서 T 세포의 품질을 개선하는 것으로 가정된다. 레날리도마이드와 CAR-T 세포의 병용 투여는 시험관내 및 마우스 모델 둘 다에서 CAR-T 세포 효과기 기능 및 전반적인 항-골수종 활성을 증가시키는 것으로 나타났기 때문에 제안되고 있다(문헌[Otahal, 2016; Wang, 2018; Works, 2019]). 또한, 레날리도마이드와 항-BCMA CAR-T 세포 제품의 유사한 조합물이 현재 적어도 하나의 다른 임상 시험(NCT03070327)에서 탐색되고 있다.

[0494] 리툭시맙(문헌[Rituximab, 2019])은 CD20+ 세포, 즉 B 세포를 고갈시키는 항-CD20 항체 치료제이며, 우수한 안전성 및 효능 프로파일을 가지며, 미국에서 다수의 림프종, 백혈병 및 자가면역 질환의 치료에 대해 승인되어 있다(문헌[Salles, 2017]). 몇 가지 이유로 P-BCMA-101과 리툭시맙 간에 치료적 상승작용이 예상된다. CD20 발현은 아마도 다발성 골수종 줄기세포를 포함하는 다발성 골수종의 하위세트에 양호하게 문헌화되어 있다(문헌[Flores-Montero, 2016]; 문헌[Matsui, 2018]; 문헌[Kapoor, 2008]). 다발성 골수종 줄기 세포가 CD20을 균일하게 발현하는지 여부에 대해 약간의 논란이 있지만, 골수종 분화가 BCMA-CD20+ 세포가 궁극적으로 BCMA+ CD20- 세포로 성숙하는 정상적인 B 세포 발달과 유사하다는 데 합의가 있다(문헌[Johnsen, 2016]; 문헌[Bødker, 2018]). BCMA+ 세포와 CAR-T 세포 및 CD20+ 세포와 리툭시맙을 표적으로 하는 조합 전략은 재발을 일으킬 수 있는 임의의 전악성 세포뿐만 아니라 성숙한 신생물을 박멸할 수 있다. 또한, 림프구감소증은 CAR-T 세포 요법의 효능에 기여하는 것으로 알려져 있으며, 리툭시맙은 이 상태를 연장시키는 것으로 밝혀져 있다(문헌[Cohen, 2019]; 문헌[Yutaka, 2015]). 마지막으로, CAR-T 세포로 치료한 다발성 골수종 환자에게서 잠재적으로 제품 내 구성을 제한하는 항-CAR 항체가 나타났는데, 이는 내인성 B 세포 구획의 고갈로 임상 반응이 개선될 수 있음을 시사한다(문헌[Xu, 2019]).

[0495] *1.2.3. P-BCMA-101 설계 및 근거*

[0496] 상기에 기재된 바와 같이, P-BCMA-101 세포는 3가지 주요 성분을 발현하도록 설계되어 있다: 항-BCMA Centyrin 키메라 항원 수용체(CARTyrin) 유전자, 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 내성 유전자 및 유도성 카스파제 9(iC9)-기반 안전 스위치 유전자(문헌[Hermanson, 2016]). BCMA 특이적 CARTyrin에 의해 MM 종양 세포의 표면에 발현되는 BCMA 항원의 결합은 CARTyrin-코딩된 세포질내 신호전달 도메인에 의해 매개되는 P-BCMA-101 세포 내에서의 신호전달 및 활성화를 유발한다. CARTyrin에 의해 코딩된 고유한 항-BCMA 모이어티 이외에, P-BCMA-101 접근법과 대부분의 다른 CAR-T 세포 사이의 주요 차이점은 제조 공정이다.

[0497] CAR 분자의 발현을 위한 자가 T 세포의 유전적 변형이 일반적으로 렌티바이러스 또는 γ-레트로바이러스 형질도입을 통해 달성되는 반면, P-BCMA-101은 piggyBac(PB) DNA 변형 시스템(문헌[Nakazawa, 2013])이라고 불리는 전기영동-기반 비-바이러스(DNA 트랜스포존) 유전자 전달 시스템을 사용하여 제조되는데, 이것은 "잘라내기 및 붙여넣기" 기전을 통해 DNA를 플라스미드에서 염색체로 효율적으로 이동시키고 CAR-T 생산을 포함하여 인간 유전자 전달 방법으로 광범위하게 사용되어 왔다(문헌[Woodard, 2015]; 문헌[Fraser, 1996]; 문헌[Singh, 2013]; 문헌[Huls, 2013]). 바이러스 기반 전달과 비교하여 PB는 더 안전한 삽입 프로필(문헌[Cunningham, 2015]), 더 큰 트랜스진 용량(안전성 및 효능을 향상시키기 위해 유전자 성분의 전달이 가능함), 더 높은 수준 및 더 안정적인 트랜스진 발현(문헌[Cunningham, 2015]), 더 긴 기간의 트랜스진 발현(문헌[Mossine, 2013]) 및 매우 유리한 TSCM 표현형의 우세 등의 이점을 제공한다. P-BCMA-101의 경우, 슈퍼 piggyBac 트랜스포사제(SPB: Super piggyBac transposase)가 사용되는데, 이것은 보다 정의되고 안전한 통합 프로필로 PB 트랜스포존을 표적 게놈의 TTAA 부위로 통합하는 것을 촉매하는 조작된 과활성 효소이다. 렌티바이러스 및 γ-레트로바이러스의 유전자 카고 용량은 약 10 내지 20Kb로 제한되는 반면, piggyBac DNA 변형 시스템은 입증된 카고 한계가 300 Kb를 초과하여, 여러 유익한 유전자의 전달을 허용한다. 또한, 렌티바이러스와 비교하여 PB-매개 도입은 트랜스진의 높은 수준의 지속적인 발현을 허용한다(문헌[Cunningham, 2015]). 마지막으로, 이 방법을 사용한 CAR-T 세포의 제조는 줄기세포 기억 표현형(Tscm)을 가진 세포의 백분율을 증가시켜 안전성 및 효능을 증가시킬 수 있다. 뮤린 MM 모델(공격적인 골수종 및 del17p 및 다른 TP53 이상과 같은 불리한 예후 지표가 있는 환자를 재현하도록 설계된 MM.1S p53 넉아웃(KO) 모델 포함)에서 전례 없는 반응 지속성 및 재발 종양의 재제어에서 효능이 입증되었다. 점진적으로 확장 및 분화함으로써, Tscm 세포는 급성 부작용의 가능성을 감소시킬 수 있다는 가설이 있다. P-BCMA-101 T 세포의 60% 초과가 평균적으로 CD45RA, CD62L 및 CD197(CCR7)의 양성 발현을 특징으로 하는 Tscm 표현형을 나타내는 것으로 관찰되었다. 또한, P-BCMA-101은 저해성 수용체 CD279(PD-1), Tim-3 및 Lag-3의 발현에 대해 대체로(평균 10% 미만) 음성이다(문헌[Barnett, 2016a]). 따라서, 안전성 측면의 이점 외에도, PB(즉, P-BCMA-101)를 사용한 CAR-T 세포 제조는 효능 이점을 제공할 수 있다.

[0498] *1.2.4. P-BCMA-101를 사용한 비임상 연구의 개요*

[0499] *1.2.4.1. 제품 후보 스크리닝 및 선택*

[0500] P-BCMA-101에서 항-BCMA-결합 CARTyrin을 상이한 CARTyrin의 패널로부터 선택하였다. 선택은 시험관내 및 생체내 전임상 연구 모두에서 비교 성능을 기반으로 하였다(문헌[Barnett, 2016b]). BCMA 단백질을 특이적으로 인식하고, 다양한 친화도로 결합하고, 단량체 특성을 입증하기 위해 이전에 확인된 상이한 Centyrin을 사용하여 상이한 CARTyrins의 패널을 작제하였다. 이들 상이한 CARTyrin 후보를 표적 종양 세포를 직접 용해시키는 능력뿐만 아니라 세포독성 사멸 능력에 대한 대용 마커인 탈과립화 능력을 측정한 시험관내 연구에서 BCMA+ 종양 세포주에 대한 기능적 활성에 대해 평가하였다. 이러한 연구는 이 프로토콜에 사용된 리드 BCMA CARTyrin 분자를 식별하기 위해 수행되었다.

[0501] *1.2.4.1.1. 시험관내 스크리닝*

[0502] 후보 CARTyrin의 선택 시 그리고 생체내 평가를 뒷받침하기 위해, PB 전위를 사용하여 P-BCMA-101 세포를 생산하고 표현형 및 기능적 특징규명을 수행하였다. CARTyrin을 P-BCMA-101 T 세포의 표면에서 검출하였고(도 12a), 이것은 재자극 시 극적으로 증가되었다(도 12b). 시험관내에서 이들 T 세포의 사멸 기능을 시험하기 위해서, P-BMCA-101 세포를 BCMA-발현 세포와 공배양한 후 표적 세포 사멸을 측정하였다(도 12c). P-BCMA-101 세포는 BCMA+ 골수종 세포주 H929에 대해 강한 세포독성 기능을 나타냈다. 다음으로, BCMA+ 세포주와의 공배양 시 P-BCMA-101 세포 증식 능력을 4일 후에 평가하였다. CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다는 강력한 증식 능력을 나타내었고, CD4+ T 세포의 증식 지수는 3.0 ± 0.09이었고, CD8+ T 세포의 경우 3.4 ± 0.03이었다(도 12c). 이러한 데이터는 PB-전이된 P-BCMA-101 세포가 세포 표면에서 검출 가능한 수준의 CARTyrin을 발현하고, 특히 BCMA+ 표적 세포를 사멸시키고, BCMA+ 세포 표적에 노출되었을 때 증식하였다는 것을 나타낸다(문헌[Hermanson,

2016]).

[0503] *1.2.4.1.2. MM 이종이식편 모델*

[0504] NSG 마우스에게 정맥내(IV) 주사된 루시퍼라제-발현 MM.1S p53 WT 및 넉아웃(TP53KO) MM 세포주를 사용하여 MM 이종이식편에서 생체내 검정을 수행하여 생체내 항종양 효능과 관련하여 최고의 CARTyrin+ T 세포 제품 후보를 결정하였다(MD Anderson Cancer Center).

[0505] MM.1S p53 WT 실험에서, P-BCMA-101 세포의 2개 용량($0.5 \times 10^6$ 및 $5.0 \times 10^6$)을 평가하였다. 대조군 동물은 T 세포를 제공받지 않았다. 모든 마우스는 제21일까지 상당한 종양 부하를 나타내었고, P-BCMA-101 세포를 22일에 주사하였다. 어떠한 T 세포도 제공받지 않은 대조군 마우스는 점진적인 종양 성장을 나타내었고, 결국 MM.1S 종양 주사 후에 대략 55 내지 60일에 사망하였다. 대조적으로, P-BCMA-101 세포가 주사된 마우스에서 용량-의존적 항종양 활성이 관찰되었다. $5 \times 10^6$개의 P-BCMA-101 세포/마우스의 용량은 최대 항종양 효과를 나타냈으며, 마우스는 T 세포 주사 후 빠르면 3 내지 7일에 신속한 종양 제거를 나타내었다. 생물발광 영상화에 의해 관찰된 상기 결과와 일치하게, P-BCMA-101 세포로 처리된 마우스에서 생존의 최대 개선이 관찰되었으며, $5 \times 10^6$개의 P-BCMA-101 세포로 처리된 2마리의 마우스는 100일을 초과하게 생존하였다. 마우스의 혈청의 M-단백질 수준 또한 영상화 및 생존 데이터와 일치하였다. 실제로, M-단백질 수준은 100일이 지난 후에도 이들 마우스 중 두 마리에서 검출 가능하지 않았다. 마우스에서 종양이 제59일에 또는 그 이후에 재발했지만, 영상화뿐만 아니라 혈청 M-단백질 수준 둘 다에 의해 결정된 바와 같이 가장 높은 용량 수준으로 처리된 3마리의 마우스 중 2마리에서 추가 P-BCMA-101 투여 없이 종양이 후속적으로 반응하였다. 종합하면, 이들 결과는 P-BCMA-101 세포가 인간 MM.1S 골수종 세포주 이종이식편 모델에서 강한 용량 의존적 효능을 나타낸다는 것을 입증한다. 이 데이터는 추가로 P-BCMA-101 세포가 마우스 모델에서 지속되는 것으로 보이고 추가 P-BCMA-101의 투여 없이 종양 재발의 완전한 퇴행을 야기한다는 것을 나타낸다. 이러한 고유한 발견 및 연구 종결(92일)까지의 전체 반응 지속성은 P-BCMA-101 T 세포의 선호되는 Tscm 표현형에 기인한다고 여겨진다(문헌[Hermanson, 2016]).

[0506] 유사한 결과가 MM.1S TP53KO 모델(MD Anderson Cancer Center)에서 관찰되었으며, 이는 공격적인 골수종 및 불리한 예후 지표, 예컨대 del17p 및 다른 TP53 돌연변이를 갖는 환자를 요약하기 위해 p53 널이 되도록 설계된 것이다. 미처리군의 모든 마우스는 50일 이내에 사망한 반면, P-BCMA-101-처리된 군에서 마우스의 100%가 90일의 실험 종료까지 생존하였다. 이것은 다수의 기존의 다발성 골수종 치료제가 이 모델에서 시험되었고, 모두 이 공격적인 종양주를 제어하는 데 실패하였기 때문에 고유한 발견이다(R. Orlowski와의 개인적 의사소통).

[0507] *1.2.4.2. P-BCMA-101 전임상 독성*

[0508] *1.2.4.2.1 인간 단백질 패널에 대한 P-BCMA-101 Centyrin의 시험관내 결합*

[0509] 검정을 용이하게 하기 위해 Centyrin-Fc 융합 단백질의 형태로 P-BCMA-101로부터의 Centyrin의 잠재적인 2차 표적 결합을 확인하기 위해 시험관내 인간 단백질 스크리닝 기술을 사용하였다. Centyrin-Fc 융합 단백질을 4300+ 인간 단백질에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 이러한 인간 단백질의 대부분은 세포 표면 막 단백질을 나타내며, 각각 인간 HEK293 세포에서 개별적으로 발현된다. 본 연구는 의도한 표적인 BCMA에 결합하는 Centyrin의 높은 특이성을 입증하였다.

[0510] *1.2.4.2.2. 정상 인간 조직에 대한 P-BCMA-101 반응성*

[0511] P-BCMA-101 CAR-T 세포가 정상적인 건강한 인간 조직에 대해 임의의 직접적인 독성을 나타낼 수 있는지 여부를 평가하기 위해서 정상 인간 조직 세포주의 패널에 대한 P-BCMA-101 세포의 잠재적인 반응성을 조사하였다. P-BCMA-101 T-세포를 정상 인간 세포 유형 또는 BCMA+ MM1.S 양성 대조군 세포와 함께 공배양하였고, 발광 또는 유세포 분석 기반 판독을 사용하여 정상 인간 세포 유형에 대한 잠재적인 T-세포 반응성을 평가하였다. 9개의 세포주를 시험하였고, BCMA+ MM1.S 양성 대조군 세포 이외의 반응성은 관찰되지 않았다.

[0512] *1.2.4.2.3. MM1.S 골수종 종양-보유 NSG 마우스에서 P-BCMA-101 CAR-T 세포의 단일-용량 GLP 안정성 및 효능 연구*

[0513] SRI International에서 수행된 MM 종양 보유 암컷 NSG 마우스에서 GLP 순응 하이브리드 약리-독성 연구 맥락으로 P-BCMA-101을 안전성 및 효능에 대해 평가하였다(도 13a 내지 도 13d). 본 연구의 목적은 단일 정맥(IV) 투여 후 인간 MM.1S-Luc 골수종 세포를 보유한 마우스에서 P-BCMA-101 세포의 항종양 효능 및 안전성을 평가하고, P-BCMA-101 투여 후 최대 3개월 동안 모니터링하는 것이었다. 암컷 NSG 마우스에게 MM.1S BCMA+ MM 세포를 IV로

이식하고, 17 내지 19일 후에 P-BCMA-101 세포를 저용량(4 × $10^6$개 세포) 또는 고용량(1.2 × $10^7$개 세포)으로 IV 투여하거나, 치료하지 않고 그대로 두었고, 최대 90일 동안 종양 부하 및 독성에 대해서 모니터링하였다. P-BCMA-101 세포를 제공받지 않은 마우스는 상당한 종양 부하가 발달하였고, 예상대로 제29일 또는 그 이전에 모두 희생되었지만, P-BCMA-101로 처리된 마우스는 BLI 및 M-단백질 분석에 의해서 결정된 바와 같이 종양 부하가 상당히 퇴행하거나 제거되었다. P-BCMA-101 처리군에서 종양이 거의 완전히 사라진 반면, 군4(고용량 P-BCMA-101)의 마우스는 구부린 자세와 주름진 털, 가늘게 뜨는 눈, 탈모, 변색, 두꺼워진 피부/털을 비롯한 이종 GVHD와 일치하는 임상 소견을 보였다. 이들 나머지 군 4 마우스는 제78일 또는 그 이전에 희생될 때까지 생존하였다. 대조군(종양만 존재) 마우스와 달리, P-BCMA-101 처리된 마우스는 실험 과정 동안 체중이 감소하지 않았다. NSG 마우스는 T, B 및 NK 세포가 부족하고 수지상 세포 및 대식세포의 기능이 감소된 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 인간 림프구를 이 세포주에 이식하면 GVHD 유사 증후군이 발생하여 사망에 이른다. 전반적으로, 본 연구에서 이들 마우스의 임의의 기관에 대한 P-BCMA-101 세포의 효과에 기인할 수 있는 표적 기관 관련 독성은 관찰되지 않았다. 종양 형성은 없었고, 말기 부검에서 눈에 띄는 육안적 또는 조직병리학적 소견도 없었다. 소견은 이들 동물의 심하게 손상된 면역 상태와 일치하거나, 마우스에 대한 인간 T 세포 투여로 인한 이종 GVHD와 관련이 있었다. 예상된 바와 같이, P-BCMA-101 세포는 투여 후 제29일 및 제92일에 마우스에서 지속되었고, 고도로 미분화된 기억 세포 표현형을 나타내는 것으로 나타났는데, 이는 또한 본 연구에서 관찰된 예외적이고 전례 없는 항종양 효능을 설명할 수 있다. 종합하면, 본 연구에서 PBMCA-101의 IV 투여에 기인할 수 있는 다른 명백한 독성 또는 명확한 표적 기관이 확인되지 않았다. 이종이식 GVHD는 인간 세포로 처리된 NSG 마우스에서 흔히 발생하기 때문에, 이러한 소견은 진정한 표적 장기 독성을 반영하는 것이 아니라, 인간 세포로 마우스를 처리한 것에 대한 인공 이식편 대 숙주 반응을 반영한다. 따라서, 불내약성 용량이 발견되지 않았으므로, 시험된 최고 용량(마우스당 1.2 x $10^7$개 세포)을 최대 내약 용량으로 간주하였다. GVHD의 출현으로 인해 P-BCMA-101 세포에 대한 NOAEL을 정의할 수 없었지만 명확한 표적 장기 독성이 존재하지 않았다. P-BCMA-101을 사용한 FIH 1상 연구의 제안된 시작 용량은 0.75 × $10^6$개 세포/kg으로 설정된다. 60 kg의 작은 MM 환자의 경우, 이는 이 연구에서 내약성이고 효능이 있는 고용량 수준인 1.2 × $10^7$개 세포(6 × $10^8$개 세포/kg)의 800분의 1 미만이다.

[0514] ### *1.3. 가능한 유해 및 유익*

[0515] #### *1.3.1. 유익 평가*

[0516] P-BCMA-101 및 다른 CAR-T 세포(항-BCMA CAR-T 세포 포함)의 데이터에 기초하여, P-BCMA-101이 항종양 효과를 발휘할 수 있다고 예상하는 것이 합당하다. 이것은 섹션 1.2의 데이터에 의해 강력하게 뒷받침된다. 상기에 기재된 바와 같이, P-BCMA-101은 이전의 항-BCMA CAR-T 제품과 비교하여 높은 Tscm 표현형 비율 및 Centyrin 결합 도메인과 같은 효능을 개선하기 위한 많은 특징을 갖는다.

[0517] #### *1.3.2. 유해 평가*

[0518] 본 연구의 참여는 대상체가 유전자 조작된 자가 T 세포에 노출될 것이다. 유해는 유사한 제품에 대한 임상 경험을 기반으로 허용 가능하다. P-BCMA-101의 잠재적 안전성 문제는 다른 CAR-T 세포 제품과 효과적으로 동일하다. CAR-T 세포 연구에서 보이는 주요 부작용은 CRS 및 의도된 작용 기전을 통한 CAR-T 세포의 활성화와 관련된 관련 증상이다(사이토카인의 상당한 증가는 효능과 상관관계가 있는 것으로 보고되었다). 이러한 독성 관리에 대한 설명 및 지침은 섹션 6.3에 제공된다. BCMA-표적화 CAR-T 세포에 대해서는 아직 보고되지 않았지만, CAR-T 세포에 대한 다른 이론적 우려는 다음과 같다: 1) "표적내/종양내" 독성은 골수종 종양 세포의 신속한 세포 파괴를 통한 종양 용해 증후군(TLS: tumor lysis syndrome)으로서 나타남; 2) 건강한 조직에서 BCMA+ 비종양 세포의 파괴와 관련된 "표적내/종양외" 독성(저감마글로불린혈증 제외); 3) BCMA-음성 표적과 BCMA-결합 도메인의 잠재적인 교차 반응성으로 인한 "비표적" 독성; 및; 4) 항-CAR-T 항체의 발달에 이차적인 면역 관련 반응. 이러한 질문 중 많은 부분이 섹션 1.2의 데이터에서 다루어진다. 종양형성의 가능성은, 이러한 세포의 말단 분화, 유전자 추가 물질 및 공정의 삽입 프로파일 및 특성뿐만 아니라 다른 CAR-T 세포 제품을 제공받은 환자의 장기 추적관찰(Jena, 2010)과 함께 현재까지의 광범위한 임상 경험에 기초하여, 무시할 수 있는 것으로 간주되는 또 다른 가상 위험이다(문헌[Tey, 2014]; 문헌[Hackett, 2013]). 적어도 하나의 이전 CAR-T 연구는 유사한 DNA 트랜스포존 접근법을 사용했으며, 1상 임상 시험에서 1.2 × $10^9$개 용량의 총 CAR-T 세포까지 내약성이 양호한 것으로 나타났다(문헌[Singh, 2013]; 문헌[Huls, 2013]). 이 프로토콜에 사용된 온건한 컨디셔닝 화학 요법의 잠재적 위험은 이러한 작용제, 특히 혈구감소증, 위장 효과 및 불임에 대해 전형적일 것으로 예상된다. 출혈성 방

광염, 폐, 심장 및 신경학적 영향이 또한 보고되어 있다.

[0519] 이러한 1상 연구에서 제안된 시작 용량(0.75 × $10^6$개 CAR-T 세포/kg)은 BCMA를 표적으로 하는 CAR-T 세포의 한 임상 시험(Cohen 2016)에서 보고된 것보다 약 3배 더 낮고, 최대 10배 더 높은 용량을 통해 독성이 경미하다고 설명한 다른 사람들의 시험과 대략 동일하다(문헌[Ali, 2016]; 문헌[Berdeja, 2016]). 이는 마우스 GLP 독성 연구에서 내약성이고 효능이 있는 고용량 수준보다 보수적으로 800배 낮으며, 제안된 FIH 시험에 대한 큰 안전 마진을 추가로 뒷받침한다. 더욱이, 마우스 GLP 독성 연구의 고용량 P-BCMA-101 치료군에서 관찰된 유일한 주목할 만한 독성은 GVHD였으며, 이는 환자의 자가 인체 제품과 관련이 있을 것으로 예상되지 않는 독성이다.

[0520] 상기에 바와 같이, P-BCMA-101은 높은 Tscm 비율, 작고 면역원성이 불량한 Centyrin-결합 도메인 및 DHFR 선택 유전자와 같은 안전성을 증가시키는 다수의 특징으로 설계되었다.

[0521] 본 연구는 하기를 포함하여 잠재적인 위험을 해결하기 위한 몇 가지 추가 조치를 통합한다: T 세포 용량의 단계적 증량, 대상체의 시차 등록, 자가 T 세포 요법과 관련된 독성 관리 경험이 있는 전문 학술 센터에서의 치료, 독성 관리 지침 및 연구 전반에 걸쳐 안전성을 평가하기 위한 안전 검토 위원회. 2019년 7월 14일 현재, 1상에서 가장 흔한 TEAE(30% 초과)는 호중구감소증, WBC 감소, 혈소판감소증, 빈혈, 메스꺼움, 변비 및 열성 호중구감소증이었다. 4명의 대상체만 CRS 사례(1명의 대상체는 2 × $10^6$개 세포/kg에서 2등급, 3명의 대상체는 15 × $10^6$개 세포/kg에서 2등급)를 가졌고, 1명의 CRES 사례(6 × $10^6$개 세포/kg에서 2등급)이 보고되었다.

[0522] ***1.3.3. 전체 유익/유해 결론***

[0523] P-BCMA-101 T 세포 요법으로 예상되는 알려지고 잠재적인 유해는 치명적인 악성종양인 재발/난치성 MM을 갖는 대상체에게 제공될 수 있는 잠재적인 유익에 의해 정당화되는 것으로 보인다.

[0524] ***2. 연구 목적 및 평가변수***

[0525] *1차 목적:* 본 연구의 1차 목적은 다음과 같다:

[0526] 1상 - 용량 제한 독성(DLT)에 기초하여 P-BCMA-101의 안전성 및 최대 내약 용량(MTD)을 결정하기 위해

[0527] 2상 - P-BCMA-101의 안전성 및 효능 평가

[0528] *1차 평가변수*:

[0529] 1상 - MTD를 정의하기 위한 각각의 용량 수준에서 DLT를 갖는 대상체의 수

[0530] 2상 - 이상 반응(AE: adverse event), 검사 및 표준 검사실 연구에 기초한 안전성 및 내약성; 독립 검토 위원회(IRC)에 의해 평가된 국제 골수종 실무 그룹 기준(문헌[kumar, 2016])에 의한 전체 반응률(ORR) 및 반응 기간(DOR)

[0531] 2차 목적: 본 연구의 2차 목적은 다음을 평가하는 것이다:

[0532] 1상 - P-BCMA-101의 안전성 및 실행 가능성; P-BCMA-101의 항골수종 효과; 2/3상 연구에서 추가 평가를 위한 용량 선택을 안내하는 세포 용량의 효과

[0533] 2상 - 사이토카인 방출 증후군(CRS)의 발생률 및 중증도; 추가 효능 평가변수

[0534] *2차 평가변수:* 다음 2차 평가변수를 평가할 것이다:

[0535] 1상 - P-BCMA-101의 프로토콜 금지 용량을 생성하는 능력; AE, 검사 및 표준 검사실 연구에 기초한 한 안전성 및 내약성; Lee 기준을 사용하여 등급이 매겨진 CRS(문헌[Lee, 2014]); 국제 골수종 실무 그룹(IMWG) 통일 반응 기준에 기초한 효능(문헌[Rajkumar, 2011]; 문헌[Kumar 2016]; 문헌[Cavo, 2017]); 전체 반응률(ORR); 반응까지의 시간(TTR); 반응 기간(DOR); 무진행 생존(PFS); 및 전체 생존(OS).

[0536] 2상 - Lee 기준을 사용하여 등급이 매겨진 CRS(문헌[Lee, 2014]); IL-6 길항제, 코르티코스테로이드 및 리미듀시드 사용; OS, PFS, TTR, 최소 잔존 질환(MRD) 음성률

[0537] *탐색 목표:* 본 연구의 탐색 목표는 다음과 같다:

[0538] 1상 - MM 형질 세포 BCMA 발현, 순환 가용성 BCMA 및 임상 반응 간의 관계 평가

[0539] 1상 및 2상 - P-BCMA-101 세포의 확장 및 기능 지속성을 특징규명함. 추정 CRS 마커와 유효성 또는 안전성 사이

의 관계를 평가함; 지시된 경우 P-BCMA-101 관련 이상 반응에 대한 리미듀시드의 효과를 평가함.

[0540] *탐색적 평가변수:* 연구 과정 동안 하기 탐색적 평가변수를 평가할 것이다:

[0541] 1상 - 골수에서 BCMA 및/또는 기타 바이오마커; 혈액 중의 가용성 BCMA 및/또는 기타 바이오마커 수준

[0542] 1상 및 2상 - P-BCMA-101 세포(예를 들어, P-BCMA-101 세포의 혈액 및 골수에서 벡터 카피 수/mL); P-BCMA-101 세포 하위세트 조성 및 클론성; CRS 마커: C-반응성 단백질(CRP), 페리틴, IL-6, IL-2, TNF-α 및 인터페론 감마(IFN-γ)

[0543] ***3. 임상시험 계획***

[0544] ***3.1. 전체 연구 설계***

[0545] 연구는 다중 부분, 즉 1상, 공개, SAD 단계; 1상, 다중 용량, 주기 투여 단계; 1상, 병용 투여 단계; 및 재발/난치성 MM을 갖는 성인 대상체에서 2상, 공개, 효능 및 안전성 단계. 단일 용량 투여에 대한 연구 디자인의 개략도가 도 14에 도시되어 있다. 1상 주기 투여에 대한 개략도가 섹션 15.5의 도 16 및 도 17에 도시되어 있다. 병용 투여에 대한 연구 디자인의 개략도가 섹션 15.6의 도 18에 도시되어 있다.

[0546] CAR-T 세포 투여로 예상되는 유형의 급성 응급 사건을 관리하기 위한 자원을 사용하여 종양학 대상체 및 줄기세포/골수 이식을 관리하는 데 경험이 있는 현장만 본 연구에 참여하도록 선택될 것이다. 안전 위원회는 연구 전반에 걸쳐 데이터를 검토하기 위해 정기적으로 모임을 가질 것이다.

[0547] 프로토콜 항목 기준을 충족하는 대상체는 본 연구에 등록할 자격이 있을 것이고, 단일 투여 코호트에 대해서 표 2에 요약된 절차를 따를 것이다. 주기 투여 코호트에 대한 절차가 섹션 15.5에 상세히 기재되어 있다. 1상 병용 투여에 대한 절차가 섹션 15.6에 상세히 기재되어 있다. 대상체가 등록한 후 P-BCMA-101 CARTyrin-T 세포를 생산하기 위해 제조 현장으로 보내질 PBMC를 얻기 위해 백혈구 성분채집술을 수행할 것이다. P-BCMA-101 제조에 대략 4주를 허용하고, 대상체는 백혈구 성분채집술 방문으로부터 대략 4주 후에 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 투여를 위해 다시 방문하도록 의도된다(이 기간은 연구자가 필요하다고 간주하는 경우 연장될 수 있음).

[0548] P-BCMA-101 세포 주입을 투여하기 전에, 대상체는 사이클로포스파마이드 300 $mg/m^2$ 및 플루다라빈 30 $mg/m^2$의 림프구제거 화학요법 치료요법을 제공받을 것인데, 각각의 작용제는 -5일에서 시작하여 연속 3일 동안 매일 제공된다. 대상체는 연구자가 적절하다고 판단하는 경우 림프구제거 화학요법 동안 입원 환자로 유지될 수 있다.

[0549] 림프구제거 화학요법 치료요법 후 2일 휴식 후, 대상체는 제0일에 대략 5 내지 20분에 걸쳐 IV로 투여되는 P-BCMA-101 세포를 투여받을 것이다. 다른 CAR-T 요법으로 수행된 이전 연구에서는 임상시험용 의약품 투여 후 3 내지 7일 이내에 최대 독성이 발생하는 것을 관찰하였다. 연구 대상체는 주입 도중 및 주입 후와 주입 후 대략 7일 동안 면밀히 모니터링될 것이다. 이 관찰 기간에는 모든 대상체에 대한 CRS와 같은 P-BCMA-101 세포 관련 독성의 출현을 포함하여 이상 반응(AE)의 일련의 평가가 포함될 것이다. CRS는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.

[0550] 개별 환자의 위험의 연구자 평가에 기초하여 대상체는 P-BCMA-101 투여를 위해 병원에 입원할 수 있다. 입원은 필요하지 않지만, 대상체는 P-BCMA-101의 마지막 투여 후 대략 14일 동안 병원에서 50마일 이내에 머물러야 하며, CRS 증상 또는 발열과 같은 신경독성의 경우 입원 여부를 평가해야 한다. 입원하는 경우, 대상체는 연구자에 의해 안정적인 것으로 평가될 때까지 퇴원하지 않을 것이다. 대상체는 림프구제거 화학요법 동안 또는 연구자가 적절하다고 판단하는 경우 상기 기준이 충족된 후 입원 환자로 유지될 수 있다.

[0551] 정기적인 추적관찰을 위해서 환자는 다시 방문하고, 사건 일정에 명시된 대로 안전성, 내약성 및 항골수종 반응에 대한 일련의 평가를 받을 것이다(표 3). 1상 및 2상 모두에서 치료 후 추적관찰 방문은 10일, 2, 3, 4, 6, 8주, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개월, 그 후 P-BCMA-101 투여 후 최대 24개월 동안 3개월마다 수행될 것이다. 주기 투여 코호트에 대한 추적관찰 절차가 섹션 15.5에 상세히 기재되어 있다. 병용 투여 코호트에 대한 추적관찰 절차가 섹션 15.6에 상세히 기재되어 있다.

[0552] P-BCMA-101을 제공받고 연구를 완료하거나 철회하는 모든 사전동의 대상체는 장기간 추적관찰(LTFU) 프로토콜(P-BCMA-101-002)에 들어가도록 권장될 것이다. 이 연구와 LTFU 연구 사이에 대상체는 마지막 P-BCMA-101 주입 시간으로부터 15년 동안 추적될 것이다. 이러한 LTFU는 유전자 요법 임상 시험에 대한 FDA(FDA, 2006) 요구 사항에 따라 지연된 AE를 관찰하기 위한 것이다. 대상체는 LTFU 단계 동안 전체 생존을 위해 계속 추적될 것이다.

[0553] *3.2 연구 투여*

[0554] *3.2.1. 1상에 대한 용량 증량가이드라인*

[0555] 연구의 1상은 공개, 다기관, SAD, 다중 코호트 연구, 다중 용량 주기 투여 코호트 연구; 및 대략 120명의 성인 대상체를 대상으로 한 병용 투여 연구. 먼저, P-BCMA-101의 최대 6회 용량 수준이 단일 용량으로 정맥내 투여될 것이다.

[0556] 제안된 용량(P-BCMA-101 세포/kg/용량)은 다음을 포함한다:

[0557] 코호트 -1: $0.25 \times 10^6$

[0558] 코호트 1: $0.75 \times 10^6$

[0559] 코호트 2: $2 \times 10^6$

[0560] 코호트 3: $6 \times 10^6$

[0561] 코호트 4: $10 \times 10^6$

[0562] 코호트 5: $15 \times 10^6$

[0563] 연구의 1상은 용량 증량 코호트의 3+3 설계를 따를 것이며, 여기서 3명의 대상체는 초기에 각각의 코호트에 대해 P-BCMA-101 T 세포를 투여받을 계획이다. 추가 대상체는 해당 대상체에서 관찰된 결과에 따라 코호트에서 투여될 수 있다.

[0564] 처음 2개의 코호트 각각에 대해, 안전성을 평가하기 위해 처음 3명의 대상체의 투여는 동시보다는 대상체들 사이에 적어도 14일 간격으로 시차를 둘 것인데, 그 이유는 CAR-T 연구에서 독성의 최고점은 투여 3 내지 7일에 발생하며 대다수는 2주 이내에 발생하고 2 내지 3주 내에 해결되기 때문이다(문헌[frey, 2016]).

[0565] 안전 위원회의 재량에 따라 제3 코호트부터 시작하여 각 코호트의 첫 번째 및 두 번째 대상체의 투여는 시차를 둘 것이다. 용량 증량 가이드라인이 표 1에 요약되어 있다.

[0566] P-BCMA-101 세포의 투여는 3+3 설계로 증량 용량 코호트에서 수행될 것이다. 코호트 1부터 시작하여 코호트에서 적어도 3명의 대상체에게 투여될 것이다. 28일 전체에서 P-BCMA-101 세포-관련 DLT가 처음 3명의 대상체에서 관찰되지 않는 경우, 증량이 다음 코호트로 진행될 수 있다. 처음 3명의 대상체 중 1명에서 P-BCMA-101 세포-관련 DLT가 관찰되면 적어도 3명의 추가 대상체가 이 용량 수준으로 치료될 것이다. 2의 대상체에서 DLT가 관찰되는 경우, MTD는 다음 더 낮은 용량 수준 또는 그보다 낮은 것으로 간주되고 더 낮은 용량 수준에서 추가 등록이 이루어지거나 안전 위원회의 재량에 따라 중간 용량 수준에서 시험될 수 있고, 그렇지 않았으면 증량이 진행될 수 있다(즉, MTD는 이것이 발생하지 않은 것으로 평가된 가장 높은 용량 코호트임). 2명 이상의 대상체가 코호트 1에서 DLT를 경험하는 경우, 안전 위원회는 이용 가능한 데이터를 모두 검토한 후 동일한 3 + 3 확장 규칙으로 코호트 -1에서 3명의 대상체를 투여하도록 선택할 수 있다. 2명 이상의 대상체가 코호트 -1에서 DLT를 경험하는 경우, 안전 위원회는 유해 대 유익을 평가하기 위해서 안전성 및 효능 데이터를 고려하여 동일한 3 + 3 확장 규칙으로 더 낮은 용량으로 3명의 대상체에게 투여하도록 선택할 수 있거나 연구를 중단할 수 있다.

[0567] 용량이 MTD를 초과하지 않는 한, P-BCMA-101의 안정성 및 항골수종 효과를 추가로 평가하기 위해 해당 코호트로부터의 안전성 및 효능 데이터에 기초하여 안전 위원회에 의해서 코호트에서 추가 대상체에게 추가될 수 있다. 코호트 5가 전체 MTD를 마치지 않고 완료되면, 안전 위원회는 5 내지 $10 \times 10^6$개의 P-BCMA-101 세포/kg 증분으로 추가 증량 코호트를 평가하도록 선택할 수 있다.

[0568] *3.2.2. 주기 투여에서의 투여*

[0569] 1상에서 - 주기 투여, P-BCMA-101의 다중 용량이 각각 2주의 2주기(코호트 A 및 코호트 C) 또는 3주기(코호트 B)로 정맥내 투여될 것이다. 투여되는 총 용량은 단일 용량 증량 동안 결정된 바와 같이 MTD 미만에서 시작하는 3+3 설계를 따를 것이다. 제1 주기에서, 총 용량의 1/3이 투여될 것이다. 코호트 A에서 총 용량의 최대 2/3가 제2 주기에 투여될 것이다. 코호트 B에서 총 용량의 최대 1/3가 총 용량이 제2 및 제3 주기 각각에 투여될 것이다. 코호트 C에서 총 용량의 최대 2/3가 제1 주기에 투여되고, 총 용량의 최대 1/3이 제2 주기에 투여될

것이다. 절차에 대한 자세한 내용은 섹션 15.5에 제공되어 있다. 각각의 주입 전에 혈청 크레아티닌은 2.0 mg/dL 이하이고, 혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제(SGOT)는 정상의 상한의 3× 이하이고, 총 빌리루빈은 2.0 mg/dL 이하이어야 하거나, P-BCMA-101 주입을 진행하려면 의료 모니터 승인을 받아야 한다.

[0570] **3.2.3. 병용 투여에서의 투여**

[0571] 1상 - 병용 투여에서, P-BCMA-101은 승인된 요법과 조합으로 투여될 것이다.

[0572] 레날리도마이드

[0573] 코호트 R: P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 mg;

[0574] 코호트 RP: 성분채집술 1주 전에 시작하여 7일 동안 및 P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 mg.

[0575] 레날리도마이드를 사용한 투여는 질환이 진행되지 않는 한 코호트 R 및 코호트 RP에 대해 계속될 것이다. 처방 정보는 레날리도마이드 패키지 삽입물을 참조하기 바란다(문헌[Lenalidomide, 2019])(특히 레날리도마이드는 기형 유발 물질로 추정되므로 임신 방지 및 모니터링이 필요함). 다음은 이 프로토콜과 관련된 추가 권장 사항이다. DLT가 보고되지 않고 P-BCMA-101 투여 28일 후 혈소판이 50,000/μL 이상이고 호중구가 1000/μL 초과인 경우 용량을 28일마다 21일 동안 경구로 매일 25 mg으로 증가시킬 수 있다. 이 용량으로 치료된 처음 6명의 환자에서 2 미만의 DLT가 보고된 경우, 안전 위원회의 결정에 따라 모든 환자의 시작 용량을 28일마다 중 21일 동안 경구로 매일 25 mg으로 증가시킬 수 있다. 치료 중 호중구가 1000/μL 미만으로 감소하면 이것이 1000/μL 이상일 때까지 레날리도마이드를 유지한 다음 5 mg 더 낮은 용량으로 다시 시작한다. 치료 중 혈소판이 30,000/μL 미만으로 감소하면 이것이 30,000/μL 이상일 때까지 레날리도마이드를 유지한 다음 5 mg 더 낮은 용량으로 다시 시작한다. 크레아티닌 청소율이 30 내지 60 mL/분인 경우 최대 레날리도마이드 용량은 매일 10 mg이어야 한다. 크레아티닌 청소율이 30 mL/분 미만인 경우 레날리도마이드를 유지한다. 레날리도마이드는 DLT의 경우 중단해야 한다. 본 연구에서 허용되는 최저 용량은 매일 5 mg이다. 연구자 및 안전 위원회는 다른 안전성 결과에 기초한 시간에 레날리도마이드를 중단하기로 결정할 수 있다. 환자는 지시된 바와 같이 항응고제를 병용해야 한다(예를 들어, 매일 아스피린 325 mg 경구 투여). 레날리도마이드와 함께 글루코코르티코이드를 투여해서는 안 된다.

[0576] 리툭시맙

[0577] 코호트 RIT: 정맥내 주입을 통한 375 mg/$m^2$, P-BCMA-101 주입 전 12일 및 5일, 그 다음 질환이 진행되지 않는 한 8주마다. 처방 정보는 리툭시맙 패키지 삽입물을 참조하기 바란다(문헌[rituximab, 2019]). 다음은 이 프로토콜과 관련된 추가 권장 사항이다. 리툭시맙은 발생할 경우 치명적일 수 있는 심각한 주입 관련 반응을 관리하기 위해 적절한 의료 지원과 함께 의료 전문가에 의해서만 투여되어야 한다. 제1 주입: 50 mg/시간의 속도로 주입을 시작한다. 주입 독성이 없는 경우, 주입 속도를 30분마다 50 mg/시간 증분으로 최대 400 mg/시간까지 증가시킨다. 후속 주입: 표준 주입: 100 mg/시간의 속도로 주입을 시작한다. 주입 독성이 없는 경우, 속도를 30분 간격으로 100 mg/시간 증분으로 최대 400 mg/시간까지 증가시킨다. 정맥내 주입으로서만 투여한다. 정맥 푸시 또는 볼러스로 투여하지 않는다. 각각의 주입 30분 전에 완료되도록 아세트아미노펜, 항히스타민제 및 100 mg 정맥 내 메틸프레드니솔론으로의 각각 주입 전에 예비 투약한다. 주입 반응 또는 DLT의 경우 리툭시맙을 중단해야 한다. 연구자 및 안전 위원회는 다른 안전성 결과에 기초하여 언제든지 리툭시맙을 중단하기로 결정할 수 있다. 리툭시맙 처방 정보에 따라 치료 중 및 치료 후 환자에 대해 주폐포자충 폐렴(PCP)과 같은 감염성 질환에 대한 예방 및 관찰을 고려해야 한다.

[0578] 투여되는 P-BCMA-101의 용량은 용량 증가 동안 결정된 MTD 이하에서 시작하는 3+3 설계를 따라서 증량되거나 감량될 것이다. 절차에 대한 자세한 내용은 섹션 15.6에 제공되어 있다.

[0579] ***3.2.4. 2상에서의 투여***

[0580] 연구의 2상은 재발 및/또는 난치성 MM을 갖는 대략 100명의 성인 대상체에 대한 공개, 다기관 연구이다. 2상의 대상체는 6 내지 15 × $10^6$개 세포/kg의 총 용량을 제공받을 것이다(1상에서 결정된 일정에 따라).

[0581] ***3.2.5. 반복 투여***

[0582] 대상체의 질환이 진행될 때 제조로부터 충분한 P-BCMA-101 세포가 남아 있는 경우, 안전 위원회 승인으로 추가 세포를 용량-제한 독성 평가를 성공적으로 완료한 최고 용량 수준까지 투여할 수 있다. 추가 P-BCMA-101 T 세포

주입을 제공받기 위해, 대상체에게 새로운 대상체 식별 번호를 지정하고, 그들은 초기 투여에 대해 설명된 모든 적격성 기준을 충족해야 하며, 백혈구 성분채집술을 제외한 동일한 스크리닝, 등록, 컨디셔닝 화학요법 및 추적 관찰 절차가 수행될 것이다. 재치료에 대한 자세한 내용은 섹션 15.4에 제공되어 있다.

[0583] ***3.3. 용량-제한 독성의 평가***

[0584] DLT는 P-BCMA-101 세포의 제어할 수 없는 확장을 포함하여 P-BCMA-101 세포 요법과 적어도 관련 가능성이 있는 임의의 국립 암 연구소 - 이상 반응에 대한 공통 용어 기준(NCI CTCAE: National Cancer Institute - Common Terminology Criteria for Adverse Events) 3이상의 등급으로 정의되며, 다음 예외를 제외하고 마지막 P-BCMA-101 세포 주입 후 처음 28일 이내에 발병하는 기저 질환 또는 림프구제거 화학요법에 기인하지 않음:

[0585] 마지막 P-BCMA-101 세포 주입 후 28일 이내에 해소되는 호중구감소성 열을 동반하거나 동반하지 않는 3등급 또는 4등급 호중구감소증;

[0586] 3등급 발열;

[0587] 마지막 P-BCMA-101 세포 주입 후 28일 이내에 해결되는 혈소판감소증으로 인한 출혈이 동반되거나 동반되지 않은 3등급 또는 4등급 혈소판감소증;

[0588] 3등급 또는 4등급 빈혈 및 림프구감소증;

[0589] 3등급 또는 4등급 저감마글로불린혈증;

[0590] 탈모증;

[0591] 24시간 이내에 치료에 반응하는 3등급 또는 4등급 구역, 구토 또는 설사

[0592] 표준 항히스타민 기반 요법으로 세포 투여 6시간 이내에 2등급 이하로 가역적인 세포 주입(세포 주입과 관련됨) 2시간 이내에 발생하는 즉각적인 과민 반응(발열, 발진, 기관지경련);

[0593] 28일 이내에 2등급 미만으로 회복되는 3등급 뇌병증;

[0594] 14일 이내에 해결되는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])에 따른 3등급 CRS;

[0595] 14일 이내에 2등급 이하로 회복되는 3등급 비혈액학적 검사실 이상;

[0596] 7일 이내에 2등급 이하로 회복되는 4등급 비혈액학적 검사실 이상.

[0597] ***3.4. 대상체의 수 및 연구 기간***

[0598] 1상에서, 최대 20개 현장에서 최대 120명의 대상체가 등록될 예정이다. 2상에서, 최대 20개 현장에서 대략 100명의 대상체가 등록될 예정이다. 등록된 대상체는 안전성, 내약성 및 반응(골수종 병기)에 대한 일련의 측정이 진행될 것이다. 이러한 측정은 스크리닝과, 단일 투여에 대해 표 2 및 표 3 및 주기 투여 코호트에 대해 섹션 15.5 및 병용 투여 코호트에 대해 섹션 15.6에 기재된 사건 일정에 따른 P-BCMA-101 투여 후 최대 24개월 사이의 기간 동안 얻어질 것이다. 대상체는 표 8 및 표 9에 기재된 사건 일정에 따라 P-BCMA-101의 추가 주입을 제공받을 수 있다.

[0599] 이 프로토콜을 완료하거나 철회한 후, P-BCMA-101을 제공받은 사전동의 대상체는 장기 안전성을 평가하기 위해 마지막 투여 후 총 15년 동안 지속적인 추적관찰을 허용하는 별도의 프로토콜(P-BCMA-101-002)에 등록하도록 권장될 것이다.

[0600] ***4. 연구 집단의 선택, 철회, 완료 및 중단 기준***

[0601] ***4.1. 포함 기준***

[0602] 대상체는 본 연구에 참여할 자격이 되기 위해서 하기 포함 기준을 충족해야 한다:

[0603] 1. 서면 대상자 동의서에 서명해야 함.

[0604] 2. 18세 이상의 남성 또는 여성.

[0605] 3. 초기 진단 시 IMWG 기준에 정의된 활동성 MM 진단이 확인되어야 함(문헌[Rajkumar, 2014]).

[0606] 4. 다음 기준 중 적어도 하나에 의해 정의된 측정 가능한 MM을 가져야 함:

[0607] 1상:

[0608] 0.5 g/dL(5 g/L) 이상의 혈청 M-단백질;

[0609] 200 mg/24h 이상의 소변 M-단백질;

[0610] 혈청 유리 경쇄(FLC) 검정: 혈청 FLC 비율이 비정상인 경우 10 mg/dL(100 mg/L) 이상의 관련된 FLC 수준;

[0611] 총 골수 세포의 30% 초과의 골수 형질 세포 또는 기타 측정 가능한 골 질환(예를 들어, PET 또는 CT로 측정 가능한 형질세포종)(의료 모니터 승인 필요)

[0612] 2상:

[0613] 1.0 g/dL(10 g/L) 이상의 혈청 M-단백질;

[0614] 200 mg/24h 이상의 소변 M-단백질;

[0615] 혈청 FLC 검정: 혈청 FLC 비율이 비정상인 경우 10 mg/dL(100 mg/L) 이상의 관련된 FLC 수준;

[0616] 5. 하기에 의해서 정의된 재발/난치성 MM을 가져야 함:

[0617] 1상:

[0618] 프로테아좀 저해제 및 면역조절제(IMiD)를 함유해야 하는 적어도 3회의 사전 요법 라인을 제공받음; 또는

[0619] 이들 작용제로의 치료 60일에 또는 60일 이내에 진행하는 것으로 정의된 프로테아좀 저해제 및 IMiD에 대해 "이중 난치성"인 경우 적어도 2회의 사전 요법 라인을 제공받음.

[0620] 2상:

[0621] 삼중 조합물의 형태의 적어도 2회의 라인으로 프로테아좀 저해제, IMiD 및 CD38 표적화 요법을 함유해야 하는 적어도 3회의 사전 요법을 받았고, PD가 가장 양호한 반응이 아닌 한 각각의 라인의 2주기 이상을 겪음;

[0622] 가장 최근의 요법 라인에 난치성임; 그리고

[0623] ASCT를 받았거나 ASCT 후보가 아님.

[0624] 참고: 유도 요법, 자가 줄기 세포 이식 및 유지 요법은 중간 진행 없이 순차적으로 제공되는 경우 단일 라인으로 간주되어야 함.

[0625] 6. 스크리닝 시점부터 연구 기간 동안 피임을 수행할 의향이 있어야 함(가임 여성 및 남성 모두).

[0626] 코호트 R, RP 또는 RIT의 여성은 치료를 시작하기 4주 전, 치료 중, 용량 중단 중에 그리고 레날리도마이드 중단 후 4주 동안 그리고 리툭시맙의 마지막 투여 후 12개월 동안 지속적으로 성교를 중단하거나 두 가지 신뢰할 수 있는 피임 방법을 사용하기로 약속해야 함.

[0627] 코호트 R 또는 RP의 남성은 성공적인 정관절제술을 받았더라도 레날리도마이드를 복용하는 동안 그리고 레날리도마이드 중단 후 최대 4주 동안 가임 여성과 성적 접촉을 하는 동안 항상 라텍스 또는 합성 콘돔을 사용해야 함. 레날리도마이드를 복용 중인 남성 환자는 정자를 기증해서는 안 된다.

[0628] 7. 스크리닝 시에 혈청 임신 검사가 음성이고, 림프구제거 화학요법 치료요법을 시작하기 전 3일 이내에 소변 임신 검사가 음성이어야 함(가임 여성).

[0629] 코호트 R 및 RP의 여성 대상체는 레날리도마이드를 시작하기 전에 2번의 임신 검사 결과가 음성이어야 함. 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 첫 번째 검사는 10 내지 14일 이내에, 두 번째 검사는 대상체가 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 24시간 이내에 수행해야 하며, 첫 번째 달에는 매주, 그 후 월경 주기가 규칙적인 여성의 경우 매월 또는 월경이 불규칙한 여성의 경우 2주마다 수행되어야 한다.

[0630] 8. 자가 줄기 세포 이식을 수행한 경우 적어도 90일이 경과해야 함.

[0631] 9. 다음과 같이 정의된 적절한 중요한 장기 기능을 가져야 함(또는 의료 모니터 승인):

[0632] 2.0 mg/dL 이하의 혈청 크레아티닌 및 30 mL/분 초과의 추정 크레아티닌 청소율(Cockcroft-Gault 공식을 사용하여 계산하고 투석에 의존하지 않음).

[0633] 1000개/μL 이상의 절대 호중구 수치 및 50,000개/μL 이상의 혈소판 수치(골수 형질 세포가 세포질의 50% 이상

인 경우 30,000개/μL 초과).

[0634] 투여량 코호트에 기초한 표적 세포 용량을 얻기 위해 추정된 적절한 절대 CD3 수치. (2상: 300개/μL 이상의 절대 림프구 수치)

[0635] 8 g/dL 초과의 헤모글로빈(수혈 및/또는 성장 인자 지원이 허용됨).

[0636] 혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제(SGOT) ≤ 3 × 정상 및 총 빌리루빈의 상한 ≤ 2.0 mg/dL(분자적으로 문서화된 길버트 증후군 병력이 없는 경우).

[0637] 45% 이상의 좌심실 박출률(LVEF). LVEF 평가는 등록 후 4주 이내에 수행되어야 함.

[0638] 10. NCI CTCAE 버전 4.03 기준 또는 대상체의 이전 기준선에 따라 2등급 이하의 등급으로, 말초 신경병증을 제외하고 사전 요법으로 인한 독성에서 회복되어야 함.

[0639] 11. 대상체는 0 내지 1의 동부 협력 종양 학회(ECOG) 수행 상태를 가져야 함.

[0640] ***4.2 제외 기준***

[0641] 1. 임신 또는 수유 중임

[0642] 2. 부적절한 정맥 접근 및/또는 백혈구 성분채집술에 대한 금기 사항이 있음.

[0643] 3. 활동성 용혈성 빈혈, 형질 세포 백혈병, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, POEMS 증후군(다발신경병증, 기관비대, 내분비병증, 단클론성 단백질 및 피부 변화), 파종성 혈관내 응고, 백혈구 정체 또는 아밀로이드증이 있음.

[0644] 4. 비전이성 기저 세포 또는 편평 세포 피부 암종과 같은 저위험 신생물을 제외하고 MM 외에 활동성 2차 악성 종양(적어도 5년 동안 무질환이 아님)을 가짐.

[0645] 5. 건선, 다발성 경화증, 루푸스, 류마티스 관절염 등과 같은 활동성 자가면역 질환이 있음(의료 모니터가 질환이 활동성 및 자가면역성인지 판단할 것임).

[0646] 6. 뇌졸중, 간질 등과 같은 중대한 중추신경계(CNS) 질환의 병력이 있음(중대한 경우 의료 모니터가 결정함).

[0647] 7. 활동성 전신 감염이 있는 있음(예를 들어, 발열을 유발하거나 항균 치료가 필요한 경우).

[0648] 8. B형 또는 C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 인간 T-림프친화성 바이러스(HTLV) 감염 또는 면역결핍 증후군이 있음.

[0649] 9. 뉴욕 심장 협회(NYHA: New York Heart Association) 클래스 III 또는 IV 심부전, 불안정 협심증, 또는 심근경색 또는 심각한 부정맥(예를 들어, 심방 세동, 지속적인 [30초 초과] 심실 빈맥 등)의 병력.

[0650] 10. 연구자 또는 의료 모니터의 의견에 따라, 프로토콜(적절한 백혈구 성분채집술, 컨디셔닝 화학요법 및/또는 CAR-T 세포 투여에 대한 자격이 없거나 이것이 불가능한 상당한 가능성을 나타내는 의학적 병태 또는 검사실 소견 포함)에 대한 안전한 참여 및/또는 준수를 방해할 임의의 정신 또는 의학적 장애(예를 들어, 심혈관, 내분비, 신장, 위장관, 비뇨생식기, 면역결핍 또는 달리 명시되지 않은 폐 장애)를 가짐.

[0651] 11. 사전 유전자 요법 또는 유전자-변형 세포 면역요법을 제공받은 적이 있음(또는 의료 모니터의 승인을 받음). 대상체는 항골수종 치료와 관련하여 유전자 변형되지 않은 자가 T 세포 또는 줄기 세포를 제공받았을 수 있음.

[0652] 12. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 시점으로부터 2주 또는 5 반감기(둘 중 더 긴 기간 또는 의료 모니터 승인을 받음) 이내에 항암 의약을 제공받은 적이 있음.

[0653] 13. 백혈구 성분채집술 시작 시점으로부터 2주 이내에 면역억제 의약을 제공받은 적이 있고/하거나 연구 중에 이를 필요로 할 것으로 예상된 적이 있음(의료 모니터는 의약이 면역억제제로 간주되는지의 여부를 결정할 것임). 일반적으로, 모든 비필수 의약(보충제, 한약 등 포함)은 인지되지 않은 면역억제 효과의 가능성으로 인해 P-BCMA-101 투여 후 2개월까지 백혈구 성분채집술 2주 전부터 중단되어야 한다.

[0654] 14. 필요한 백혈구 성분채집술 2주 이내 또는 P-BCMA-101 투여의 1주 또는 5 반감기(둘 중 더 짧은 기간) 이내에 5 mg/일 이상의 프레드니손 또는 동등한 용량의 또 다른 코르티코스테로이드의 전신 코르티코스테로이드 요법을 제공받은 적이 있음 또는 연구 과정 중에 이것이 필요할 것으로 예상됨. (국소 및 흡입 스테로이드는 허용

됨. 전신 코르티코스테로이드는 연구 특정 지침 이외의 P-BCMA-101 세포를 제공받은 후에는 금기임).

[0655] 15. 골수종의 CNS 전이 또는 증후성 CNS 침범(연수막 암종증, 두개골 신경병증 또는 종괴 병변 및 척수 압박 포함)이 있음.

[0656] 16. 본 연구에 사용된 임의의 작용제에 대해 중증의 즉각적인 과민 반응의 병력이 있음.

[0657] 17. 동종이계 줄기세포 이식 또는 임의의 다른 동종이계 또는 이종발생성 이식을 겪은 병력이 있음 또는 90일 이내에 자가 이식을 경험한 적이 있음.

[0658] 18. 예방적 항응고제로 매일 아세틸살리실산(ASA)(325 mg)을 복용할 수 없음. ASA에 과민증이 있는 환자는 와파린 또는 저분자량 헤파린을 사용할 수 있음)(코호트 R 및 RP만).

[0659] 19. 항응고제와 관계없이 지난 6개월 이내에 혈전색전성 질환의 병력(코호트 R 및 RP만).

[0660] ***4.3 대상체 철회***

[0661] 등록되고 연구 프로토콜을 완료하지 않은 대상체는 연구를 조기에 중단한 것으로 간주될 것이다. 조기 중단 이유(예를 들어, 자발적 철회, 독성, 사망)를 증례기록서(case report form)에 기록해야 한다. 최종 연구 평가는 중단 시점에 완료될 것이다. 대상체가 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 (모든 안전성 및 효능 평가 포함) 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. P-BCMA-101을 제공받은 후 프로토콜을 철회하는 대상체는 동반 장기간 추적관찰 프로토콜 P-BCMA-101-002에 등록하도록 권장될 것이다. 조기 중단의 잠재적인 이유는 하기를 포함한다:

[0662] 1. 대상체가 추적관찰되지 않는다.

[0663] 2. 연구자의 판단으로 대상체가 너무 아파서 계속할 수 없다.

[0664] 3. 연구 요법 및/또는 진료 약속에 대한 대상체 비순응.

[0665] 4. 임신

[0666] 5. 자발적 철회; 대상체는 편견 없이 언제든지 연구에서 자신을 제외할 수 있다. 대상체는 사전동의를 철회하기를 원할 때는 언제든지 연구에서 철회할 수 있다.

[0667] 6. 대체 의학, 방사선 또는 외과 개입이 필요한 악성 종양의 상당한 진행. 질환 마커가 사전 증가를 확인하는 대신 진행성 질환에 도달한 후 P-BCMA-101 세포 활성으로부터 감소하는 경우, 이들은 또 다른 전신 골수종 요법이 지시되지 않는 한 진행성 질환을 고려하기 위해 해당 수준에서 이후에 증가하여 프로토콜로부터 대상체를 중지해야 한다.

[0668] 7. 모든 품질 관리 기준을 충족하는 임상 세포 용량 생성을 배제하는 T 세포 유전자 변형 및 확장 절차에서 기술적 어려움에 직면한다.

[0669] 8. 시험 책임자, 의뢰자, 연구 자금 제공자, 연구윤리심의위원회(IRB: Institutional Review Board)/독립 윤리위원회(IEC: Independent Ethics Committee), 또는 식품의약국(FDA: Food and Drug Administration)에 의한 연구 중단.

[0670] ***4.4. 연구 중단***

[0671] 의뢰자는 어떤 이유로든 언제든지 연구를 중단하거나 종료할 수 있다. 연구가 중단되거나 종료된 경우 의뢰자는 해당 현장, 규제 기관 및 IRB/IEC에 적절하게 통지되는 것을 보장할 것이다.

[0672] 연구자가 자신의 현장에서 연구를 중단/종료하는 경우 의뢰자에게 통지되어야 한다. 의뢰자는 규제 기관 및 IRB/IEC에 적절하게 통지되는 것을 보장할 것이다.

[0673] 의뢰자는 현지 규정에 따라 관련 규제 기관/IEC에 적절한 연구 종료 선언이 이루어지는 것을 보장할 것이다.

[0674] ***5. 연구 치료***

[0675] ***5.1. 백혈구 성분채집술***

[0676] 모든 스크리닝 절차를 완료하고 모든 적격성 기준을 충족하는 대상체는 P-BCMA-101의 제조를 위한 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 수거하기 위해 백혈구 성분채집술을 받을 것이다. 이 방문은 스크리닝 방문 후 약 28일 이내에 이루어져야 한다. 연구에 등록된 대상체는 등록 병원에서 Spectra Optia 시스템(Terumo BCT) 또는 이와 동등한

백혈구 성분채집술 기계를 사용하여 표준 백혈구 성분채집술 절차를 거칠 것이다. 절차 직후, 백혈구 성분채집술 처리된 세포는 검증된 온도 제어 조건에서 제조 및 분석 현장으로 이송될 것이다. 의도는 10 내지 15 리터(현장 정책에 의해 정의된 최소 및 최대) 성분채집술을 수행하고 1.5 내지 3 × $10^{10}$(최소 1.5 × $10^{10}$ 및 최대 5 × $10^{10}$)개의 백혈구(WBC)(수치는 또한 전체 유핵 세포[TNC]로 허용됨)의 목표를 수거하는 것이다. 자세한 내용은 연구 참조 매뉴얼(성분채집술 센터 매뉴얼)을 참조한다. 성분채집술 종료 시 도달하는 부피, 세포 수 및 다른 산출 매개변수는 환자, 기계, 방법 및 작업자에 따라 달라질 것이므로 절대 요구 사항과 상반되게 지침으로 제공된다.

[0677] P-BCMA-101의 제조는 도 15에 도시되어 있다. 수집된 성분채집술 제품은 즉시 제조를 위해 제조업체로 택배로 운송될 것이다. T 세포 단리, piggyBac DNA 플라스미드(항-BCMA CARTyrin을 코딩하는 P-BCMA-101 플라스미드) 및 Super piggyBac 트랜스포사제 mRNA(SPB mRNA)를 사용한 전기천공법, CARTyrin+ T 세포 선택 및 세포 확장을 포함하는 P-BCMA-101의 제조는 대략 4주 후에 완료될 것이다. 최종 제품은 백에 냉동보존될 것이다. 최종 제형은 최대 10%(v/v) 디메틸 설폭사이드(DMSO)를 가질 것이다.

[0678] 주입을 위한 제품 출시 후, 냉동 P-BCMA-101 제품은 등록 연구 센터의 약국 또는 적용 가능한 세포 요법 시설로 택배로 배송될 것이다. P-BCMA-101은 투여 시기까지 -130° C 이하에서 보관될 것이다.

[0679] 공급 기준을 충족하는 P-BCMA-101 세포를 백혈구 성분채집술 샘플에서 제조할 수 없는 경우 두 번째 백혈구 성분채집술 및 제조를 시도할 수 있다. 두 번째 시도도 실패하면 대상체는 연구에서 제외되고 연구 치료를 받지 않은 것으로 간주된다. 대상체의 질환이 진행될 때 제조로부터 충분한 P-BCMA-101 세포가 남아 있는 경우, 안전 위원회 승인으로 추가 세포를 용량-제한 독성 평가를 성공적으로 완료한 최고 용량 수준까지 투여할 수 있다.

[0680] 일단 의약품이 제조되면, 대상체는 백혈구 성분채집술 방문 후 대략 4주(이 기간은 연구자 및 의료 모니터의 재량에 따라 연장될 수 있음)에 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 투여 기간을 위해 클리닉을 다시 방문할 것이다.

[0681] 백혈구 성분채집술 방문 후 및 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 세포 투여 기간을 위한 입원 전에 급속한 질환 진행을 경험한 대상체는 연구자의 재량에 따라 구제 요법을 투여받을 수 있다. 구제 요법은 필요한 경우가 아니면 사용되어서는 안 되며 연구자의 재량에 따라 대상체의 임상 병력(이전에 사용된 약제가 선호되고 의료 모니터의 승인이 필요함)에 의해 결정된다. 대상체가 구제 요법을 받는 경우, 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 투여 기간은 구제 요법의 마지막 치료일로부터 적어도 2주 또는 5 반감기로 예정되어야 하며, 대상체는 항목 기준 및 병용 의약에 관한 섹션 4 및 섹션 6에 기재된 기준을 충족해야 한다. 구제 요법에 대한 대상체의 반응은 대상체가 임상시험용 의약품을 제공받을 자격이 있는지 여부를 결정하기 위해 연구자 및 의료 모니터에 의해 평가될 것이다.

[0682] 대상체는 연구 기간 전체에서 일시적인 처방 목적을 위해서 방사선 요법 또는 혈장분리교환술 및 교환을 제공받는 것이 허용될 것이다.

[0683] ***5.2. 컨디셔닝 화학요법***

[0684] P-BCMA-101 세포 주입을 투여하기 전에, 대상체는 사이클로포스파마이드 300 mg/$m^2$ 및 플루다라빈 30 mg/$m^2$의 컨디셔닝 림프구제거 화학요법 치료요법을 제공받을 것인데, 각각의 화학요법제는 연속 3일 동안(-5일부터 -3일까지) 매일 30분에 걸쳐서 순차적으로 IV로 제공된다. 대상체는 컨디셔닝 화학요법을 시작할 때 등록 기준을 계속 충족하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 코호트 R, 코호트 RP 및 코호트 RIT의 대상체의 경우, 병용 요법은 해당 날짜에 화학요법을 컨디셔닝하기 전에 투여되어야 한다. 다음 평가는 -제5일 전 72시간 이내에 반복해야 함: 간이 정신 상태 검사(MMSE), 신체 검사, 활력 징후, 전해질 및 마그네슘을 포함한 화학 패널, B 및 T 세포 수를 포함한 혈액학, 응고, 순환 골수종 평가 /형질 세포 및 임신 검사(해당되는 경우). 기준선 골수종 반응 평가는 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 7일 이내에 수행되어야 한다. 대상체는 연구자의 재량에 따라서 이 시점에 입원 환자로 입원 및 치료될 수 있다.

[0685] ***5.3. P-BCMA-101 투여***

[0686] ***5.3.1. 설명***

[0687] P-BCMA-101은 piggyBac (PB) DNA 변형 시스템으로 불리는 전기천공 기반 비-바이러스(DNA 트랜스포존) 유전자 전달 시스템을 통해 유전자 변형된 활성화된 T 세포로 구성된다. PB DNA 변형 시스템은 "잘라내기 및 붙여넣기"

기전을 통해 플라스미드에서 염색체로 DNA를 효율적으로 이동시킨다. P-BCMA-101은 항-BCMA Centyrin CAR(CARTyrin) 유전자, DHFR 선택 유전자(문헌[Rushworth, 2016]) 및 iCasp9-기반 안전 스위치 유전자(문헌[Straathof, 2005])의 세 가지 주요 성분을 포함하도록 설계되었다. 5' 프로모터 및 3' poly-A 신호와 함께 이러한 성분은 부적절한 유전자 활성화 또는 침묵을 차단하여 트랜스진을 안정화할 수 있는 2개의 미번역 시스-조절 인설레이터 요소에 의해 플랭킹되어 있다(문헌[Mossine, 2013]).

[0688] CARTyrin 발현 카세트는 CD8a 신호/리더 펩티드, CD8a 힌지/스페이서, CD8a 막관통 도메인, 세포내 4-1BB 신호 도메인 및 TCR ζ 쇄 신호전달 도메인에 융합된 세포외 BCMA-결합 Centyrin 단백질을 코딩한다. 항체-기반 단일 사슬 가변 영역(scFv)으로 이루어진 결합 도메인과 비교할 때, CARTyrin 결합 도메인은 더 작고 더 안정적이며 잠재적으로 면역원성이 덜한 완전 인간 단백질이지만, 인식 및 BCMA-발현 MM 세포의 사멸을 가능하게 하는 유사한 항원 결합 특징을 갖는다.

[0689] DHFR 선택 유전자는 제품의 효력 및 효능을 향상시키기 위해 CARTyrin 발현 T 세포의 생체외 선택을 위해서 T 세포의 제조 동안 사용된다.

[0690] iC9 안전 스위치 유전자 리미듀시드, 합성 이량체화 약물의 정맥내 투여에 의해서, P-BCMA-101 세포의 신속한 제거를 허용하도록 설계된 대부분의 CAR-T 세포에서 발견되지 않는 추가적인 특징부이다.

[0691] ### *5.3.2. 제품 라벨링*

[0692] 각각의 제품 백에는 제품명(P-BCMA-101), 제품 제조일, 제품 로트 번호, 보관 조건, 부품 번호 및 적어도 2명의 비-개인 대상체 식별자(예컨대, 대상체의 이니셜, 생년월일 및/또는 연구 대상체의 식별 번호)가 라벨링될 것이다. 또한, 제품 백에는 "자가 사용 전용(FOR AUTOLOGOUS USE ONLY)", "감염성 물질에 대해 평가되지 않음(NOT EVALUATED FOR INFECTIOUS SUBSTANCES)" 및 "주의: 신약-연방법에 의해 임상시험 용도로 제한됨'이라고 라벨링될 것이다.

[0693] ### *5.3.3. 보관*

[0694] 임상시험용 의약품 및 임의의 관련 연구 치료 용품을 수령하면, 재고 조사를 수행해야 하며, 운송을 수락하는 사람이 약물 수령 일지를 작성하고 서명해야 한다. 지정된 연구 직원이 배송품 재고에 기록된 모든 항목이 배송품에 포함되어 있는지 재고 조사하고, 계수하고, 확인하는 것이 중요하다. 소정의 배송에서 임의의 손상되거나 사용할 수 없는 임상시험용 의약품 연구 약물은 연구 파일에 문서화될 것이다. 연구자는 연구 의뢰자 또는 피지명인에게 연구자의 현장에 공급된 임의의 손상되거나 사용할 수 없는 연구 치료제를 알려야 한다. P-BCMA-101 세포는 다음을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다양한 이유로 의뢰자 또는 피지명인에게 반환되어야 할 필요가 있을 수 있다: 1) 라벨이 잘못된 제품; 2) 대상체의 병태가 주입/주사를 금지함, 3) 대상체가 주입/주사를 거부함. 종합하면, 미사용 제품은 의뢰자 또는 피지명인에게 반환될 것이다.

[0695] P-BCMA-101 세포를 함유하는 백은 대상체가 주입할 준비가 될 때까지 모니터링되는 -130℃ 이하의 냉동고에서 혈액 은행 조건의 현장에 보관될 것이다.

[0696] ### *5.3.4. 제조*

[0697] T 세포 주입 전 권장되는 예비 투약은 650 mg 아세트아미노펜 및 25 내지 50 mg 디펜하이드라민 염산염을 포함한다. 이러한 약물은 필요에 따라 6시간마다 제공될 수 있다. 비스테로이드성 항염증제는 아세트아미노펜으로 통제되지 않는 열에 대해 제공할 수 있지만, 출혈 위험 및 신장 기능과 같이 대상체의 내성에 잠재적으로 영향을 미치는 요인과 관련하여 사용을 신중하게 고려해야 한다. 예상치 못한 중증도 또는 지속 기간의 발열 또는 기타 암시적인 증상에 대해서는 패혈증에 대한 평가를 고려해야 한다. 전신 코르티코스테로이드는 지지 치료 지침(섹션 6.3)에 설명된 바와 같이 필요하지 않는 한 T 세포-기반 임상시험용 의약품의 효능에 악영향을 미칠 수 있으므로 투여하지 않아야 한다.

[0698] 대상체는 투여 전(즉, 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전) 간 및 신장 검사실 항목 요건을 계속 충족해야 한다. 추가로, 활동성 감염 또는 심각한 심장(예를 들어, 승압제(pressor)를 필요로 하는 저혈압 또는 제어할 수 없는 부정맥) 또는 폐 손상(예를 들어, 산소 보충 요구 또는 흉부 X-레이에서 상당한 진행성 침윤)의 증거가 계속 없어야 한다.

[0699] ### *5.3.5. 투약 및 투여*

[0700] 1상에서, P-BCMA-101의 용량 수준이 단일 용량 또는 다회 용량으로 정맥내 투여될 것이다. 용량 수준은 용량 증

량 지침(섹션 3.2)에 설명된 3+3 증량 설계에서 코호트에 의해 시험될 것이다. 2상에서, 대상체는 6 내지 15 × $10^6$개 세포/kg의 총 용량을 제공받을 것이다(1상에서 결정된 일정에 따라).

[0701] 냉동보존된 P-BCMA-101은 등록 연구 센터로 운송되고 주입될 때까지 -130oC 미만에서 보관된다. 대상체를 위해 수령한 크리오백(cryobag)의 라벨에 내용물이 코호트에 대한 P-BCMA-101 세포의 할당된 용량(+/- 5%)보다 많다고 표시된 경우, 할당된 용량에 해당하는 제품의 부피만 투여되어야 한다. 대상체를 위해 수령된 크리오백의 라벨에 내용물이 코호트에 대한 P-BCMA-101 세포의 할당된 용량(+/- 5%)보다 적다고 표시되어 있고, 여러 크리오백이 대상체를 위해 제공된 경우, 할당된 용량에 해당하는 제품의 부피를 여러 크리오백으로부터 투여해야 한다(이것은 상이한 백혈구 성분채집술/제조의 크리오백을 포함할 수 있음). 대상체를 위해 수령된 크리오백의 라벨에 내용물이 코호트에 대한 P-BCMA-101 세포의 처방 용량(+/- 5%) 보다 적다고 표시되어 있고, 대상체에 대해서 할당된 용량에 해당하는 제품의 부피를 제공하기에 충분한 수의 크리오백이 제공되지 않은 경우, 제품을 투여할 수는 있지만 해당 대상체에 대한 용량은 코호트 수준 용량이 아닌 제공받은 용량으로 기록될 것이며, 그에 따라 해당 대상체의 모든 데이터가 기록될 것이다. 주입 직전에 P-BCMA-101을 해동하고 하기에 설명된 대로 주입한다. 주입 전에 P-BCMA-101의 추가 처리가 필요하지 않을 것이다. 세포는 임상시험용 약국 또는 해당 세포요법 시설에 기록되어야 한다.

[0702] 림프구제거 화학요법 치료요법 후 2일 휴식 후, 대상체는 IV로 투여되는 P-BCMA-101을 투여받을 것이다. 연구자 평가에 기초하여 대상체는 P-BCMA-101 투여를 위해 병원에 입원할 수 있다. 입원은 필요하지 않지만, 대상체는 P-BCMA-101의 마지막 투여 후 대략 14일 동안 병원에서 50마일 이내에 머물러야 하며, CRS 증상 또는 발열과 같은 신경독성의 경우 입원 여부를 평가해야 한다. 주입 직전에, P-BCMA-101 세포를 -130° C 이하(기상 액체 질소에서)에서 대상 침대 옆으로 옮긴다. 세포를 36° C 내지 38° C로 유지되는 수조를 사용하여 주입 직전에 침대 옆에서 해동한다(다른 위치에서 해동하고 2 내지 8° C에서 침대 옆으로 운반하는 것은 의뢰자의 사전 승인을 받아야 함). 세포가 해동될 때까지 백을 부드럽게 주무를 것이다. 용기에 얼어붙은 덩어리가 남아 있지 않아야 한다. 백이 손상되거나 누출되거나 달리 손상된 것으로 보이면, 그것인 주입해서는 안 되며 의뢰자 또는 의뢰자의 피지명인에게 반환해야 한다. 주입 백 라벨에는 대상체의 연구 식별 번호 및 이니셜 또는 생년월일을 포함하여 적어도 2개의 고유 식별자가 존재할 것이다. 주입 전에, 2명의 개인이 대상체의 존재 하에서 이러한 모든 정보를 독립적으로 확인하여 정보가 참여자와 올바르게 일치하는지 확인할 것이다. 대상체가 알레르기 반응, 심각한 저혈압 위기 또는 주입에 대한 임의의 다른 반응이 있는 경우 응급 의료 장비(즉, 응급 트롤리)를 주입 중에 사용 가능할 것이다. 중환자실은 연구 투여 현장에서 합리적인 거리 내에 있어야 한다.

[0703] P-BCMA-101 세포는 일반적으로 용량에 따라 대략 3 × $10^5$/mL 내지 2.4 × $10^7$/mL 범위의 농도로 250 mL 주입백에 제공될 것이다. 이것은 용량 및 부피에 대해 적절한 경우 3방향 스톱콕 또는 버터플라이 바늘이 있는 18게이지 라텍스-무함유 Y형 혈액 세트를 통해 분당 대략 1 mL 내지 20 mL의 유량으로 정맥 주입에 의해서 투여되어야 한다. 주입 지속 기간은 부피에 대해 적절한 경우 대략 5 내지 20분이어야 한다. P-BCMA-101 세포는 해동 후 2시간 이내에 주입되고 평가된 최대 안정성은 4시간이다. 추가 상세사항에 대해서는, 또한 문헌[연구 참조 매뉴얼(조제실 및 투여 매뉴얼)]을 참조한다.

[0704] 활력 징후(체온, 호흡률, 맥박, 및 혈압)는 주입 전후에 그 다음 적어도 1시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15분마다 측정될 것이다.

[0705] 빈 백과 남은 세포는 제도적 생물안전 지침에 따라 폐기해야 한다. 미사용 또는 손상 제품/포장의 경우, 의뢰자에게 연락하여 처리 여부를 결정해야 한다.

[0706] 다른 CAR-T 요법으로 수행된 이전 연구에서는 임상시험용 의약품 투여 후 3 내지 7일 이내에 최대 독성이 발생하는 것을 관찰하였다. 연구 대상체는 주입 도중 및 주입 후와 주입 후 대략 7일 동안 면밀히 모니터링될 것이다. 이 관찰 기간에는 모든 대상체에 대한 CRS와 같은 P-BCMA-101-관련 독성의 출현을 포함하여 AE의 일련의 평가가 포함될 것이다.

[0707] 입원하는 경우, 대상체는 연구자에 의해 안정적인 것으로 평가될 때까지 퇴원하지 않을 것이다. 대상체는 림프구제거 화학요법 동안 또는 연구자가 적절하다고 판단하는 경우 상기 기준이 충족된 후 입원 환자로 유지될 수 있다. 정기적인 추적관찰을 위해서 환자는 다시 방문하고, 사건 일정 표에 명시된 대로 안전성, 내약성 및 항골수종 반응에 대한 일련의 평가를 받을 것이다.

[0708] ***6. 병용 의약 및 치료***

[0709] *6.1. 금지된 병용 의약 및 치료*

[0710] 연구 중에는 항암/항골수종 의약을 제공받을 수 없거나 P-BCMA-101 투여 후 또는 백혈구 성분채집술 또는 컨디셔닝 화학요법 개시 시점의 2주 이내 또는 5 반감기(둘 중 더 긴 시간 또는 의료 모니터 승인을 받음) 이내에 항암/항골수종 의약을 제공받은 적이 있음. 구제 치료는 필요하지 않는 한 사용되어서는 안 되지만 연구자가 필요하다고 판단하고 의료 모니터가 승인한 경우 백혈구 성분채집술 및 컨디셔닝 화학요법 사이에 투여될 수 있다. 제외 기준에 설명된 간격은 해당 작용제에 대해 충족되어야 한다.

[0711] 백혈구 성분채집술 개시 시점에 2주 또는 5 반감기(둘 중 더 긴 기간) 이내에 면역억제 의약을 제공받을 수 없고/거나 연구에 등록하는 동안 이를 요구할 것으로 예상되거나, P-BCMA-101 투여(의료 모니터는 잠재적인 면역억제 약물이 허용되는 시기와 여부를 결정할 것임) 후 이를 제공함.

[0712] 필요한 백혈구 성분채집술 2주 이내 또는 P-BCMA-101 투여의 1주 또는 5 반감기(둘 중 더 짧은 기간) 이내에 5 mg/일 이상의 프레드니손 또는 동등한 용량의 또 다른 코르티코스테로이드의 전신 코르티코스테로이드 요법을 제공받을 수 없거나 연구 과정 중에 이것이 필요할 것으로 예상됨(국소 및 흡입 스테로이드는 허용됨). 전신 코르티코스테로이드는 일반적으로 AE 관리, 병용 요법과의 지시된 사용 또는 의료 모니터 승인에 관한 연구 특정 지침 이외의 P-BCMA-101을 제공받은 후 금기일 것이다.

[0713] 의료 모니터 승인 없이는 백혈구 성분채집술 개시 시점으로부터 2주 이내, P-BCMA-101의 계획된 투여 전 5 반감기 이내 또는 P-BCMA-101 투여 후 2개월 이내에 G-CSF 또는 GM-CSF를 제공받을 수 없음.

[0714] 일반적으로, 모든 비필수 의약(보충제, 한약 등 포함)은 인지되지 않은 면역억제 효과의 가능성으로 인해 P-BCMA-101 투여 후 2개월까지 백혈구 성분채집술 2주 전부터 중단되어야 한다.

[0715] *6.2. 허용되는 병용 의약 및 치료*

[0716] 대상체는 연구 기간 전체에서 일시적인 처방 목적을 위해서 방사선 요법 또는 혈장분리교환술 및 교환을 제공받는 것이 허용될 것이다. 연구자가 대상체의 복지에 필요하다고 생각하는 다른 진단 또는 치료는 의료 표준을 준수하고 프로토콜을 준수하여 연구자의 재량에 따라 수행할 수 있다.

[0717] 스크리닝 전 30일 동안 대상체가 복용한 모든 처방 및 비처방 의약, 비타민, 약초 및 영양 보조제를 스크리닝 방문 시 기록할 것이다. 방문 시마다, 병용 의약이 의료 기록 및 적절한 전자 증례기록서(eCRF)에 기록될 것이다. 이러한 의약의 임의의 추가, 삭제 또는 변경은 문서화될 것이다.

[0718] *6.3. 지지 치료 지침*

[0719] P-BCMA-101 주입 전 권장되는 예비 투약은 650 mg 아세트아미노펜 및 25 내지 50 mg 디펜하이드라민 염산염을 포함한다. 이러한 약물은 필요에 따라 6시간마다 제공될 수 있다. 비스테로이드성 항염증제는 아세트아미노펜으로 통제되지 않는 열에 대해 제공할 수 있지만, 출혈 위험 및 신장 기능과 같이 대상체의 내성에 잠재적으로 영향을 미치는 요인과 관련하여 사용을 신중하게 고려해야 한다. 예상치 못한 중증도 또는 지속 기간의 발열 또는 기타 암시적인 증상에 대해서는 패혈증에 대한 정밀검사를 고려해야 한다. 전신 코르티코스테로이드는 T 세포의 생존 및 그에 따른 T 세포-기반 임상시험용 의약품의 효능에 대한 알려진 악영향으로 하기에 설명된 바와 같이 중증 또는 생명을 위협하는 AE에 의해 필요하지 않는 한 투여되어서는 안 된다.

[0720] 연구자는 CRS를 포함하는 CAR-T 세포 요법뿐만 아니라 컨디셔닝 화학요법의 것과 같은 예상되는 사건을 포함하는 AE의 관리에서 적절한 의학적 판단을 사용해야 한다. CRS는 아마도 CAR-T 세포 투여와 관련된 가장 일반적인 AE일 것이며 활성 T-세포에 의해 순환계로 방출되는 사이토카인 및 다중 기관 시스템에 대한 하류 효과를 특징으로 한다. CRS는 또한 치료용 단클론성 항체(mAb), 전신 인터류킨-2(IL-2) 및 이중특이적 CD19-CD3 T-세포 결속 항체인 블리나투모맙의 주입 후에 나타났다. CRS의 발생률 및 중증도는 급성 림프구성 백혈병 환자의 질환 부하와 상관관계가 있는 것으로 보고되어 있다. 임상 및 검사실 측정 범위는 경증 CRS(예를 들어, 전신 증상, 고열)에서 중증 CRS 및/또는 잠재적으로 생명을 위협하는(예를 들어, 고열, 불쾌감, 피로, 근육통, 메스꺼움, 식욕 부진, 빈맥/저혈압, 저산소증, 모세혈관 누출, 혈구 감소증, 심장 기능 장애, 신장 장애, 간부전, 파종성 혈관내 응고)까지 다양하다. 신경학적 변화 및/또는 뇌부종은 심각하거나 치명적인 결과의 가능성과 관련이 있다. CAR-T 세포 요법에서 CRS 관리의 목표는 항종양 효과의 유익을 유지하면서 생명을 위협하는 병태를 예방하는 것이므로, 요법은 일반적으로 CRS의 증상 및/또는 마커에 신중하게 맞춰진다. 예를 들어, 코르티코스테로이드 및 다른 공격적인 면역억제제는 CRS에 효과적인 치료법이지만 종종 CAR-T 세포에 독성이다. 제안된 CRS 관리는 일반적으로 Lee 등(문헌[Lee, 2014]) 및 Brudno 등(문헌[Brudno, 2016])에 따른다. 자세한 독성 관리 권장

사항에 대해서는 연구 참조 매뉴얼(독성 참조 매뉴얼)를 참조한다. 요약: 1등급 CRS의 증상 치료가 제안된다. CRS는 대상체가 수액에 반응하는 저혈압 또는 1 저용량 승압제 또는 저유량 산소(40% FiO2)에 반응하는 경증 호흡기 증상 또는 2등급 기관 독성에 반응하는 경우 2등급으로 정의된다. 저혈압은 중증도 등급의 주요 동인이기 때문에 요법을 시작하기 전에 명확한 기준선 혈압을 설정하는 것이 필수적이다. 2등급 CRS를 갖는 대상체에 대해서 면역억제제(토실리주맙 +/- 코르티코스테로이드)를 개입시키기로 한 결정은, 대상체가 증후군과 관련된 혈행동태의 변화 및 장기 스트레스를 견딜 수 있다고 판단되는 정도에 의해 영향을 받는다. 고령 대상체 및 유의한 동반질환이 있는 대상체의 경우, 임상적 판단에 따라 2등급 CRS를 갖는 대상체의 면역억제를 중재하는 것이 적절할 수 있다. 수액 요법 및 1개의 저용량 승압제로 저혈압을 역전시키기에 충분하지 않은 대상체는 중증 또는 3등급 CRS로 분류된다. 유사하게 저유량을 초과하는 산소가 필요하거나 응고병증, 신장 또는 심장 기능 장애를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 3등급 기관 독성에 대한 증거를 나타낸 대상체는 3등급으로 간주되어야 한다. 3등급 CRS를 갖는 대상체는 가능하게는 1:1 간호를 제공하는 중환자실에서 매우 면밀히 모니터링해야 한다. 중요한 것은, 2등급 이상의 CRS를 갖는 대상체의 경우, 심장 대상부전이 발생할 수 있고, 주의 깊은 모니터링 없이는 쉽게 나타나지 않을 수 있으므로 심장 기능에 주의를 기울여야 한다. 심장 기능 장애의 우려가 있는 대상체에게는 빈번한 심장초음파 모니터링이 필요할 수 있다. 3등급 CRS를 갖는 대상체는 4등급으로의 진행을 예방할 목적으로, 진행 위험 및 비가역적인 기관 기능 장애 가능성 때문에 면역억제제, 예컨대, 토실리주맙 및 코르티코스테로이드(예를 들어, 6시간마다 덱사메타손 IV 10 mg)로 치료해야 한다. 4등급 CRS는 대상체가 기계적 환기 또는 4등급 기관 독성의 필요성을 포함하여 즉각적으로 생명을 위협하는 독성을 경험할 때 발생한다. 4등급 CRS를 갖는 모든 대상체는 염증 캐스케이드를 억제하고, 비가역적인 기관 기능 장애를 예방하기 위한 시도로 토실리주맙(전형적으로 1 내지 2일 동안 매일 8 mg/kg), 코르티코스테로이드(예를 들어, 3일 동안 매일 메틸프레드니솔론 1 g), 리미듀시드(전형적으로 0.4 mg/kg) 및/또는 공격적인 면역억제/세포독성제, 예컨대, 사이클로포스파마이드(예를 들어, 1.5 g/$m^2$)(일반적으로 리미듀시드의 사용은 전신 독성 세포독성제의 사용 보다 우선시될 것임)로 치료될 것이 권장된다. 이러한 옵션은 다른 조치에 반응하지 않는 3등급 독성에 대해서도 고려될 수 있다.

[0721] 지시된 경우, 토실리주맙은 전형적으로 8 mg/kg의 용량으로 1시간에 걸쳐 정맥내 투여되며, 임상적 개선이 24 내지 48시간 내에 발생하지 않는 경우 용량을 반복할 수 있는 옵션이 있다. 토실리주맙에 반응하는 CRS를 갖는 대상체에서 발열 및 저혈압은 종종 몇 시간 내에 해결되며, 그 후 승압제 및 다른 지지 치료 조치를 잠재적으로 신속하게 제거될 수 있다. 그러나 어떤 경우에는 증상이 완전히 해결되지 않을 수 있으며 며칠 동안 지속적인 적극적인 지원이 필요할 수 있다.

[0722] 대상체에서 제어할 수 없는 P-BCMA-101 T 세포 확장 또는 P-BCMA-101과 관련될 수 있는 기타 임상적으로 유의한 3 내지 4등급 독성이 발생하는 경우, 연구자는 임상 시나리오 및 잠재적 교란 인자를 검토하고, 면역억제제 및/또는 세포독성제, 예컨대, 코르티코스테로이드(예를 들어, 3일 동안 매일 메틸프레드니솔론 1 g), 리미듀시드(전형적으로 0.4 mg/kg) 및/또는 공격적인 면역억제/세포독성제, 예컨대, 사이클로포스파마이드(예를 들어, 1.5 g/$m^2$)로의 치료를 고려하는 것이 권장된다.

[0723] ***7. 평가 및 절차 일정***

[0724] ***7.1. 절차 일정***

[0725] 본 연구를 위한 절차 일정은 단일 투여의 대상체에 대해서와 동일할 것이며, 스크리닝부터 컨디셔닝 화학요법을 통한 절차에 대해 표 2에 제공되고 P-BCMA-101 투여로부터 추적관찰까지 절차에 대해 표 3에 제공된다. 주기 투여 코호트에 대한 절차 일정 표는 섹션 15.5에 제공된다. 병용 투여를 위한 절차 일정 표는 섹션 15.6에 제공된다. 사전동의, 스크리닝 및 적격성 확인 후, 모든 대상체는 섹션 5.3에 기재된 바와 같이 백혈구 성분채집술, 컨디셔닝 화학요법 및 P-BCMA-101 투여가 수행될 것이다. 정기적인 추적관찰을 위해서 환자는 다시 방문하고, 각각의 각자의 사건 일정 표에 명시된 대로 안전성, 내약성 및 항골수종 반응에 대한 일련의 평가를 받을 것이다. 치료 후 추적관찰 방문은 10일, 2주, 3주, 4주, 6주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 12개월, 15개월, 18개월, 21개월 및 24개월에 일어날 것이다.

[0726] ***7.2. 임상 평가***

[0727] 연구 전반에 걸쳐 수행될 임상 평가 및 절차는 사건 일정 표에 요약되어 있다. 이 표에 설명되지 않은 평가 시기 윈도우는 연구 참조 매뉴얼에서 찾을 수 있다.

[0728] *7.2.1. 병력*

[0729] 일반적인 병력 및 인구통계는 스크리닝 시 기록될 것이며, 연구에서 AE로 간주될 임의의 기본 증상 또는 의학적 상태도 기록될 것이다. 포함 기준 #4에 설명된 바와 같이 스크리닝 전 6개월 동안 얻어진 MM 평가 결과를 포함하는 MM 질환 이력이 얻어질 것이다. 골수종 반응은 섹션 7.2.10에 설명된 대로 수집될 것이다.

[0730] *7.2.2. 신체 및 신경학적 검사*

[0731] 신경학적 검사를 포함한 완전한 신체 검사는 스크리닝 시에; 컨디셔닝 화학요법 시작 전 72시간 이내; 제-5일, 제0일 P-BCMA-101 투여 전 및 대략 1시간 후; 제1일, 제4일, 제7일, 제10일; 제2주, 제3주, 제4주, 제6주, 제8주 및 제3개월에 시작하여 24개월 동안 3개월마다 수행될 것이다. P-BCMA-101의 투여 후, 신경학적 검사(또는 연구자가 적절하다고 간주하는 임의의 다른 평가)를 포함하는 신체 검사는 관찰된 AE 또는 기관의 표준에 의해 임상적으로 지시된 만큼 자주 그러나 최소 연구 방문당 1회 반복되어야 한다.

[0732] *7.2.3. 활력 징후*

[0733] 혈압, 심박수, 호흡률, O2 포화도 및 체온을 포함하는 활력 징후가 사건 일정 표에 약술된 바와 같이 방문 시 획득될 것이다. 제0일에 활력 징후(체온, 호흡률, 심박수, O2 포화도 및 혈압)는 P-BCMA-101 투여 전 및 대략 1시간 후에, 그 다음 적어도 1시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15분(+/- 5분)마다 측정될 것이다. 스크리닝, 등록 및 백혈구 성분채집술 시에 체중을 기록할 것이다. 신장은 스크리닝 시에만 기록될 것이다.

[0734] *7.2.4. 성능 상태*

[0735] ECOG 성능 상태는 부록 15.1에 기재된 ECOG 수행 척도를 사용하여 스크리닝 시에 그리고 제-5일에 평가될 것이다.

[0736] *7.2.5. 임상 안정성 평가*

[0737] 대상체는 연구 전반에 걸쳐 AE에 대해 평가될 것이다. AE는 NCI CTCAE 버전 4.03 기준에 따라 등급이 매겨질 것이다. AE 및 SAE의 평가 및 보고에 대한 자세한 내용은 섹션 8에 제공된다.

[0738] *7.2.6. 심장 평가*

[0739] 12-리드 심전도(ECG)는 스크리닝 시에, 제0일(P-BCMA-101 투여 전 및 대략 1시간 후), 제1일, 제4일, 제7일, 제4주, 및 제3개월에 시작하여 24개월 동안 3개월 마다 수행될 것이다. 심장초음파는 스크리닝 시만 수행될 것이다.

[0740] *7.2.7. 검사실 평가*

[0741] *7.2.7.1. 임상 화학 및 혈액학*

[0742] 임상 화학 및 혈액학 검사실 평가는 사건 일정 표(화학 패널, B 및 T 세포를 포함하는 혈액학, 응고)에 약술된 바와 같이 수행될 것이다.

[0743] 화학 패널은 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, 락테이트 탈수소효소(LDH), 총 단백질, 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)/혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제(SGOT), 빌리루빈(총 및 직접) 및 알칼리성 포스파타제를 포함할 것이다. 응고 평가는 PTT(부분 트롬보플라스틴 시간) 및 PT(프로트롬빈 시간) 또는 국제 표준화 비율(INR)을 포함할 것이다. 종양 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제1일, 제4일, 제7일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다.

[0744] 제0일에, 화학 패널, B 및 T 세포를 비롯한 혈액학 및 응고 평가는 P-BCMA-101 투여 전 및 투여 후 대략 1시간에 얻어질 수 있어야 한다. P-BCMA-101의 투여 후, 이들 (또는 연구자가 적절하다고 간주하는 임의의 다른 평가)은 관찰된 AE 또는 기관의 표준에 의해 임상적으로 지시된 만큼 자주 그러나 최소 제1일, 제4일, 제7 및 제10일에 1일 1회 및 사건 일정 표에 요약된 바와 같이 반복되어야 한다.

[0745] 혈액학 검사실 평가는 전체 혈구 수치, 혈소판, B(CD19) 및 T(CD3) 세포 수 및 CD4 및 CD8(제-3일 및 제-4일을 제외한 모든 시점에서), 및 순환 골수종/혈장 세포의 평가(예를 들어, 유세포 분석법 또는 수동 감별법을 사용한 CBC)가 P-BCMA-101 투여 전 시점에 필요하다. 등록 및 기준선 샘플에서 순환 골수종/혈장 세포가 식별되는

경우 의뢰자에게 연락하고 제외 기준 #3 및 #10을 참조한다.

[0746] *7.2.7.2. 임신 검사*

[0747] 가임 여성 대상체는 스크리닝 시에 혈청 임신 검사가 음성이고, 림프구제거 화학요법 치료요법을 시작하기 전 72시간 이내에 소변 임신 검사가 음성이어야 한다. 소변 임신 검사는 P-BCMA-101의 각각 투여 전 및 제2주에 시작하는 후속 치료 후 방문에서 수행될 것이다.

[0748] 코호트 R 및 RP의 여성 대상체는 레날리도마이드를 시작하기 전에 2번의 임신 검사 결과가 음성이어야 함. 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 첫 번째 검사는 10 내지 14일 이내에, 두 번째 검사는 대상체가 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 24시간 이내에 수행해야 하며, 첫 번째 달에는 매주, 그 후 월경 주기가 규칙적인 여성의 경우 매월 또는 월경이 불규칙한 여성의 경우 2주마다 수행되어야 한다.

[0749] *7.2.7.3. 감염성 질환 스크리닝*

[0750] 검사실 검사는 HIV 1 및 2 항체, B형 간염 표면 항원, C형 간염 항체 및 HTLV의 존재에 대해서 스크리닝 시에 수행될 것이다.

[0751] *7.2.8. 사이토카인 방출 증후군*

[0752] CRS 마커의 검출을 위한 혈액 샘플: CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ는 사건 일정 표에 제시된 바와 같이 얻어질 것이다.

[0753] *7.2.9. 간이 정신 상태 검사*

[0754] 간이 정신 상태 검사(MMSE)는 사건 일정 표에 제시된 바와 같이 수행될 것이다. MMSE는 모든 시점에서 대상체의 필적 샘플을 포함해야 한다.

[0755] *7.2.10. 질환 반응 평가*

[0756] *7.2.10.1. PET-CT 평가*

[0757] PET-CT 스캔에 의한 질환의 평가는 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 7일 이내에 기준선 방문 시에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 기준선에서 연조직 형질세포종이 발견되어 반응 평가의 일부로 또는 반응을 확인하기 위해 영상화가 필요한 경우 8주마다) 수행될 것이다.

[0758] *7.2.10.2. 반응 및 반응률*

[0759] 골수종 반응의 평가를 위한 검사실 샘플은 스크리닝, 컨디셔닝 화학요법 개시 7일 이내의 기준선 방문, 제0일(P-BCMA-101 투여 전), 제2주, 제3주, 제4주, 제6주, 제8주, 제3개월, 제4개월, 제5개월, 제6개월, 제7개월, 제8개월, 제9개월, 제12개월, 제15개월, 제18개월, 제21개월 및 제24개월에 채취될 것이다.

[0760] 골수종 반응은 각각의 대상체에 대해, 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위한 반응을 입증하는 평가 후 1주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라 그리고 표준 평가, 예컨대, 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역 고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC), PET/CT(양전자 방출 단층 촬영/컴퓨터 단층 촬영, 간 배경) 및/또는 골수 생검/흡인에 기초하여 평가될 것이다. 기준선 골수종 반응 평가는 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 7일 이내에 수행되어야 한다. 신선한 골수 생검 및 흡인은 스크리닝 또는 기준선(전형적으로 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7일 이내) 및 제4주, 제3개월, 제6개월 및 제12개월에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수집되어야 하거나 의료 모니터 면제를 받아야 한다. 반응률은 각각의 최상의 전체 반응 범주의 대상자 수를 연구 집단의 대상체 수로 나눈 값으로 결정된다.

[0761] *7.2.10.3. 반응까지의 시간*

[0762] 반응이 있는 대상체의 경우, 반응까지의 시간은 P-BCMA-101 투여 시간부터 처음으로 문서화된 반응(부분 반응[PR] 이상) 시간까지 평가될 것이다.

[0763] 7.2.10.4. 반응 지속 기간

[0764] 반응이 있는 대상체의 경우, 반응 지속 기간은 처음으로 문서화된 반응 시간(PR 이상)부터 확인된 질환 진행 시간(다른 원인으로 인한 사망은 검열됨)까지 평가될 것이다.

[0765] *7.2.10.5 무진행 생존*

[0766] P-BCMA-101 투여 시점부터 확인된 질환 진행 또는 사망 시점까지의 무진행 생존(PFS)이 모든 대상체에 대해서 평가될 것이다.

[0767] *7.2.10.6 전체 생존*

[0768] P-BCMA-101 투여 시점부터 사망 시점까지의 전체 생존(OS)이 모든 대상체에 대해서 평가될 것이다.

[0769] *7.2.11 장기간 추적관찰*

[0770] 본 연구에서 P-BCMA-101로 치료된 모든 대상체는 본 연구에서 최대 2년 동안 추적될 것이다. 이 프로토콜을 중단한 후, 사전동의한 대상체는 별도의 장기 안전성 추적관찰 프로토콜(P-BCMA-101-002)로 롤오버되고, P-BCMA-101을 마지막으로 투여한 후 총 15년 동안 추적관찰될 것이다.

[0771] *7.3 탐색적 평가*

[0772] *7.3.1. P-BCMA-101 T 세포의 확장 및 지속성*

[0773] P-BCMA-101 T 세포(예를 들어, 벡터 카피/혈액 mL)는 사건 일정 표에 기재된 P-BCMA-101 T 세포에 대해서 혈액 샘플에서 정량될 것이다.

[0774] *7.3.2. P-BCMA-101 T 세포 조성물*

[0775] P-BCMA-101 T 세포(예를 들어, 표현형, 클론성 등)는 사전 일정 표에 기재된 P-BCMA-101 T 세포용 혈액 샘플을 사용하여 제시된 바와 같이 대로 평가될 것이다.

[0776] *7.3.3. 면역 반응의 평가*

[0777] P-BCMA-101에 대한 면역원성을 평가하기 위한 샘플은 사건 일정 표(면역원성 검정을 위한 혈액 샘플)에 제시된 바와 같이 수집될 것이다.

[0778] *7.3.4. 가용성 BCMA 수준*

[0779] 가용성 BCMA는 사건 일정 표(BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플)에 제시된 바와 같이 혈액 샘플에서 측정될 것이다.

[0780] *7.3.5. MM 세포 상에서의 BCMA 발현*

[0781] 보관 또는 신선한 종양 표본(예를 들어, 골수)로부터의 세포는 기준선에서 그리고 사건 일정 표에 제시된 바와 같이 BCMA에 대해 평가될 것이다(중앙 검사실에 대한 보관 종양, 골수 및 종양의 신선한 샘플 및/또는 BCMA 및 기타 바이오마커용 혈액 샘플).

[0782] *7.3.6. BCMA 항원 밀도/발현, 순환 가용성 BCMA 및 임상 반응 간의 관계*

[0783] 가용성 BCMA 및 BCMA 발현 결과는 임상 반응과 상관관계가 있을 것이다.

[0784] *7.3.7. 수여자 B 및 T 세포의 수준*

[0785] 수여자 B 및 T(CD4+ 및 CD8+) 세포의 수준은 사건 일정 표(화학 패널, B 및 T 세포 수를 포함하는 혈액학, 응고)에 제시된 바와 같이 혈액학 샘플에서 정량화될 것이다.

[0786] *8. 이상 반응 기록*

[0787] 시험 책임자는 AE 또는 심각한 이상 반응(SAE)의 정의를 충족하는 사건을 검출, 문서화 및 보고할 책임이 있다. 개별 AE는 연구자가 평가하고 eCRF를 통해 의뢰자에게 보고되어야 한다. 이것은 강도, 임상시험용 의약품 및/또는 병용 요법과 AE 사이의 인과 관계, 심각성 등의 평가를 포함한다.

[0788] *8.1 AE 및 SAE 정보의 수집을 위한 시간 기간*

[0789] 모든 AE 및 SAE는 등록부터 제24개월 방문 또는 프로토콜 철회 중 더 짧은 기간까지 수집될 것이다.

[0790] *8.2 이상 반응의 정의*

[0791] 국제의약품규제조화위원회(ICH: International Conference of Harmonization)에 따르면, AE는 의약품을 제공받는 대상체 또는 임상시험 대상체에게 발생하는 임의의 예상치 못한 의학적 사건이다. 사건은 AE가 되기 위해 반드시 연구 치료제와 인과 관계를 가질 필요는 없다. 따라서 AE는 임상시험용 의약품과 관련된 것으로 간주되는

지 여부에 관계없이 임상시험용 의약품의 사용과 일시적으로 관련된 임의의 바람직하지 않고 의도하지 않은 징후(비정상적인 검사실 결과 포함), 증상 또는 질환일 수 있다. 기존 병태는 연구 중에 악화되는 경우에만 AE로 보고되어야 한다. 연구 중인 암의 진행 및 이의 증상은 연구자가 약물과 관련된 것으로 간주하지 않는 한 AE로 간주되지 않는다. 새로운 비정상적인 검사실 소견은 치료가 필요하거나 연구자가 임상적으로 유의한 것으로 간주하는 경우에만 AE로 간주되어야 한다.

[0792] AE는 진단 또는 가능한 진단을 사용하여 eCRF에 기록되어야 하며, 강도, 인과 관계 및 심각성에 대해 평가되어야 한다. 진단이 없는 경우, 개별 증상 또는 소견이 기록될 수 있으며, eCRF는 추가 정보가 입수 가능해지면 최종 진단을 반영하도록 업데이트된다.

[0793] 모든 AE는 다음이 될 때까지 따라야 한다:

[0794] 기준선으로 해결되거나 개선됨.

[0795] 연구자가 더 이상의 개선을 기대할 수 없음을 확인함.

[0796] 연구 완료 또는 중단 시, AE는 30일 동안 또는 상기 기준 중 하나가 충족될 때까지 추적될 것이다. 진행 중인 AE는 계속해서 기록되고, 장기 추적관찰 연구로 모니터링될 것이다.

[0797] *8.2.1. 강도 평가*

[0798] 이상 반응은 NCI CTCAE 버전 4.03에 따라 등급이 매겨질 것이다. 연구자는 이러한 5점 척도(등급 1 내지 5)를 사용하여 모든 AE의 강도를 평가하고, eCRF에 기록할 것이다. NCI CTCAE에 구체적으로 열거되지 않은 AE는 표 4에 따라 등급을 매겨야 한다.

**표 4: NCI CTCAE 버전 4.03 에 명시되지 않은 AE 의 등급**

| NCI CTCAE 등급 | 하기에 해당 | 정의 |
|---|---|---|
| 1 등급 | 경증 | 불편함이 느껴지지만 정상적인 일상 활동에 지장을 주지는 않음. |
| 2 등급 | 중등도 | 일상 활동을 감소시키거나 영향을 줄 정도의 불편함; 최소한의 의료 개입이 제시됨. |
| 3 등급 | 중증 | 일을 할 수 없거나 정상적인 일상 활동을 수행할 수 없는 무력화; 전반적인 웰빙 또는 증상을 개선하기 위해 치료 또는 의학적 개입이 제시됨; 치료 개시를 지연시키는 것이 대상체의 생존을 직접적인 위험에 빠뜨리는 것은 아님. |
| 4 등급 | 생명을 위협/ 장애 | 긴급한 의료 개입이 필요한 생명에 대한 즉각적인 위협. |
| 5 등급 | 사망 | 사망에 이르는 AE. |

[0799]

[0800] *8.2.2. 인과 관계의 평가*

[0801] 연구자는 그의/그녀의 최선의 임상적 판단에 따라 AE와 임상시험용 의약품(P-BCMA-101 및/또는 투여된 경우 리미듀시드) 사이의 인과 관계를 평가할 것이다. 가능하게는/아마도/확실히 관련된 평가는 인과 관계의 증거가 있음을 전달하기 위한 것이지 관계를 배제할 수 없다는 것이 아니다. 연구자는 평가를 할 때 기저 질환의 자연 경과, 림프구제거 화학요법, 병용 의약 및 기타 위험 인자와 같은 대체 원인을 고려해야 한다. 다음 척도가 지침으로 사용될 것이다:

[0802] 관련 없음 - 대상체는 임상시험용 의약품을 제공받지 않았거나; 임상시험용 의약품의 투여와 관련된 AE 개시의 시간적 순서가 합리적이지 않거나; 또는 AE의 원인일 가능성이 높은 또 다른 것이 존재함.

[0803] 관련성 낮음 - AE가 T-세포 주입과 합리적이고 일시적으로 상관되지 않거나; AE가 다른 원인 또는 원인들에 의해 설명될 가능성이 더 높지만, 사건의 발병 또는 심각도에 대한 T 세포 주입의 이론적 영향은 다중 요인 맥락에서 원격으로 가능함.

[0804] 관련 가능함 - 임상시험용 의약품에 대한 노출 증거가 있고; T 세포 주입에 대한 AE 발병의 시간적 순서가 타당

하고; 임상시험용 의약품이 AE를 유발했다는 합리적인 설명이 존재하고; 임상시험용 의약품이 다른 설명과 마찬가지로 AE를 유발했을 가능성이 동일함.

[0805] 아마도 관련됨 - 임상시험용 의약품에 대한 노출 증거가 있거나; T 세포 주입에 대한 AE 발병의 시간적 순서가 타당하거나; AE가 임상시험용 의약품에 대한 이전 지식과 일치하는 패턴을 나타내거나; AE가 임의의 다른 원인보다 임상시험용 의약품에 의해 설명될 가능성이 높음.

[0806] 확실히 관련됨 - 임상시험용 의약품에 대한 노출 증거가 있거나; T 세포 주입에 대한 AE 발병의 시간적 순서가 타당하거나; AE가 임상시험용 의약품에 대한 이전 지식과 일치하는 패턴을 나타내거나; AE가 임상시험용 의약품에 의해서 설명될 가능성이 가장 크고, 임의의 다른 원인은 개연성이 낮음.

[0807] 연구자는 추가 정보를 수령한 경우 인과 관계에 대한 자신의 의견을 변경하고 이에 따라 AE eCRF를 수정할 수 있다. 연구자 인과 관계 평가는 의뢰자가 SAE에 대한 규제 보고 요건을 결정하기 위해 사용할 기준 중 하나이다.

[0808] ***8.3 중대한 이상 반응(SAE) 보고***

[0809] SAE는 하기의 임의의 AE이다:

[0810] 사망 초래(참조: 사망은 결과로 기록되어야 하며 사망으로 이어지는 시작 사건은 사건으로 기록되어야 함).

[0811] 생명 위협(참조: "생명 위협"이라는 용어는 사건 발생 시점에 대상체가 즉각적인 사망 위험에 처한 사건을 지칭하고; 그것은 더 심했더라면 사망을 초래했을 가능성이 있는 사건은 지칭하지 않음).

[0812] 연구 중인 질환을 포함하여 악화되지 않은 기존 병태와 관련된 선택 또는 진단 절차(예를 들어, 연구 특정 절차 및 입원)를 제외하고, 입원 또는 기존 입원의 연장이 필요함.

[0813] 지속적이거나 심각한 장애 초래.

[0814] 선천적 기형/출생 결함.

[0815] 의학적으로 중요하거나 상기에 열거된 결과 중 하나 또는 결과를 방지하기 위해 개입이 필요함.

[0816] AE가 상기 정의를 벗어나 중증인 것으로 분류될 만큼 충분히 중요한 의학적 중요성을 갖는지 결정하는 데 있어 의학적 및 과학적 판단을 수행해야 한다. 사망을 초래하지 않거나, 생명을 위협하지 않거나, 입원이 필요하지 않을 수 있는 중요한 의학적 사건은 적절한 의학적 판단에 따라 대상체를 위험에 빠뜨릴 수 있고 상기에 열거된 결과 중 하나를 방지하기 위해 의학적 또는 외과적 개입이 필요할 수 있는 경우 중대한 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, 약물 과다 복용 또는 남용, 입원 환자 입원을 초래하지 않은 발작 또는 응급실에서 기관지 경련의 집중 치료는 전형적으로 중대한 것으로 간주된다.

[0817] 연구는 모든 지역 규제 요건을 준수하고 임상 안전성 데이터 관리에 대한 ICH 가이드라인, 신속한 보고에 대한 정의 및 표준, 주제 E2 및 IND에 대한 FDA 안전성 보고 요건, 21 CFR 312.32의 전체 요건을 준수한다.

[0818] ***8.4. 특별 관심 이상 반응(AESI: Adverse Events of Special Interest)***

[0819] AESI는 CAR-T 세포 산물과 관련하여 특별한 관심이 있는 사건이므로 섹션 8.5에 기재된 바와 같은 고유한 보고 요건을 갖는다. P-BCMA-101용 AESI는 현재 다음을 포함한다:

[0820] 1. 원인에 관계없이 P-BCMA-101 주입 후 30일 이내에 발생한 모든 사망.

[0821] 2. 4등급 이상의 의약품 주입 반응.

[0822] 3. 4등급 이상의 사이토카인 방출 증후군.

[0823] 4. 4등급 이상의 신경학적 독성.

[0824] 5. 새로운 악성 종양.

[0825] 6. 기존 신경학적 장애의 새로운 발병 또는 악화.

[0826] 7. 이전 류마티스 또는 기타 자가면역 장애의 새로운 발병 또는 악화.

[0827] 8. 혈액학적 장애의 새로운 발병.

[0828] *8.5. SAE 및 AESI에 대한 규제 보고 요건*

[0829] SAE/AESI는 연구 인력이 사건을 발견한 후 24시간 이내에 완성된 SAE/AESI 보고서 양식을 이메일 또는 팩스로 의뢰자 또는 피지명인에게 보고되어야 한다. SAE/AESI 보고서 양식은 안전성 보고를 위한 주요 데이터 공급원일 것이다. 보고 절차는 연구 참조 매뉴얼에 설명되어 있다. SAE/AESI 보고서 양식 제출 직후 각각의 사건 기간에 대해 Medidata 내 eCRF 항목이 필요할 것이다. 데이터 필드는 SAE/AESI 보고서 양식에 보고된 것과 일치해야 한다.

[0830] *8.6. 임신*

[0831] 항목 기준에 기재된 바와 같이, 대상체는 스크리닝 시점부터 연구 전체에 걸쳐서 피임을 수행해야 한다.

[0832] 코호트 R, RP 또는 RIT의 여성은 치료를 시작하기 4주 전, 치료 중, 용량 중단 중에 그리고 레날리도마이드 중단 후 4주 동안 그리고 리툭시맙의 마지막 투여 후 12개월 동안 지속적으로 성교를 중단하거나 두 가지 신뢰할 수 있는 피임 방법을 사용하기로 약속해야 한다.

[0833] 레날리도마이드는 임신한 여성에게 투여하면 배태자에게 해를 끼칠 수 있으며, 작용 기전 및 결과에 따라 임신 중에는 금기이다. 레날리도마이드는 약물을 제공받고 있는 환자의 정액에 존재한다. 따라서, 코호트 R 또는 RP의 남성은 성공적인 정관절제술을 받았더라도 레날리도마이드를 복용하는 동안 그리고 레날리도마이드 중단 후 최대 4주 동안 가임 여성과 성적 접촉을 하는 동안 항상 라텍스 또는 합성 콘돔을 사용해야 한다. 레날리도마이드를 복용 중인 남성 환자는 정자를 기증해서는 안 된다.

[0834] 임신한 여성에서 P-BCMA-101 또는 리미듀시드의 전임상 또는 임상 시험 데이터가 존재하지 않지만; 이러한 전반적인 치료 요법은 이론적으로 배아독성이 있을 수 있다. 모유에 미치는 영향은 알려져 있지 않으므로 스크리닝 시에 시작하는 연구 기간 동안 그리고 임상시험용 의약품(P-BCMA-101 또는 리미듀시드, 레날리도마이드 또는 리툭시맙)의 마지막 용량을 제공받은 후 적어도 12개월 동안 또는 대상체의 혈액에서 지속성/유전자 변형 세포의 증거가 없는 후 4개월 중 더 긴 기간 동안 모유 수유를 중단해야 한다.

[0835] 임신(또는 남성 대상체의 파트너의 임신)은 임신이 임상시험용 의약품과의 상호작용으로 인한 피임 실패의 결과일 수 있다고 믿을 만한 이유가 없거나 임신 중 부정적인 태아 결과가 없는 한 AE/SAE로 간주되지 않는다. 그러나 연구자는 모든 임신을 의뢰자에게 즉시 보고해야 한다. 연구 중에 임신하여 임신을 유지하는 여성은 연구를 중단하고 LTFU 연구에 참여할 것이다. 임신 결과도 의뢰자에게 보고되어야 한다.

[0836] *9. 안전성 모니터링*

[0837] *9.1. 안전 위원회*

[0838] 연구자 및 의뢰자의 임상 대표자로 구성된 안전 위원회가 설립되고, 모든 대상체 및 각각의 코호트에 따른 데이터를 정기적으로 검토하여 용량 증량을 결정할 것이다. 안전 위원회는 안전성을 추가로 평가하기 위해 코호트의 확장을 권장할 수 있으며, 제1 코호트에서 DLT가 관찰되는 경우, 1상 동안 더 낮은 용량을 탐색하고 2상 동안 안전성, 중단 및 일시 중단 기준을 계속 관리한다.

[0839] *9.2. 투여 일시 중지 또는 연구 중단 기준*

[0840] 연구-정의된 DLT 또는 임의의 치료 관련 사망이 발생하는 경우, 안전 위원회가 만나 사건(들)을 검토하고 향후 계획을 결정할 때까지 새로운 대상체의 투여를 일시 중지하며, 향후 계획은 연구 중단, 후속 용량 수준 감소, 추가 안전 절차 또는 연구 수정안 도입, 계획된 연구 지속 또는 사건에 적절한 다른 조치를 포함할 수 있다. 이미 기재된 바와 같이, 1상 동안 코호트에서 6명의 대상체 중 2명 이상이 DLT를 갖고, 4등급 초과의 발생률이 10% 초과이거나 3등급 초과의 CRS의 발생률이 30% 초과이거나 10명 초과의 환자가 치료되는 2상에서 상응하는 용량 수준 이하에서 신경독성을 갖는 경우, 그 용량 수준은 MTD를 초과하고 더 낮은 용량 수준에서 임의의 추가 투여가 수행될 것이다.

[0841] *10. 통계학 및 데이터 분석*

[0842] 본 연구의 1상 부분은 DLT 발생률이 33% 미만인 용량을 결정하기 위해서 의도된 용량 코호트의 표준 3+3 설계이다.

[0843] 본 연구의 2상은 공개, 단일 용량, 효능 및 안정성 평가이다. 모든 평가변수에 대한 분석의 상세사항은 통계학적 분석 계획(SAP: Statistical Analysis Plan)에 제공될 것이다.

[0844] *10.1. 연구 집단*

[0845] 배정된 대로(ITT: Intent-to-Treat) 집단은 본 연구에 등록된 모든 대상체를 포함할 것이다.

[0846] 안전성 집단은 P-BCMA-101 투여를 제공받은 모든 대상체를 포함할 것이다.

[0847] 프로토콜 순응 집단(Per Protocol population)은 P-BCMA-101의 프로토콜 지정 용량을 제공받는 모든 대상체를 포함할 것이다(예를 들어, 프로토콜 지정 용량보다 적은 용량을 제공받는 환자는 별도의 하위군으로 분석될 것임).

[0848] *10.2. 샘플 크기 및 계산*

[0849] 연구의 1상 부분은 DLT 발생률이 33% 미만인 용량을 결정하기 위해서 의도된 용량 코호트의 표준 3+3 설계이다. 따라서, DLT 평가 기간이 완료되기 전에 중단한 대상체를 대체하기 위해 또는 코호트에서 소견을 추가로 평가하기 위해서 등록될 수 있는 대상체뿐만 아니라 용량 증량, 주기 투여 및 병용 투여 동안 6명의 대상체의 18개 코호트 가능성을 포함하도록 최대 120명의 대상체가 등록될 수 있다.

[0850] 연구 반응률 종점의 2상 부분에 대해, $p<0.05$에서 최근 승인된 치료 표준 작용제인 다라투무맙으로 얻어진 바와 같이 30% 이하의 반응률을 배제하기 위해 반응률 평가변수를 시험할 것이다. 100명의 대상체 샘플을 사용하여, 시험의 2상 부분은 30% 반응률보다 15% 포인트 개선을 검출할 수 있는 90%의 검정력을 가질 것이다. 이 검정력 계산은 단측 유의 수준이 0.05인 이항 비율에 대한 정확 검정에 기초한다.

[0851] *10.3. 통계학적 방법*

[0852] 적절한 기술 통계를 사용하여 인구통계학적 및 기준선 특징, 안전성 및 효능 데이터를 요약할 것이다. 데이터 분석은 용량 코호트뿐만 아니라 적절한 경우 조합된 모든 대상체에 대해 제공될 것이다. 연속 변수에 대해 평균, 중앙값, 표준 편차 및 범위를 포함한 기술 통계가 계산될 것이고, 범주 데이터가 개수치 및 백분율을 사용하여 요약될 것이다. 반응률 평가변수의 경우, 점 추정치 및 양측 정확한 이항 95% 신뢰 구간이 계산될 것이다. 사건까지의 시간 변수는 Kaplan-Meier 방법을 사용하여 요약될 것이다.

[0853] 코호트에 의한 대상체의 개수치 및 백분율을 사용하여 치료-응급 AE(TEAE)를 요약할 것이고, 모든 대상체에 대해서 조합할 것이다. TEAE는 또한 중증도 및 관계별로 요약될 것이다. 병용 의약은 용량 코호트에 의한 대상체의 수치 및 백분율을 사용하여 요약될 것이다.

[0854] 활력 징후, ECG 측정 및 검사실 결과는 코호트에 의해 관찰된 값 및 기준선 값으로부터의 변화에 대한 기술 통계를 사용하여 요약될 것이다. 검사실 결과는 또한 코호트별로 정상 범위(미만, 이내 또는 초과)와 관련하여 요약될 것이다.

[0855] 반응률은 P-BCMA-101 투여 후 각각의 대상체의 최고 반응을 국제 골수종 실무 그룹 통일 반응 기준(부록 15.2)에 따라 해당 기준선 값과 비교하여 결정될 것이다(문헌[Rajkumar, 2011]; 문헌[kumar, 2016]; 문헌[Cavo, 2017]). 전체 반응률(ORR)은 P-BCMA-101을 제공받은 모든 대상체와 비교하여, P-BCMA-101을 제공받고 PR, 매우 양호 부분 반응(VGPR), 완전 반응(CR) 또는 엄격한 완전 반응(sCR)을 달성한 대상체로부터 다음을 갖는 모든 대상체에 걸쳐 결정될 것이다. 각각의 개별 반응 범주에 대한 반응률을 또한 결정할 것이다. 마찬가지로, 제8주에 안정적인 질환(SD) 비율 및 최소 반응(MR)을 또한 결정할 것이다. 반응까지의 시간 및 반응 지속 기간을 반응이 있는 대상체에 대해 결정할 것이다. OS 및 PFS를 또한 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라 모든 대상체에 대해 결정할 것이다.

[0856] 35명의 대상체가 등록하고 P-BCMA-101을 제공받고 4개월 동안 추적관찰되거나 4개월 추적관찰 전에 진행되면 무용성 분석을 수행할 것이다. 이 분석 세트를 무용성 분석 세트(FAS: Futility Analysis Set)라고 불린다. 무용성 분석은 FAS에서 관찰된 BOR의 비율에 기초하여 1- 조건 검정력(CP)과 동일한 무용성 지수(FI)를 사용할 것이다. FI가 0.80를 초과하는 경우(즉, CP가 0.20 미만인 경우) 연구를 중단할 수 있다.

[0857] P-BCMA-101 T 세포의 추가 주입을 제공받는 대상체를 모든 결과에 대해 별도의 하위군으로 분석할 것이다.

[0858] *11. 데이터 취급 및 기록 유지*

[0859] *11.1. 비밀보호*

[0860] 연구 대상체에 대한 정보는 1996년도의 건강 보험 이동성 및 책임법(HIPAA: Health Insurance Portability and Accountability Act) 및 임의의 다른 적용 가능한 법률, 규정 및 지침의 요구 사항에 따라 기밀로 유지되고 관

리된다. 이러한 규정은 다음과 같은 대상체를 알리는 서명된 대상체 승인을 요구한다.

[0861] 이 연구의 대상체로부터 수집할 보호 건강 정보(PHI)는 무엇입니까

[0862] 해당 정보에 접근할 수 있는 사람은 누구이고, 그 이유는 무엇입니까

[0863] 해당 정보를 사용하거나 공개하는 사람은 누구입니까

[0864] PHI 사용 승인을 취소할 수 있는 연구 대상체의 권리

[0865] 대상체가 PHI 수집 또는 사용 권한을 취소하는 경우, 연구자는 규정에 따라 대상체 권한 취소 전에 수집된 모든 정보를 사용할 수 있는 능력을 보유한다. PHI 수집 또는 사용 권한을 취소한 대상체의 경우, 예정된 연구 기간이 끝날 때 적어도 필수 상태(즉, 대상체가 살아 있음)를 수집하기 위한 허가를 얻으려는 시도를 해야 한다.

[0866] ***11.2. 데이터 관리***

[0867] EDC 시스템은 이 시험에 관한 데이터를 수집하는 데 사용될 것이다. 시험 데이터는 eCRF를 통해 취득될 것이다. EDC 시스템 내에서, eCRF 데이터는 현장 직원이 입력하고 모든 근거 문서(source document) 확인 및 데이터 정리는 의뢰자 또는 피지명인(예를 들어, 계약 연구 기관[CRO])이 수행할 것이다.

[0868] EDC 시스템에 대한 사양은 EDC 시스템이 실제 사용을 위해 출시되기 전에 문서화되고 승인될 것이다. eCRF 데이터의 검증은 데이터 관리 계획에서 정의될 것이다. 데이터가 eCRF에 입력되면 유효성 검사가 수행되고 필요한 경우 쿼리가 제기될 것이다. 제기된 모든 쿼리는 EDC 데이터베이스에서 유지될 것이다.

[0869] EDC 시스템은 CFR21 파트 11 요구 사항을 준수하도록 설계된 검증된 소프트웨어 프로그램이다. 모든 사용자는 고유한 사용자 이름 및 암호를 통해 시스템에 접근할 것이다. 시스템 내에서 수행된 모든 작업의 전체 감사 기록이 유지된다. 사용자 계정은 각각의 사용자가 자신의 역할에 해당하는 작업만 수행하고 자신의 역할에 해당하는 데이터에만 접근할 수 있도록 한다.

[0870] 표준 코딩 사전, 세계 보건 기구(WHO) 약물 및 규제 활동을 위한 의료 사전(MedDRA)을 약물, AE 및 병력을 코딩하는 데 사용할 것이다.

[0871] 모든 데이터가 입력되고 모든 데이터 정리가 완료되면 데이터가 잠기고 분석 및 보고에 사용할 수 있게 될 것이다.

[0872] 연구 완료 시, 모든 관련 쿼리 및 감사 이력을 포함한 모든 eCRF 데이터는 CD 또는 USB 드라이브에서 연구 의뢰자 및 현장 모두에 제공될 것이다.

[0873] ***11.3. 근거 문서***

[0874] 근거 데이터는 시험의 재구성 및 평가에 필요한 모든 정보, 임상 결과, 관찰 또는 임상 시험의 기타 활동에 대한 원본 기록이다. 근거 데이터는 근거 문서에 포함되어 있다. 이러한 원본 문서 및 데이터 기록의 예는 하기를 포함한다: 병원 기록, 임상 및 사무실 차트, 검사실 노트, 각서, 대상체의 다이어리 또는 평가 체크리스트, 약국 조제 기록, 자동화 기기에서 기록된 데이터, 정확성이 확인된 후 인증된 사본 또는 필사본 및 완전, 마이크로피시, 포토그래픽 네거티브, 마이크로필름 또는 자기 매체, 엑스레이, 대상체 파일, 약국, 검사실 및 임상 시험과 관련된 의료 기술 부서에 보관된 기록 등.

[0875] 연구자는 eCRF에 대한 정보가 유래된 근거 문서의 가용성을 확인할 필요가 있다.

[0876] 연구자는 의뢰자, 각 국가, 지역 또는 외국 규제 당국, IRB/IEC 및 감사인의 승인된 대리인이 매체 유형에 관계없이 시설을 조사하고 연구자 현장 파일 및 본 연구와 관련된 모든 근거 문서에 직접 접근할 수 있도록 허용해야 한다.

[0877] ***11.4. 증례기록서***

[0878] 등록된 각각의 대상체에 대해 완성된 eCRF는 시험 책임자 또는 권한을 부여받은 대리인이 검토하고 서명해야 한다. 대상체가 연구를 철회하는 경우, eCRF에 그 이유를 기록해야 한다.

[0879] 연구자는 eCRF 및 모든 필수 보고서에서 의뢰자에게 보고된 데이터의 정확성, 완전성, 가독성 및 적시성을 보장해야 한다.

[0880] ***11.5. 기록 보존***

[0881] 연구 필수 문서를 자신의 국가에서 최종 승인된 후 최소 2년 동안 그리고 해당 국가에서 계류 중이거나 고려 중인 마케팅 애플리케이션이 없을 때까지 또는 임상시험용 의약품의 임상 개발의 공식적인 중단 후 적어도 2년이 경과할 때까지 연구 필수 문서를 보관하는 것은 연구자의 책임이다. 이러한 문서는 의뢰자와의 계약에 의해 요구되는 경우 더 오랜 기간 동안 보관해야 한다. 그러한 경우, 이러한 문서를 더 이상 보관할 필요가 없는 시기에 대해 연구자/기관에 알리는 것은 의뢰자의 책임이다.

[0882] *12. 연구 모니터링, 감사 및 검사*

[0883] *12.1. 연구 모니터링 계획*

[0884] 본 연구는 서면 모니터링 계획에 따라 모니터링될 것이다. 연구자는 이러한 모니터링 활동에 적절한 시간을 할당할 것이다. 연구자는 또한 모니터 또는 기타 규정 준수 또는 품질 보증 검토자가 상기에 언급된 모든 연구 관련 문서 및 연구 관련 시설(예를 들어, 약국, 진단 검사실 등)에 대한 접근 권한이 부여되고 모니터링 방문을 수행할 수 있는 충분한 공간이 있는지 확인한다.

[0885] *12.2. 감사 및 검사*

[0886] 연구자는 IRB/IEC, 의뢰자, 정부 규제 기관 및 모든 연구 관련 문서(예를 들어, 근거 문서, 규제 문서, 데이터 수집 도구, 연구 데이터 등)의 대학 준수 및 품질 보증 그룹에 의한 연구 관련 모니터링, 감사 및 검사를 허용할 것이다. 연구자는 해당 연구 관련 시설(예를 들어, 약국, 진단 검사실 등)의 검사 능력을 보장할 것이다. 본 연구에 연구자로 참여한다는 것은 정부 규제 당국과 해당 대학 규정 준수 및 품질 보증 사무소의 잠재적 검사를 수락함을 의미한다.

[0887] *15. 부록*

[0888] *15.1. ECOG 성능 상태*

**표 16. ECOG 성능 상태**

[0889]

| 등급 | ECOG |
|---|---|
| 0 | 완전 활동성, 제한 없이 모든 질환-전 기능을 수행할 수 있음 |
| 1 | 신체적으로 힘든 활동에는 제한이 있지만 걸을 수 있고, 가볍거나 앉아 있는 성격의 작업, 예를 들어, 가벼운 집안일, 사무 작업을 수행할 수 있음 |
| 2 | 걸을 수 있고 모든 자가 관리가 가능하지만 어떠한 작업 활동도 수행할 수 없음. 깨어있는 시간의 약 50% 초과까지 |
| 3 | 깨어있는 시간의 50% 초과 동안 침대 또는 의자에 갇혀 제한적인 자기 관리만 가능 |
| 4 | 완전히 비활동성임. 자기 관리를 수행할 수 없음. 완전히 침대 또는 의자에 갇혀있음 |
| 5 | 사망 |

[0890] *15.2. IMWG 통일 반응 기준*

**표 17. 다발성 골수종에 대한 반응 하위범주에 의한 IMWG 통일 반응 기준(문헌[Kumar, 2016])***

| CR | 엄격한 완전 반응(sCR) | VGPR | PR | 최소 반응(MR) | SD | PD¶¶,‖‖ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 혈청 및 소변의 음성 면역고정 *및* | 정의된 바와 같은 CR, *그리고* | 면역고정으로 검출할 수 있지만 전기영동으로는 검출할 수 없는 혈청 및 소변 M-성분, *또는* | 50% 이상의 혈청 M-p 단백질의 감소 및 24 시간 동안 90% 이상의 소변 M-단백질의 감소 또는 200 mg/24 시간 미만 | 25% 이상 내지 49% 이하의 혈청 M 단백질의 감소 또는 50% 내지 89%만큼의 소변 M-단백질 감소 | CR, VGPR, PR, MR 또는 PD 에 대한 기준을 충족하지 않음 | 다음 중 임의의 것에서 확인된 가장 낮은 반응 값으로부터의 25% 증가: |
| 모든 연조직 형질세포종의 소실, *및* | 정상 FLC 비율** *및* | 90% 이상의 혈청 M-성분 감소 및 소변 M-성분 100 mg/24 h 미만 | 혈청 및 소변 M-단백질을 측정할 수 없는 경우, M-단백질 기준 대신 관련 FLC 수준과 관련되지 않은 FLC 수준의 차이가 50% 이상 감소되는 것이 요구된다. | 상기 기준에 추가하여 기준선에 존재하는 경우 연조직 형질세포종의 크기(SPD)§§가 50% 초과 감소되는 것이 요구된다. | | 최저 M 성분이 5 g/dL 이상인 경우 혈청 M-단백질(절대 증가는 0.5 g/dL 이상이어야 함) 및/또는 혈청 M-단백질증가 1 g/dL 이상 |
| 골수 흡인물에서 5% 미만의 PC | 면역조직화학에 의한 골수 생검에서 클론성 PC 의 부재(100 개 이상의 형질 세포를 계수한 후 각각 κ 및 λ 환자의 경우 κ/λ 비율 ≤4:1 또는 ≥1:2)†† | | 혈청 및 소변 M-단백질을 측정할 수 없고, 무혈청 광 검정도 측정할 수 없는 경우, 기준선 백분율이 30% 이상이면, M-단백질 대신 골수 PC 의 50% 이상 감소되는 것이 요구된다. | | | 소변 M-단백질(절대 증가는 200 mg/24 h 이상이어야 함), *및/또는* |
| | | | 상기 기준에 추가하여 기준선에 존재하는 경우 연조직 형질세포종의 크기(SPD)§§가 50% 초과 감소되는 것이 요구된다. | | | 측정 가능한 혈청 및 소변 M 단백질 수준이 없는 환자에서만: 관련 FLC 수준과 관련되지 않은 FLC 수준의 차이(절대 증가는 10 mg/dL 초과여야 함) |

[0891]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 측정 가능한 혈청 및 소변 M 단백질 수준이 없고 FLC 수준으로 측정 가능한 질환이 없는 환자에서만, 골수 PC 백분율(절대 백분율은 10% 이상이어야 함) |
| | | | | | | 새로운 병변(들)의 출현, SPD§§의 최하점으로부터 1 개 초과의 병변의 50% 이상의 증가, 또는 단축에서 1 cm 초과인 이전 병변의 최장 직경의 50% 이상의 증가; 이것이 질환의 유일한 척도인 경우, 순환 형질 세포의 50% 이상의 증가(μL 당 최소 200 개 세포) |

IMWG=국제 골수종 실무 그룹. MRD=최소 잔존 질환. FLC=유리 경쇄. M-단백질=골수종 단백질. SPD=측정된 병변의 최대 수직 직경의 곱의 합. $SUV_{max}$=최대 표준화 흡수 값. $^{18}$F-FDG PET=$^{18}$F-플루오로데옥시글루코스 PET. *모든 반응 범주는 임의의 새로운 치료를 시작하기 전에 언제든지 2 회 연속 평가를 수행해야 한다. ‖다발성 골수종에 대한 국제 통일 반응 기준에서 유래됨(문헌[Durie et al., Leukemia 2006; 20: 1467-73] 참조). 질환을 측정하는 유일한 방법이 혈청 FLC 수준인 경우: 완전 반응은 이전에 열거된 완전 반응 기준에 추가하여 정상 FLC 비율 0.26 내지 1.65 로 정의할 수 있다. 이러한 환자에서 매우 양호한 부분 반응을 위해서는 관련 FLC 수준과 관련되지 않은 FLC 수준의 차이가 90% 이상 감소해야 한다. 모든 반응 범주는 임의의 새로운 요법을 시행하기 전에 언제든지 두 번의 연속적인 평가가 필요하고; 모든 범주는 또한 방사선 검사를 수행한 경우 진행성 또는 새로운 골 병변 또는 골수외 형질세포종의 알려진 증거가 필요하지 않다. 이러한 반응 요구 사항을 충족하기 위해 방사선 촬영 연구는 필요하지 않다. 골수 평가는 확인할 필요가 없다. 안정적인 질환을 제외한 각각의 범주는 확진 검사를 수행할 때까지 미확정으로 간주된다. 초기 검사 날짜는 반응 기간과 같은 시간 종속 결과를 평가하기 위한 반응 날짜로 간주된다. **혈청 FLC 수준 또는 FLC 비율과 관련된 임상적 사용에 관한 모든 권장 사항은 검증된 Freelite 검사(Binding Site, Birmingham, UK)에서 얻은 결과를 기반으로 한다. ††면역조직화학에서 클론 세포의 존재/부재는 κ/λ/L 비율을 기반으로 한다. 면역조직화학에 의한 비정상적인 κ/λ 비율은 분석을 위해 최소 100 개의 형질 세포가 필요하다. 비정상적인 클론의 존재를 반영하는 비정상적인 비율은 4:1 초과 또는 1:2 미만의 κ/λ 이다.
§§형질세포종 측정은 PET/CT 의 CT 부분, MRI 스캔 또는 해당되는 경우 진용 CT 스캔에서 취해야 한다. 피부 침범만 있는 환자의 경우 피부 병변을 자로 측정해야 한다. 종양 크기의 측정은 SPD 에 의해 결정될 것이다. ¶¶이전에 완전 반응을 달성한 것으로 분류된 환자의 양성 면역고정 단독은 진행으로 간주되지 않을 것이다. 진행까지의 시간 및 무진행 생존을 계산하기 위해, 완전 반응을 달성하고 MRD 음성인 환자는 진행성 질환에 대해 열거된 기준을 사용하여 평가해야 한다. 완전 반응으로부터의 재발 또는 MRD 로부터의 재발에 대한 기준은 무질환 생존을 계산할 때만 사용되어야 한다. ‖‖의사의 재량에 따라 값이 가짜 결과로 느껴지는 경우(예를 들어, 가능한 검사실 오류), 해당 값은 가장 낮은 값을 결정할 때 고려되지 않을 것이다.

[0892]

[0893] **실시예 5 - 리미듀시드 및 P-BCMA-101 병용 치료**

[0894] *15.3. 리미듀시드*

[0895] *15.3.1. 도입부*

[0896] 리미듀시드(일명 AP1903)(또한 문헌[Rimiducid Investigator's Brochure] 참조)는 유도성 카스파제 9(iC9) 안전 스위치 유전자가 형질도입된 세포 요법을 위한 활성화제로서 1상 인간 연구에서 이전에 평가된 임상시험용 소분자 약물이다. 리미듀시드는 세포 내에서 조작된 단백질의 클러스터링을 유도하여 작용하는 이량체 약물로 불리는 화합물 계열의 구성원이다. 리미듀시드-유도성 세포 사멸은 가요성 링커를 통해 인간 델타 카스파제-9에 연결된 인간 FK506-결합 단백질 12(FKBP12) 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 발현함으로써 달성된다. 리미듀시드는 내인성 FKBP와 최소한으로 상호작용하는 조작된 고친화성 버전의 FKBP12에 결합하는 세포 투과성 합성 리간드이다. 이러한 키메라 단백질은 FKBP12 도메인을 교차 연결하고 변형된 카스파제-9 분자의 이량체화를 개시하여 세포 자멸사를 초래하는 리미듀시드의 투여까지 세포 내부에서 정지 상태이다(문헌[Zhou, 2015a]). 리미듀시드의 단일 정맥내 주입은 iC9 유전자를 발현하는 세포에서 세포자멸사 및 궁극적인 세포 사멸을 촉발하지만

형질도입되지 않은 세포에는 영향을 미치지 않으며 그 자체로는 치료 효과가 없다. 리미듀시드의 제안된 사용은 P-BCMA-101과 함께 '구제 요법'으로서, 특정 중증 또는 생명을 위협하는 이상 반응이 대상체에게 발생하는 경우 이러한 선택적 세포 살해가 임상적으로 지시되는 경우이다. P-BCMA-101은 BCMA를 발현하는 골수종 암 세포를 표적으로 하고 이를 제거하도록 유전자 변형된 자가 T 세포로 구성된 독점적인 CAR-T 제품이며, 이러한 T 세포는 iC9-기반 안전 스위치 유전자를 또한 보유한다. 리미듀시드는 0.4 mg/kg의 단일 정맥 투여 용량으로 투여된다. 리미듀시드 약물 제품은 8 mL의 용액(5 mg/mL)에 40 mg의 리미듀시드를 함유하고, 주입 투여 전에 주사용 0.9% 정상 멸균 식염수에 추가로 희석된 주사용 멸균 용액으로 공급된다.

[0897] 리미듀시드를 사용한 비임상 연구는, 리미듀시드 기반 안전 스위치가 형질도입된 1차 인간 T 림프구가 (1) 이의 기능을 유지하고, (2) 고효율, 효력 및 특이성을 가진 리미듀시드에 노출되어 제거될 수 있다는 것을 입증하였다(문헌[Thomis, 2001]). Poseida는 리미듀시드 및 iC9-기반 안전 스위치-함유 CAR-T 세포 제품인 P-BCMA-101을 사용하여 시험관내 및 생체내 연구를 수행하였고, 이는 유사한 결과를 가졌다. 최근 Poseida는 래트에서 GLP 반복 투여 정맥내 독성 연구를 수행하였다. 결과는 반복(3회) 정맥 투여 후 15 mg/kg 초과의 NOAEL을 나타내었다. 리미듀시드의 눈에 띄는 독성 효과는 관찰되지 않았다. (추가 상세사항에 대해서는 문헌[Rimiducid Investigator's Brochure] 참조).

[0898] 리미듀시드는 이전에 건강한 지원자를 포함한 1상 임상 연구에서, 그리고 iC9-기반 안전 스위치 유전자를 보유하는 다른 유전자 변형된 T 세포 제품으로 치료된 이식 환자 이식편대숙주병(GVHD)에 대해 평가되었는데, 이는 P-BCMA-101과 함께 리미듀시드의 임상적 사용 가능성을 뒷받침한다. 지금까지 리미듀시드와 함께 발표된 임상 연구에서, 상당한 이상 반응은 없었고, 활력 징후, ECG, 혈청 생화학, 혈액학, 응고 매개변수 또는 소변검사 결과에서 임상적으로 유의한 변화가 없었다. GVHD가 발병하고 0.4 mg/kg의 리미듀시드를 2시간 주입으로 제공받은 대상체에서, 변형된 T 세포의 90%가 리미듀시드 주입 후 30분 이내에 제거되었으며, 다음 24시간 동안 추가 로그 고갈이 발생하였다. GVHD는 이러한 환자에서 재발 없이 완전히 해결되었다(문헌[Zhou, 2015b]; 문헌[Iuliucci, 2001]; 문헌[Di Stasi, 2011]; 문헌[Kapoor, 2016]; 문헌[Zhou, 2016]).

[0899] 의도된 용도에 대한 리미듀시드의 유해 유익은 매우 유리한 것으로 보인다. 리미듀시드는 유효 용량 범위(0.01 내지 1.0 mg/kg) 내외에서 효과적으로 독성이 없는 일관되고 선형적인 약동학을 갖는 것으로 보인다. 이는 임상적으로 필요한 경우 iC9-기반 안전 스위치 형질도입된 동종이계 T 세포에 의해 유발된 심각한 질환(GVHD)의 제거를 입증하는 임상 데이터 및 iC9-기반 안전 스위치 유전자를 운반하는 자가 CAR-T 세포의 유사한 제거에 대한 기대와 매우 잘 균형을 이룬다.

[0900] *15.3.2. 임상시험 용도*

[0901] 리미듀시드는 섹션 6.3 및 연구 참조 매뉴얼(독성 참조 매뉴얼)에 기재된 바와 같이 P-BCMA-101에 대한 유의미한 부작용을 경험하는 대상체에게 사용될 수 있다. 일반적으로, 4등급 CRS를 갖는 대상체는 다른 표준 조치(예를 들어, 토실리주맙, 스테로이드 및/또는 세포독성/면역억제제)에 추가하여 리미듀시드로 치료할 수 있다(일반적으로, 리미듀시드의 사용은 전신 독성 세포독성제의 사용보다 우선시됨). 이러한 옵션은 다른 조치에 반응하지 않는 3등급 독성에 대해서도 고려될 수 있다. 대상체가 제어할 수 없는 P-BCMA-101 T 세포 확장 또는 P-BCMA-101과 관련이 있을 수 있는 다른 임상적으로 유의한 3 내지 4등급 독성이 발생하는 경우 다른 표준 조치에 추가하여 리미듀시드 사용이 또한 고려될 것이다. 연구자는 투여 전에 임상 시나리오와 잠재적 교란 요인을 검토할 것이 권장된다. 연구 의료 모니터는 시간이 허락하고 리미듀시드 사용 양식이 완성된 경우 상담해야 한다. 미리 정의된 절대적인 포함 또는 제외 기준은 없다.

[0902] *15.3.3. 연구 치료*

[0903] *15.3.3.1. 리미듀시드 투여*

[0904] *15.3.3.1.1. 설명*

[0905] 리미듀시드 약물 제품의 투여 형태는 주사용 멸균 용액이다. 약물 제품은 40 mg의 리미듀시드를 함유하고 정맥 주입에 의한 투여 전에 주사를 위해 0.9% 일반 멸균 식염수에 추가로 희석되도록 의도된다.

[0906] 멸균 리미듀시드 용액 5 mg/mL은 회색 부틸 마개 및 알루미늄 오버시일이 있는 타입 1 유리 10 mL 바이알에 8 ml 충전물로 제공된다. 리미듀시드 주사액 5 mg/mL의 정량적 조성이 표 5에 제공되어 있다.

**표 5: 리미듀시드 약물 제품의 정성적 및 정량적 성분**

| 성분 | 품질 기준 | 기능 | 품질/단위 용량 (mg/바이알) |
|---|---|---|---|
| 리미듀시드 | 인-하우스 | 활성 성분 | 40.0a |
| 폴리옥실 15 하이드로스테아레이트 b | USP | 계면활성제 | 2000 |
| 주사용수 | USP | 희석액 | 8 mL 까지 QS |

a. 실제 양은 약물 물질의 순도에 따라 조정될 것이다.

[0907] b. Kollilphor$^{R}$ HS 15 또는 solutol HS 15 라고도 함.

[0908] ***15.3.3.1.2. 공급 및 보관***

[0909] 약물 의약품은 2 내지 8℃에서 냉장 보관해야 한다. 희석 및 투여 전에, 약물 의약품을 실온에 두고 하기 프로토콜 지침에 따라 투명하고 균질한 용액을 보장하도록 여러 번 뒤집어 혼합해야 한다.

[0910] ***15.3.3.1.3. 제조***

[0911] 1. 0.4 mg/kg의 용량과 5 mg/mL의 리미듀시드 주사 농도를 사용하여 대상체 체중을 기준으로 사용될 리미듀시드 주사의 용량을 계산한다 - 부피(mL) = 0.4 mg/kg × kg 단위의 대상체 체중 /5 mg/mL(예는 표 6에 제시됨). 각각의 바이알은 8 mL의 리미듀시드가 포함되어 있으므로 1개 초과의 바이알이 필요할 수 있다.

[0912] 2. 바이알(들)을 주변 실온으로 가져온다. 각각의 바이알은 사용하기 전에 맑고 균일한 용액이 되도록 뒤집어서 혼합해야 한다. 눈에 보이는 입자나 혼탁함이 있는지 육안으로 확인한다. 멸균 바늘 및 멸균 10 mL B.D. Luer-Lok 주사기를 사용하여 바이알로부터 계산된 양의 리미듀시드를 튜빙이 있는 USP 0.9% 염화나트륨 주사액을 함유한 상업적으로 입수 가능한 100 mL EVA DEHP-무함유 주입 백으로 무균적으로 옮긴다. 뒤집어서 혼합한다.

[0913] 3. 약 50 mL/시간의 주입 속도로 투여한다.

**표 6: 리미듀시드 투여 계산 실시예**

| 대상체 체중 | 투여 부피 - 필요한 리미듀시드(5 mg/mL)의 양 |
|---|---|
| 60 kg | 5 mL |
| 75 kg | 6 mL |
| 100 kg | 8 mL |
| 120 kg | 10 mL |

[0914]

[0915] ***15.3.3.1.4. 투약 및 투여***

[0916] 제시된 경우, 리미듀시드는 약 2시간 정맥내 주입으로 0.4 mg/kg의 용량으로 투여되어야 한다.

[0917] ***15.3.4.*** 병용 약물 및 치료

[0918] 리미듀시드를 사용한 병용 약물 및 치료에 대한 제한 또는 요구 사항은 없다.

[0919] ***15.3.5. 평가 및 절차 일정***

[0920] 리미듀시드를 사용하는 경우에 따라야 할 사건 일정 및 절차를 표 7에 제시한다.

[0921] 섹션 6.3에 기재된 바와 같은 특정 AE의 발생의 경우, 리미듀시드의 사용이 고려되어야 한다. 리미듀시드 사용 양식을 완료하고, 시간이 허락하는 경우 의료 모니터에 의해서 검토되고 승인된다. 리미듀시드에 대한 사전동의는 주요 연구 ICF에 포함될 것이다.

[0922] P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플은 리미듀시드 주입 전, 그 다음 제1시간, 제2시간, 제4시간, 제8시간, 제24시간; 제2일, 제4일, 제7일; 제2주, 제3주, 제4주에, 그리고 리미듀시드 약동학을 위해서 제1시간, 제2시간, 제4시간, 제8시간 및 제24시간에 수집될 것이다. 임상 화학, 혈액학 및 응고 실험실 평가는 제1일, 제2일, 제4일, 제7일 및 제2주, 제3주, 제4주에 수행될 것이다. 방문은 P-BCMA-101 요구 연구 방문과 일치하도록 규정된 허용기간 내에서 조정될 수 있고, P-BCMA-101 평가 일정에 대해 수행된 검사실 평가는 리미듀시드 평가 일정에 대해 중복될 필요가 없다.

[0923] 추적관찰은 P-BCMA-101 사건 일정(표 7)과 일치하게 계속될 것이며, 방문은 제6주, 제8주, 제3개월 및 그 이후 3개월마다 일어난다.

[0924] *15.3.6. 이상 반응 기록*

[0925] 이상 반응을 기록하기 위한 절차는 섹션 8을 참조한다. 이상 반응은 연구 CRF에 기록되고 적절한 경우 리미듀시드에 할당된 속성으로 표시된다.

[0926] *15.4. P-BCMA-101로의 재치료*

[0927] 대상체의 질환이 진행될 때 제조로부터 충분한 P-BCMA-101 세포가 남아 있는 경우, 안전 위원회 승인으로 추가 세포를 용량-제한 독성 평가를 성공적으로 완료한 최고 용량 수준까지 투여할 수 있다. 추가 P-BCMA-101 세포 주입을 제공받기 위해, 대상체에게 새로운 대상체 식별 번호를 지정하고, 그들은 섹션 4에 요약된 바와 같은 모든 적격성 기준을 충족해야 하며, 표 8 및 표 9에 요약된 바와 같은 백혈구 성분채집술을 제외한 동일한 스크리닝, 등록, 컨디셔닝 화학요법 및 추적관찰 절차가 수행될 것이다.

[0928] 15.5. 주기 투여

[0929] 1상 동안 - 주기 투여, P-BCMA-101의 다중 용량이 2주의 2주기(코호트 A 및 코호트 C) 또는 3주기(코호트 B)로 정맥내 투여될 것이다. 투여되는 총 용량은 1상 단일 용량 증량 동안 결정된 바와 같이 MTD 이하에서 시작할 수 있다.

[0930] 코호트 A 및 B 둘 다에 대한 제1 주기에서, 총 용량의 1/3이 투여될 것이다. 코호트 A에서 총 용량의 최대 2/3가 제2 주기에 투여될 것이다. 코호트 B에서 총 용량의 최대 1/3가 총 용량이 제2 및 제3 주기 각각에 투여될 것이다. 코호트 C에서 총 용량의 최대 2/3가 제1 주기에 투여되고, 총 용량의 최대 1/3이 제2 주기에 투여될 것이다. 연구 설계에 대한 개략도가 코호트 A 및 코호트 C에 대해서는 도 16에 그리고 코호트 B에 대해서는 도 17에 도시되어 있다.

[0931] 단일 투여에 대해서 기재된 동일한 3+3 용량 증량 및/또는 감소 규칙을 사용할 것이다. 예를 들어, 단일 투여에 대한 현재 최대 용량이 15 × $10^6$개 P-BCMA-101 세포/kg인 경우, 코호트 A 15 × $10^6$개 P-BCMA-101 세포/kg는 5 × $10^6$개 P-BCMA-101 세포/kg의 주입, 그 다음 2주 동안 최대 10 × $10^6$개 P-BCMA-101 세포/kg의 주입으로 이루어질 것이고, 이러한 코호트 또는 20 × $10^6$개 P-BCMA-101 세포/kg의 단일 투여 코호트의 결과가 증량에 대한 기준을 충족하는 경우, 코호트 A 20 × $10^6$개P-BCMA-101 세포/kg가 개시될 수 있다.

[0932] 코호트 A, B 및 C에 대한 컨디셔닝 화학요법을 통한 스크리닝을 위한 사건 일정을 표 10에 제시한다. 주기 투여를 위하 P-BCMA-101 투여에 대한 사건 일정을 코호트 A 및 코호트 C에 대해서는 표 11에 그리고 코호트 B에 대해서는 표 12에 제시한다. 코호트 A, B 및 C에 대한 치료 후 추적관찰에 대한 사건 일정을 표 13에 제시한다.

[0933]

**표 7: 사건 일정(리미듀시드)**
**(섹션 6.3 및 연구 참조 매뉴얼에 기재된 바와 같은 특정 이상 반응의 경우에만 사용됨)**

| 절차 | 리미듀시드 주입 전 | 리미듀시드 주입 제 0 일 | 제 1 일 | 제 2 일 | 제 4 일 | 제 7 일 | 제 2 주 (± 2 일) | 제 3 주 (± 2 일) | 제 4 주 (± 7 일) | 추적 관찰 [5] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 확인된 AE[1] | X | | | | | | | | | |
| 리미듀시드 사용 양식 완성 | X | | | | | | | | | |
| 의료 모니터에 의해 검토된 리미듀시드 사용 양식 | X | | | | | | | | | |
| 리미듀시드에 대한 대상자 동의 [2] | | X | | | | | | | | |
| 리미듀시드 주입 | | X | | | | | | | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [3,5] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 리미듀시드에 대한 혈액 샘플 3,5 | X | X | X | | | | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [3,4,5] | | | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 리미듀시드 AE[5,6] | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

1. 섹션 6.3 및 연구 참조 매뉴얼(독성 관리 매뉴얼)과 일치하는 AE 확인 및 시간이 허용되는 경우 제 1 리미듀시드 투여 전에 의료 모니터가 검토.
2. 주요 연구 ICF 에 포함될 리미듀시드에 대한 사전동의는 IRB 승인 후 가능한 한 빨리 대상체에 의해서 완료해야 한다.
3. P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플은 리미듀시드 주입 전, 리미듀시드 주입 후 제 1 시간, 제 2 시간, 제 4 시간, 제 8 시간, 제 24 시간, 그 다음 제 2 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주에 수집됨. 리미듀시드 약동학을 위한 혈액 샘플은 리미듀시드 주입 전 및 리미듀시드 주입 후 제 1 시간, 제 2 시간, 제 4 시간, 제 8 시간 및 제 24 시간에 수집됨.
4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치
   - 혈소판
   - B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
5. P-BCMA-101 사건 일정과 일치한 추적관찰을 계속하고; 방문은 제 6 주, 제 8 주, 제 3 개월 및 그 이후 3 개월마다 일어남. 방문이 P-BCMA-101 사건 일정의 방문과 일치하는 경우, 이들은 지정된 방문 허용기간 내에서 반복될 필요가 없다.
6. AE(들)는 연구 eCRF 에 기록되고 적절한 경우 리미듀시드에 할당된 속성으로 표시됨.



공개특허 10-2023-0011295

[0934]

**표 8:** 사건 일정 - 추가 주입: 스크리닝/컨디셔닝 화학요법을 통한 등록

| 절차 | 스크리닝/등록(**P-BCMA-101** 투여 전 **28** 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 **7** 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 **72** 시간 이내)[10] | 컨디셔닝 화학요법 [10] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 일수 | | | | |
| | | | | **-5** | **-4** | **-3** | **-2** | **-1** |
| 대상자 동의 | X | | | | | | | |
| 포함/제외 기준 | X | | | X | | | | |
| 병력 및 질환 평가 [1] | X | | | | | | | |
| ECOG 성능 상태 | X | | | X | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | | X | X | | | | |
| 신장 및 체중 | X | | | | | | | |
| 12-리드 ECG[2] | X | | | | | | | |
| 심장초음파 | X | | | | | | | |
| 중앙 연구소 보관 종양 | X | | | | | | | |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [3, 11] | X | X[3] | | | | | | |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [3, 11] | X[3] | X[3] | | | | | | |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | | |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | | X | X | | | | |
| 활력 징후(BP, HR, RR, $O_2$ 포화, 온도) | X | | X | X | X | X | | |
| 임신 검사 (혈청 또는 소변)[4] | X | | X | | | | | |
| HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝을 위한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [5] | X | | X | | X | X | | |
| 순환 골수종/형질 세포 [5] | X | | X | | | | | |
| 플루다라빈/ 사이클로포스파마이드 | | | | X | X | X | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [6, 11] | X | | | | | | | |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | | |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)[7]: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [7, 11] | X | | | | | | | |
| PET/CT[8] | | X[8] | | | | | | |
| 이상 반응 | X[9] | X | X | X | X | X | | |
| 병용 의약 [9] | X | X | X | X | X | X | | |

[0935]

1. 필요한 등록 전 6 개월 동안의 MM 측정 결과 포함(혈청 단백질 전기영동[SPEP], 뇨단백질 전기영동[UPEP], 혈청면역고정[SIFE], 뇨면역고정[UIFE], 혈청 유리 경쇄[FLC], MRD 및 임상적으로 제시된 바와 같은, PET/CT 및/또는 골수/종양 생검/흡인물[골수 생검], 가능한 경우).
2. 스크리닝/등록 시에서 얻은 12-리드 ECG 및 심장초음파.
3. 골수종 반응은 스크리닝/등록(마지막 달 내의 임의의 결과로부터 얻을 수 있음), 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선(참고: 구제 요법을 비롯한 마지막 골수종 요법 완료와 림프구갈 화학요법의 개시 사이에 2 회 이상의 평가를 수행해야 함), 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함)에 대해서 그리고 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라 임상적으로 지시되고 SPEP, UPEP, SIFE, UIFE 및 혈청 FLC 를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 최소 잔존 질환(MRD)(중앙 검사실에서 분석)는 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 수행한 다음, 임상적으로 지시된 바와 같이 수행하거나 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. 새로운 골수 생검/흡인이 수행되고 스크리닝 중에 제공된 경우 이것은, 기준선 방문 동안 반복할 필요가 없다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.
4. 가임 여성은 등록 시 혈청 임신 검사를 받고 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 72 시간(3 일) 이내에 소변 임신 검사를 받는다.
5. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다.
   혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치
   - 혈소판
   - -3 일, -4 일을 제외한 모든 시점에서 B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
   - P-BCMA-101 투여 전 시점에서 순환 골수종/혈장 세포의 평가(예를 들어, 유세포 분석법 또는 수동 감별법을 사용한 CBC)가 필요하다. 등록 및 기준선 샘플에서 순환 골수종/혈장 세포가 식별되는 경우 의뢰자에게 연락하고 제외 기준 #3 및 #10 을 참조한다.
6. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
7. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
8. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 얻어진 PET/CT.
9. 등록 전 30 일 동안 대상체가 복용한 알레르기 및 모든 처방 및 비처방 의약, 비타민, 약초 및 영양 보조제를 등록 방문 시 기록할 것이다. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다. 불필요한 의약/보충제는 가능한 경우 연구자의 판단에 따라 등록 전에 중단해야 한다.
10. 대상체는 컨디셔닝 화학요법을 시작할 때 등록 기준을 계속 충족하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 다음 평가는 항목 기준을 재평가하기 위해 -5 일의 72 시간 이내에 반복되어야 한다: MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함); 신체검사; 활력 징후; 임신; 및 화학 패널, B 및 T 세포 수치를 포함한 혈액학, 응고.
11. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.

[0936]

**표 9:** 사건 일정 - 추가 주입: **P-BCMA-101** 투여 및 추적관찰

| 절차 | **P-BCMA-101** 투여 [8] | | | | | 제 **0** 일과 비교한 치료 후 추적관찰 방문(방문 허용기간)[8] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 일수 | | | | | **2** 및 **3** 주 (± **2** 일) | **4** 주 (± **7** 일) | **6** 및 **8** 주 (± **7** 일) | **3** 개월 (±**2** 주) | **q3** 개월 (± **2** 주) 내지 **24** 개월 |
| | **0**[7] | **1** | **4** | **7** | **10**[9] | | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| 12-리드 ECG[1] | X | X | X | X | | | X | | X | X |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [2, 11] | X[2] | | | | | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [2, 11] | | | | | | | X | | X | Mo 6, 12 |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | X | X | X | X | X |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 활력 징후(BP, HR, RR, $O^2$ 포화, 온도) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 임신 검사(소변)[3] | | | | | | X | X | X | X | X |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [4] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| P-BCMA-101 세포 주입 (IV) | X | | | | | | | | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [5, 11] | X[5] | | X | X | X | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | X | X | X | X |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [11] | | | | | | X | X | | X | X |
| | | | | | | | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)[6]<br>: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [6, 11] | X | X | X | X | X | X | X | X | Mo 3,4,5 | X |
| PET/CT[12] | | | | | | | | (X[12]) | (X[12]) | (X[12]) |
| 이상 반응 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 병용 의약 [10] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

1. 12-리드 ECG 는 제 0 일, 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 4 주, 제 3 개월 및 그 후 3 개월마다 수행됨.
2. 골수종 반응은 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함), 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주 및 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월, 18 개월, 21 개월 및 24 개월에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위해서 반응을 입증한 평가 후 1 주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라서 그리고 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역 고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC)를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 최소 잔존 질환(MRD)(중앙 검사실에서 분석)은 4 주, 3 개월, 6 개월 및 12 개월에 수행한 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 의료 모니터 면제를 받아야



공개특허 10-2023-0011295

[0937]

한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.

3. 가임 여성은 스크리닝 후 모든 제시된 방문 시에 소변 임신 검사를 받을 것이다.
4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 종양 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
    - 전혈구 수치
    - 혈소판
    - B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
5. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 기준선, 제 0 일(P-BCMA-101 투여 1 시간 후), 제 4 일, 제 7 일, 제 10 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월 및 그 후 3 개월마다. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
6. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
7. 제 0 일에 MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함), 12-리드 ECG, 신체 검사, 화학 패널, 혈액학 및 응고는 P-BCMA-101 투여 전 및 투여 후 대략 1 시간(+/- 15 분)에 얻어질 수 있어야 한다. 활력 징후(체온, 호흡률, 맥박, O2 포화도 및 혈압)는 P-BCMA-101 투여 전후에 그 다음 적어도 1 시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15 분(+/- 5 분)마다 측정될 것이다. 다른 제 0 일 평가 및 샘플은 달리 제시되지 않는 한 P-BCMA-101 투여 전에 얻어야 한다. P-BCMA-101 의 투여 후, 이들 평가(또는 연구자가 임상적으로 제시한 것으로 간주되는 임의의 다른 평가)는 표 9 에 기재된 바와 같이 그리고 관찰된 이상 반응에 의해서 또는 기관 입원환자 표준에 의해서 임상적으로 지시된 만큼 자주 수행될 것이다.
8. 대상체가 P-BCMA-101 투여 후 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 프로토콜 P-BCMA-101-002 에 등록하는 경우, 그 대상체는 프로토콜 P-BCMA-101-001 을 중단한 후에 해당 프로토콜에 사전동의하고 등록되어야 하고, 프로토콜 P-BCMA-101-002 의 제 1 방문에 대한 사건이 수행되고, 이러한 프로토콜에 대한 P-BCMA-101 의 투여와 관련하여 해당 프로토콜에 규정된 일정에 따라 기록된다.
9. 제 10 일 평가는 필요한 경우 제 10 일 후 최대 2 일까지 수행할 수 있지만, 제 2 주차 평가와 같은 날에는 수행할 수 없다.
10. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다.
11. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
12. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 기준선에서 연조직 형질세포종이 발견되어 반응 평가의 일부로 또는 반응을 확인하기 위해 영상화가 필요한 경우 8 주마다) 얻어진 PET/CT.



공개특허 10-2023-0011295

[0938]

**표 10:** 사건 일정 - 컨디셔닝 화학요법을 통한 스크리닝: 주기 투여, 코호트 **A, B** 및 **C**

| 절차 | 스크리닝(백혈구 성분채집술 전 28 일 이내) | 등록 12 (백혈구 성분채집술의 2 주 ± 3 일 전) | 백혈구 성분채집술 [13] | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 7 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 72 시간 이내) | 컨디셔닝 화학요법 11 일수 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 대상자 동의 | X | | | | | | | | | |
| 포함/제외 기준 | X | | | | | X | | | | |
| 병력 및 질환 평가 [1] | X | | | | | | | | | |
| ECOG 성능 상태 | X | | | | | X | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | | | | X | X | | | | |
| 신장 및 체중 [2] | X | X[12] | X | | | | | | | |
| 12-리드 ECG[3] | X | | | | | | | | | |
| 심장초음파 | X | | | | | | | | | |
| 중앙 연구소 보관 종양 | X | | | | | | | | | |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [4, 14] | X | | | X[4] | | | | | | |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [4, 14] | X[4] | | | X[4] | | | | | | |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | | | | X | X | | | | |
| 활력 징후(BP, HR, RR, $O^2$ 포화, 온도) | X | | | | X | X | X | X | | |
| 임신 검사(혈청 또는 소변)[5] | X | | | | X | | | | | |
| HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝을 위한 혈액 샘플 [14] | X | | | | | | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [6] | X | X | | | X | | X | X | | |
| 순환 골수종/형질 세포 [6] | X | X | | | X | | | | | |
| 백혈구 성분채집술 | | | X[13] | | | | | | | |
| 플루다라빈/사이클로포스파마이드 | | | | | | X | X | X | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [7, 14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |



공개특허 10-2023-0011295

[0939]

| 절차 | 스크리닝(백혈구 성분채집술 전 28 일 이내) | 등록 12 (백혈구 성분채집술의 2 주 ± 3 일 전) | 백혈구 성분채집술 [13] | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 7 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 72 시간 이내) | 컨디셔닝 화학요법 11 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 일수 | | | | |
| | | | | | | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)[8]: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [8, 14] | | X[12] | | | | | | | | |
| PET/CT[4, 9] | | | | X[4, 9] | | | | | | |
| 이상 반응 | | X | X | X | X | X | X | X | | |
| 병용 의약 [10] | X[10] | X[12] | X | X | X | X | X | X | | |

1. 필요한 스크리닝 전 6 개월 동안의 MM 측정 결과 포함(가능한 경우, 혈청 단백질 전기영동[SPEP], 뇨단백질 전기영동[UPEP], 혈청면역고정[SIFE], 뇨면역고정[UIFE], 혈청 유리 경쇄[FLC], 최소 잔존 질환[MRD] 및 임상적으로 지시된 바와 같은, PET/CT 및/또는 골수/종양 생검/흡인물[골수 생검]).
2. 스크리닝 방문 시에서만 얻은 신장
3. 스크리닝 시에서 얻은 12-리드 ECG 및 심장초음파.
4. 골수종 반응은 스크리닝(마지막 달 내의 임의의 결과로부터 얻을 수 있음), 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선(참고: 구제 요법을 비롯한 마지막 골수종 요법 완료와 림프구갈 화학요법의 개시 사이에 2 회 이상의 평가를 수행해야 함), 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함)에 대해서 그리고 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라 임상적으로 지시되고 SPEP, UPEP, SIFE, UIFE 및 혈청 FLC 를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 MRD(중앙 검사실에서 분석)는 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 수행한 다음, 임상적으로 지시된 바와 같이 수행하거나 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. 새로운 골수 생검/흡인이 수행되고 스크리닝 중에 제공된 경우 이것은, 기준선 방문 동안 반복할 필요가 없다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.
5. 가임 여성은 스크리닝 시 혈청 임신 검사를 받고 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전 72 시간(3 일) 이내에 소변 임신 검사를 받는다.
6. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다.

   혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치
   - 혈소판
   - -3 일, -4 일을 제외한 모든 시점에서 B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
   - P-BCMA-101 투여 전 시점에서 순환 골수종/혈장 세포의 평가(예를 들어, 유세포 분석법 또는 수동 감별법을 사용한 CBC)가 필요하다. 등록 및 기준선 샘플에서 순환 골수종/혈장 세포가 식별되는 경우 의뢰자에게 연락하고 제외 기준 #3 및 #10 을 참조한다.



공개특허 10-2023-0011295

[0940]

7. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
8. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
9. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 얻어진 PET/CT.
10. 스크리닝 전 30 일 동안 대상체가 복용한 알레르기 및 모든 처방 및 비처방 의약, 비타민, 약초 및 영양 보조제를 스크리닝 방문 시 기록할 것이다. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다. 불필요한 의약/보충제는 가능한 경우 연구자의 판단에 따라 스크리닝 전에 중단해야 한다.
11. 대상체는 컨디셔닝 화학요법을 시작할 때 등록 기준을 계속 충족하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 다음 평가는 항목 기준을 재평가하기 위해 -5 일의 72 시간 이내에 반복되어야 한다: MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함); 신체검사; 활력 징후; 임신; 및 화학 패널, B 및 T 세포 수치를 포함한 혈액학, 응고.
12. 등록 평가는 백혈구 성분채집술의 14 일±3 일 전에 수행하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다.
13. 백혈구 성분채집술은 스크리닝 후 약 28 일 이내에 실시하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 백혈구 성분채집술을 수행하기 위한 지침은 섹션 5.1 및 연구 참조 매뉴얼에서 찾아볼 수 있다(특히 수동 감별법을 사용한 CBC 로의 중간 및 최종 수치, 혈소판, B 및 T 세포(CD4 및 8), 골수종 세포, 유세포 분석법의 특징규명, 기계 성능은 성분채집술 동안 조사 현장 성분채집술 센터에서 수행되며 P-BCMA-101 세포의 분석, 특징규명 및 제조를 위해 성분채집술 센터에서 다른 위치로 성분채집술 제품을 배송하기 전에 보고됨).
14. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.



공개특허 10-2023-0011295

**표 11: 사건 일정 - P-BCMA-101 투여: 주기 투여, 코호트 A 및 코호트 C**

| 절차 | P-BCMA-101 투여 제 1 주기 [8,12] | | | | | P-BCMA-101 투여 제 2 주기 [8,12] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 일수 | | | | | 일수 | | | | |
| | 0[7] | 1 | 4 | 7 | 10[9] | 0[7] | 1 | 4 | 7 | 10[9] |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 12-리드 ECG1 | X | X | X | X | | X | X | X | X | |
| 골수종 반응에 대한 샘플 2, 11 | X2 | | | | | X2 | | | X2 | |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 11 | X | | | | | X | | | | |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 활력 징후(BP, HR, RR, O2 포화, 온도) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 임신 검사 3 | X | | | | | X | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 4 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| P-BCMA-101 세포 주입 (IV) | X | | | | | X | | | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 5, 11 | X5 | | X | X | X | X5 | | X | X | X |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 11 | X | | | | | X | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)6: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 6, 11 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 이상 반응 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 병용 의약 10 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

1. 12-리드 ECG 는 제 0 일, 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 4 주, 제 3 개월 및 그 후 3 개월마다 수행됨.
2. 골수종 반응은 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함), 제 2 주기의 제 7 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주 및 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월, 18 개월, 21 개월 및 24 개월에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위해서 반응을 입증한 평가 후 1 주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라서 그리고 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역 고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC)를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다.
3. 가임 여성은 각각의 투여 주기 전에 소변 임신 검사를 받을 것이다.
4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 종양 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치
   - 혈소판
   - B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
5. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 기준선, 제 0 일(P-BCMA-101 투여 1 시간 후), 제 4 일, 제 7 일, 제 10 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월 및 그 후 3 개월마다. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
6. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
7. 제 0 일에 MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함), 12-리드 ECG, 신체 검사, 화학 패널, 혈액학 및 응고는 P-BCMA-101 투여 전 및 투여 후 대략 1 시간(+/- 15 분)에 얻어질 수 있어야 한다. 혈청 크레아티닌은 2.0 mg/dL 미만이고, 혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제(SGOT)는 정상의 상한의 3× 미만이고, 총 빌리루빈은 2.0 mg/dL 미만이어야 하거나, P-BCMA-101 주입을 진행하려면 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 활력 징후(체온, 호흡률, 맥박, O2 포화도 및 혈압)는 P-

[0941]

BCMA-101 투여 전후에 그 다음 적어도 1 시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15 분(+/- 5 분)마다 측정될 것이다. 다른 제 0 일 평가 및 샘플은 달리 제시되지 않는 한 P-BCMA-101 투여 전에 얻어야 한다. P-BCMA-101 의 투여 후, 이들 평가(또는 연구자가 임상적으로 제시한 것으로 간주되는 임의의 다른 평가)는 표 11 및 표 13 에 기재된 바와 같이 그리고 관찰된 이상 반응에 의해서 또는 기관 표준에 의해서 임상적으로 지시된 만큼 자주 수행될 것이다.

8. 대상체가 제 2 주기 제 10 일 후 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 초기 투여 이후이지만 제 2 주기 제 10 일 후 이 연구를 중단하는 경우, 제 2 주 방문에 대한 평가는 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 프로토콜 P-BCMA-101-002 에 등록하는 경우, 그 대상체는 프로토콜 P-BCMA-101-001 을 중단한 후에 해당 프로토콜에 사전동의하고 등록되어야 하고, 프로토콜 P-BCMA-101-002 의 제 1 방문에 대한 사건이 수행되고, 이러한 프로토콜에 대한 P-BCMA-101 의 투여와 관련하여 해당 프로토콜에 규정된 일정에 따라 기록된다.
9. 제 10 일 평가는 필요한 경우 제 10 일 후 최대 2 일까지 수행할 수 있지만, 다음 제 0 일 또는 제 2 주차 평가와 같은 날에는 수행할 수 없다.
10. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다.
11. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
12. P-BCMA-101 주기 투여는 대상체가 포함되는 코호트에 기초하여 반복될 것이다. 코호트 A 및 코호트 C 대상체는 제 1 용량 동안 제 1 주기(제 0 일 내지 제 10 일) 그리고 제 2 용량 동안 제 2 주기(제 0 일 내지 제 10 일)에 완료될 것이다. 제 2 주기 제 10 일이 완료되면, 대상체는 제 2 주로 이동된다.

[0942]

**표 12: 사건 일정 - P-BCMA-101 투여: 주기 투여, 코호트 B**

| 절차 | P-BCMA-101 투여 제 1 주기 [8,12] | | | | | P-BCMA-101 투여 제 2 주기 [8,12] | | | | | P-BCMA-101 투여 제 3 주기 [8,12] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 일수 | | | | | 일수 | | | | | 일수 | | | | |
| | $0^7$ | 1 | 4 | 7 | $10^9$ | $0^7$ | 1 | 4 | 7 | $10^9$ | $0^7$ | 1 | 4 | 7 | $10^9$ |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 12-리드 ECG1 | X | X | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X | X | |
| 골수종 반응에 대한 샘플 2, 11 | X2 | | | | | X2 | | | X2 | | X2 | | | | |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 11 | X | | | | | X | | | | | X | | | | |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 활력 징후(BP, HR, RR, O2 포화, 온도) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 임신 검사 3 | X | | | | | X | | | | | X | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 4 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| P-BCMA-101 세포 주입 (IV) | X | | | | | X | | | | | X | | | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 5, 11 | X5 | | X | X | X | X5 | | X | X | X | X5 | | X | X | X |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 11 | X | | | | | X | | | | | X | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)6: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 6, 11 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 이상 반응 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 병용 의약 10 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

1. 12-리드 ECG 는 제 0 일, 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 4 주, 제 3 개월 및 그 후 3 개월마다 수행됨.
2. 골수종 반응은 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함), 제 2 주기의 제 7 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주 및 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월, 18 개월, 21 개월 및 24 개월에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위해서 반응을 입증한 평가 후 1 주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라서 그리고 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역 고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC)를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다.
3. 가임 여성은 각각의 투여 주기 전에 소변 임신 검사를 받을 것이다.
4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 종양 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
    - 전혈구 수치
    - 혈소판

[0943]

- B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8

5. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 기준선, 제 0 일(P-BCMA-101 투여 1 시간 후), 제 4 일, 제 7 일, 제 10 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월 및 그 후 3 개월마다. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
6. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
7. 제 0 일에 MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함), 12-리드 ECG, 신체 검사, 화학 패널, 혈액학 및 응고는 P-BCMA-101 투여 전 및 투여 후 대략 1 시간(+/- 15 분)에 얻어질 수 있어야 한다. 혈청 크레아티닌은 2.0 mg/dL 미만이고, 혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제(SGOT)는 정상의 상한의 3× 미만이고, 총 빌리루빈은 2.0 mg/dL 미만이어야 하거나, P-BCMA-101 주입을 진행하려면 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 활력 징후(체온, 호흡률, 맥박, O2 포화도 및 혈압)는 P-BCMA-101 투여 전후에 그 다음 적어도 1 시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15 분(+/- 5 분)마다 측정될 것이다. 다른 제 0 일 평가 및 샘플은 달리 제시되지 않는 한 P-BCMA-101 투여 전에 얻어야 한다. P-BCMA-101 의 투여 후, 이들 평가(또는 연구자가 임상적으로 제시한 것으로 간주되는 임의의 다른 평가)는 표 12 및 표 13 에 기재된 바와 같이 그리고 관찰된 이상 반응에 의해서 또는 기관 표준에 의해서 임상적으로 지시된 만큼 자주 수행될 것이다.
8. 대상체가 제 3 주기 제 10 일 후 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 초기 투여 이후이지만 제 3 주기 제 10 일 후 이 연구를 중단하는 경우, 제 2 주 방문에 대한 평가는 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 프로토콜 P-BCMA-101-002 에 등록하는 경우, 그 대상체는 프로토콜 P-BCMA-101-001 을 중단한 후에 해당 프로토콜에 사전동의하고 등록되어야 하고, 프로토콜 P-BCMA-101-002 의 제 1 방문에 대한 사건이 수행되고, 이러한 프로토콜에 대한 P-BCMA-101 의 투여와 관련하여 해당 프로토콜에 규정된 일정에 따라 기록된다.
9. 제 10 일 평가는 필요한 경우 제 10 일 후 최대 2 일까지 수행할 수 있지만, 제 2 주차 평가와 같은 날에는 수행할 수 없다.
10. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다.
11. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
12. P-BCMA-101 주기 투여는 대상체가 포함되는 코호트에 기초하여 반복될 것이다. 코호트 B 대상체는 제 1 용량 동안 제 1 주기(제 0 일 내지 제 10 일), 제 2 용량 동안 제 2 주기(제 0 일 내지 제 10 일) 그리고 제 3 용량 동안 제 3 주기(제 0 일 내지 제 10 일)에 완료될 것이다. 제 3 주기 제 10 일이 완료되면, 대상체는 제 2 주로 이동된다.

[0944]

**표 13:** 사건 일정 - 치료 후 추적관찰: 주기 투여, 코호트 **A, B** 및 **C**

| 절차 | 마지막 투여 주기 제 **0** 일과 비교한 치료 후 추적관찰 방문(방문 허용기간)[7,11] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **2** 및 **3** 주 (± **2** 일) | **4** 주 (± **7** 일) | **6** 및 **8** 주 (± **7** 일) | **3** 개월 (±**2** 주) | **q3** 개월 (± **2** 주) 내지 **24** 개월 |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | X | X | | X |
| 12-리드 ECG[1] | | X | | X | X |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [2, 9] | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [2, 9] | | X | | X | Mo 6, 12 |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [9] | X | X | X | X | X |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | X | X | X | X |
| 활력 징후(BP, HR, RR, O2 포화, 온도) | X | X | X | X | X |
| 임신 검사(소변)[3] | X | X | X | X | X |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [4] | X | X | X | X | X |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [5, 9] | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [9] | | X | X | X | X |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [9] | X | X | | X | X |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)6: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [6, 9] | X | X | X | Mo 3,4,5 | X |
| PET/CT[10] | | | (X[10]) | (X[10]) | (X[10]) |
| 이상 반응 | X | X | X | X | X |
| 병용 의약 [8] | X | X | X | X | X |

1. 12-리드 ECG 는 제 0 일, 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 4 주, 제 3 개월 및 그 후 3 개월마다 수행됨.
2. 골수종 반응은 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함), 제 2 주기의 제 7 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주 및 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월, 18 개월, 21 개월 및 24 개월에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위해서 반응을 입증한 평가 후 1 주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라서 그리고 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역 고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC)를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 최소 잔존 질환(MRD)(중앙 검사실에서 분석)은 4 주, 3 개월, 6 개월 및 12 개월에 수행한 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.
3. 가임 여성은 스크리닝 후 모든 제시된 방문 시에 소변 임신 검사를 받을 것이다.
4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 종양 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
    - 전혈구 수치
    - 혈소판
    - B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8

[0945]

5. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 기준선, 제 0 일(P-BCMA-101 투여 1 시간 후), 제 4 일, 제 7 일, 제 10 일, 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월 및 그 후 3 개월마다. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
6. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
7. 대상체가 P-BCMA-101 투여 후 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 프로토콜 P-BCMA-101-002 에 등록하는 경우, 그 대상체는 프로토콜 P-BCMA-101-001 을 중단한 후에 해당 프로토콜에 사전동의하고 등록되어야 하고, 프로토콜 P-BCMA-101-002 의 제 1 방문에 대한 사건이 수행되고, 이러한 프로토콜에 대한 P-BCMA-101 의 투여와 관련하여 해당 프로토콜에 규정된 일정에 따라 기록된다.
8. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다.
9. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
10. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 기준선에서 연조직 형질세포종이 발견되어 반응 평가의 일부로 또는 반응을 확인하기 위해 영상화가 필요한 경우 8 주마다) 얻어진 PET/CT.
11. 대상체가 모든 투여 주기를 완료하면(코호트 A 및 코호트 C 의 경우 2 회 및 코호트 B 의 경우 3 회), 이들은 제 2 주 방문으로 계속될 것이다(가장 최근의 제 0 일로부터 14 일).

[0946]

[0947] **실시예 6 - P-BCMA-101 병용 투여**

[0948] **15.6. 1상 - 병용 투여**

[0949] 1상 - 병용 투여에서, P-BCMA-101은 승인된 요법과 조합으로 투여될 것이다.

[0950] 레날리도마이드

[0951] 코호트 R: P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 mg;

[0952] 코호트 RP: 성분채집술 1주 전에 시작하여 7일 동안 및 P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 mg.

[0953] 레날리도마이드를 사용한 투여는 질환이 진행되지 않는 한 코호트 R 및 코호트 RP에 대해 계속될 것이다. 처방 정보는 레날리도마이드 패키지 삽입물을 참조하기 바란다(문헌[Lenalidomide, 2019])(특히 레날리도마이드는 기형 유발 물질로 추정되므로 임신 방지 및 모니터링이 필요함). 다음은 이 프로토콜과 관련된 추가 권장 사항이다. DLT가 보고되지 않고 P-BCMA-101 투여 28일 후 혈소판이 50,000/μL 초과이고 호중구가 1000/μL 초과인 경우 용량을 28일마다 21일 동안 경구로 매일 25 mg으로 증가시킬 수 있다. 이 용량으로 치료된 처음 6명의 환자에서 2 미만의 DLT가 보고된 경우, 안전 위원회의 결정에 따라 모든 환자의 시작 용량을 28일마다 중 21일 동안 경구로 매일 25 mg으로 증가시킬 수 있다. 치료 중 호중구가 1000/μL 미만으로 감소하면 이것이 1000/μL 초과일 때까지 레날리도마이드를 유지한 다음 5 mg 더 낮은 용량으로 다시 시작한다. 치료 중 혈소판이 30,000/μL 미만으로 감소하면 이것이 30,000/μL 초과일 때까지 레날리도마이드를 유지한 다음 5 mg 더 낮은 용량으로 다시 시작한다. 크레아티닌 청소율이 30 내지 60 mL/분인 경우 최대 레날리도마이드 용량은 매일 10 mg이어야 한다. 크레아티닌 청소율이 30 mL/분 미만인 경우 레날리도마이드를 유지한다. 레날리도마이드는 DLT의 경우 중단해야 한다. 본 연구에서 허용되는 최저 용량은 매일 5 mg이다. 연구자 및 안전 위원회는 다른 안전성 결과에 기초한 시간에 레날리도마이드를 중단하기로 결정할 수 있다. 환자는 지시된 바와 같이 항응고제를 병용해야 한다(예를 들어, 매일 아스피린 325 mg 경구 투여). 레날리도마이드와 함께 글루코코르티코이드를 투여해서는 안 된다.

[0954] 리툭시맙

[0955] 코호트 RIT: 정맥내 주입을 통한 375 mg/$m^2$, P-BCMA-101 주입 전 12일 및 5일, 그 다음 질환이 진행되지 않는 한 8주마다. 처방 정보는 리툭시맙 패키지 삽입물을 참조하기 바란다(문헌[rituximab, 2019]). 다음은 이 프로토콜과 관련된 추가 권장 사항이다. 리툭시맙은 발생할 경우 치명적일 수 있는 심각한 주입 관련 반응을 관리하기 위해 적절한 의료 지원과 함께 의료 전문가에 의해서만 투여되어야 한다. 제1 주입: 50 mg/시간의 속도로 주입을 시작한다. 주입 독성이 없는 경우, 주입 속도를 30분마다 50 mg/시간 증분으로 최대 400 mg/시간까지 증가시킨다. 후속 주입: 표준 주입: 100 mg/시간의 속도로 주입을 시작한다. 주입 독성이 없는 경우, 속도를 30분

간격으로 100 mg/시간 증분으로 최대 400 mg/시간까지 증가시킨다. 정맥내 주입으로서만 투여한다. 정맥 푸시 또는 볼러스로 투여하지 않는다. 각각의 주입 30분 전에 완료되도록 아세트아미노펜, 항히스타민제 및 100 mg 정맥 내 메틸프레드니솔론으로의 각각 주입 전에 예비 투약한다. 주입 반응 또는 DLT의 경우 리툭시맙을 중단해야 한다. 연구자 및 안전 위원회는 다른 안전성 결과에 기초하여 언제든지 리툭시맙을 중단하기로 결정할 수 있다. 치료 중 및 치료 후 환자에 대해 주폐포자충 폐렴(PCP) 예방을 고려해야 한다.

[0956] 투여되는 P-BCMA-101의 용량은 용량 증가 동안 결정된 MTD 이하에서 시작하는 3+3 설계를 따라서 증량되거나 감량될 것이다.

[0957] 병용 투여에 대한 컨디셔닝 화학요법을 통한 스크리닝을 위한 사건 일정을 표 14에 제시한다. 병용 투여에 대한 P-BCMA-101 투여 및 추적관찰을 위한 사건 일정을 표 15에 제시한다.

**표 14: 사건 일정 - 컨디셔닝 화학요법을 통한 스크리닝(병용 투여)**

| 절차 | 스크리닝(백혈구 성분채집술 전 28 일 이내) | 등록 [12] (백혈구 성분채집술의 2 주 ± 3 일 전) | 백혈구 성분채집술 [13] | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 7 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 72 시간 이내) | 컨디셔닝 화학요법 [11] 일수 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 대상자 동의 | X | | | | | | | | | |
| 포함/제외 기준 | X | | | | | X | | | | |
| 병력 및 질환 평가 [1] | X | | | | | | | | | |
| ECOG 성능 상태 | X | | | | | X | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | | | | X | X | | | | |
| 신장 및 체중 [2] | X | X[12] | X | | | | | | | |
| 12-리드 ECG[3] | X | | | | | | | | | |
| 심장초음파 | X | | | | | | | | | |
| 중앙 연구소 보관 종양 | X | | | | | | | | | |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [4, 14] | X[4] | | | X[4] | | | | | | |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [4, 14] | X[4] | | | X[4] | | | | | | |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | | | | X | X | | | | |
| 활력 징후(BP, HR, RR, O2 포화, 온도) | X | | | | X | X | X | X | | |
| 임신 검사(혈청 또는 소변)[5] | X | RP | RP | RP/R | X | | | | | |
| HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝을 위한 혈액 샘플 [14] | X | | | | | | | | | |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [6] | X | X | | | X | | X | X | | |
| 순환 골수종/형질 세포 [6] | X | X | | | X | | | | | |
| 백혈구 성분채집술 | | | X[13] | | | | | | | |
| 레날리도마이드 (코호트 RP)[15, 18] | 성분채집술 1 주 전에 시작하여 7 일 동안 및 P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 10 내지 25 mg. | | | | | | | | | |
| 레날리도마이드 (코호트 R)[16, 18] | | | | | P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 내지 25 mg. | | | | | |
| 리툭시맙 (코호트 RIT)[17, 18] | | | | P-BCMA-101 주입 12 일 및 5 일 전에 주입을 통해 375 mg/m$^2$ | | | | | | |

[0958]

| 절차 | 스크리닝(백혈구 성분채집술 전 28 일 이내) | 등록 [12] (백혈구 성분채집술의 2 주 ± 3 일 전) | 백혈구 성분채집술 [13] | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 7 일 이내) | 기준선 (컨디셔닝 화학요법 전 72 시간 이내) | 컨디셔닝 화학요법 [11] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 일수 | | | | |
| | | | | | | -5 | -4 | -3 | -2 | -1 |
| 플루다라빈/사이클로포스파마이드 | | | | | | X | X | X | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [7, 14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [14] | | X[12] | | | | | | | | |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)[8]: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [8, 14] | | X[12] | | | | | | | | |
| PET/CT[4, 9] | | | | X4, 9 | | | | | | |
| 이상 반응 | | X | X | X | X | X | X | X | | |
| 병용 의약 [10] | X[10] | X[12] | X | X | X | X | X | X | | |

1. 필요한 스크리닝 전 6 개월 동안의 MM 측정 결과 포함(가능한 경우, 혈청 단백질 전기영동[SPEP], 뇨단백질 전기영동[UPEP], 혈청면역고정[SIFE], 뇨면역고정[UIFE], 혈청 유리 경쇄[FLC], 최소 잔존 질환[MRD] 및 임상적으로 지시된 바와 같은, PET/CT 및/또는 골수/종양 생검/흡인물[골수 생검]).
2. 스크리닝 방문 시에서만 얻은 신장
3. 스크리닝 시에서 얻은 12-리드 ECG 및 심장초음파.
4. 골수종 반응은 스크리닝(마지막 달 내의 임의의 결과로부터 얻을 수 있음), 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선(참고: 구제 요법을 비롯한 마지막 골수종 요법 완료와 림프구갈 화학요법의 개시 사이에 2 회 이상의 평가를 수행해야 함), 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함)에 대해서 그리고 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라 임상적으로 지시되고 SPEP, UPEP, SIFE, UIFE 및 혈청 FLC 를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 MRD(중앙 검사실에서 분석)는 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 수행한 다음, 임상적으로 지시된 바와 같이 수행하거나 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. 새로운 골수 생검/흡인이 수행되고 스크리닝 중에 제공된 경우 이것은, 기준선 방문 동안 반복할 필요가 없다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.
5. R 코호트 및 RP 코호트의 모든 여성 대상체: 요법을 시작하기 전에 2 번의 임신 검사에서 음성이어야 한다. 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 첫 번째 검사는 10 내지 14 일 이내에, 두 번째 검사는 대상체가 레날리도마이드를 처방받기 전 24 시간 이내에 수행해야 하며, 첫 번째 달에는 매주, 그 후 월경 주기가 규칙적인 여성의 경우 매월 또는 월경이 불규칙한 여성의 경우 2 주마다 수행되어야 한다.
6. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다.
   혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
   - 전혈구 수치(CBC)

[0959]

- 혈소판
- -3 일, -4 일을 제외한 모든 시점에서 B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
- P-BCMA-101 투여 전 시점에서 순환 골수종/혈장 세포의 평가(예를 들어, 유세포 분석법 또는 수동 감별법을 사용한 CBC)가 필요하다. 등록 및 기준선 샘플에서 순환 골수종/혈장 세포가 식별되는 경우 의뢰자에게 연락하고 제외 기준 #3 및 #10 을 참조한다.

7. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
8. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
9. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 얻어진 PET/CT.
10. 스크리닝 전 30 일 동안 대상체가 복용한 알레르기 및 모든 처방 및 비처방 의약, 비타민, 약초 및 영양 보조제를 스크리닝 방문 시 기록할 것이다. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다. 불필요한 의약/보충제는 가능한 경우 연구자의 판단에 따라 스크리닝 전에 중단해야 한다.
11. 대상체는 컨디셔닝 화학요법을 시작할 때 등록 기준을 계속 충족하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 다음 평가는 항목 기준을 재평가하기 위해 -5 일의 72 시간 이내에 반복되어야 한다: MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함); 신체검사; 활력 징후; 임신; 및 화학 패널, B 및 T 세포 수치를 포함한 혈액학, 응고.
12. 등록 평가는 백혈구 성분채집술의 14 일±3 일 전에 수행하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다.
13. 백혈구 성분채집술은 스크리닝 후 약 28 일 이내에 실시하거나 의료 모니터 승인을 받아야 한다. 백혈구 성분채집술을 수행하기 위한 지침은 섹션 5.1 및 연구 참조 매뉴얼에서 찾아볼 수 있다(특히 수동 감별법을 사용한 CBC 로의 중간 및 최종 수치, 혈소판, B 및 T 세포(CD4 및 8), 골수종 세포, 유세포 분석법의 특징규명, 기계 성능은 성분채집술 동안 조사 현장 성분채집술 센터에서 수행되며 P-BCMA-101 세포의 분석, 특징규명 및 제조를 위해 성분채집술 센터에서 다른 위치로 성분채집술 제품을 배송하기 전에 보고됨).
14. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
15. 코호트 R 의 레날리도마이드: P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 10 내지 25 mg.
16. 코호트 RP 의 레날리도마이드; 성분채집술 전 7 일 동안 매일 경구로 10 mg, 그 다음 P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 10 내지 25 mg.
17. 코호트 RIT 의 리툭시맙: P-BCMA-101 주입 12 일 및 5 일 전에 주입을 통해 375 mg/m2, 그 다음 8 주마다
18. 코호트 R, 코호트 RP 및 코호트 RIT 의 대상체의 경우, 병용 요법은 해당 날짜에 화학요법을 컨디셔닝하기 전에 투여되어야 한다.

[0960]

[0961]

**표 15:** 사건 일정 - **P-BCMA-101** 투여 및 추적관찰(병용 투여)

| 절차 | **P-BCMA-101** 투여 [8] | | | | | 제 **0** 일과 비교한 치료 후 추적관찰 방문(방문 허용기간)[8] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 일수 | | | | | **2** 및 **3** 주 (± **2** 일) | **4** 주 (± **7** 일) | **6** 및 **8** 주 (± **7** 일) | **3** 개월 (±**2** 주) | **q3** 개월 (± **2** 주) 내지 **24** 개월 |
| | **0**[7] | **1** | **4** | **7** | **10**[9] | | | | | |
| 간이 정신 상태 검사(MMSE) | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| 12-리드 ECG[1] | X | X | X | X | | | X | | X | X |
| 골수종 반응에 대한 샘플 [2, 11] | X[2] | | | | | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 골수 및 종양의 신선한 샘플 [2, 11] | | | | | | | X | | X | Mo 6, 12 |
| BCMA 및 다른 바이오마커에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | X | X | X | X | X |
| 신체 검사(신경학적 검사 포함) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 활력 징후(BP, HR, RR, O2 포화, 온도) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 임신 검사(소변)[3] | R/RP | | | R/RP | | X | X | X | X | X |
| 화학 패널, B 및 T 세포 수치, 응고를 비롯한 혈액학 [4] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| P-BCMA-101 세포 주입 (IV) | X | | | | | | | | | |
| P-BCMA-101 T 세포에 대한 혈액 샘플 [5, 11] | X[5] | | X | X | X | X | X | X | Mo 3,4,5 | +Mo 6, 7, 8, 9 |
| 혈청 IgG 에 대한 혈액 샘플 [11] | X | | | | | | X | X | X | X |
| 면역원성 검정을 위한 혈액 샘플 [11] | | | | | | X | X | | X | X |
| 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)6: 예를 들어, CRP, 페리틴, 사이토카인 IL-6, IL-2, IL-15, TNF-α 및 IFN-γ 에 대한 혈액 샘플 [6, 11] | X | X | X | X | X | X | X | X | Mo 3,4,5 | X |
| PET/CT[12] | | | | | | | | (X[12]) | (X[12]) | (X[12]) |
| 이상 반응 | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 병용 의약 [10] | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 레날리도마이드 (코호트 RP)[13] | P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 내지 25 mg. | | | | | | | | | |
| 레날리도마이드 (코호트 R)[14] | P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 내지 25 mg. | | | | | | | | | |
| 리툭시맙 (코호트 RIT)[15] | 주입을 통한 375 mg/m$^2$, P-BCMA-101 주입 전 12 일 및 5 일, 그 다음 질환이 진행되지 않는 한 8 주마다 | | | | | | | | | |

1. 12-리드 ECG 는 제 0 일, 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일, 제 4 주, 제 3 개월 및 그 후 3 개월마다 수행됨.
2. 골수종 반응은 제 0 일(P-BCMA-101 투여 전 - 따라서 24 시간 소변 수집은 제-1 일에 시작하여 P-BCMA-101 투여 전에 완료되도록 함), 제 2 주, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주 및 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 12 개월, 15 개월, 18 개월, 21 개월 및 24 개월에 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 확인을 위해서 반응을 입증한 평가 후 1 주 이하) 국제 골수종 실무 그룹 기준에 따라서 그리고 혈청 단백질 전기영동(SPEP), 소변 단백질 전기영동(UPEP), 혈청 면역고정(SIFE), 소변 면역고정(UIFE) 및 혈청 유리 경쇄(FLC)를 포함한 표준 평가를 기반으로 하여 평가될 것이다. 골수 생검, 흡인 및 최소 잔존 질환(MRD)(중앙 검사실에서 분석)은 4 주, 3 개월, 6 개월 및 12 개월에 수행한 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 의료 모니터 면제를 받아야 한다. MRD, 형질 세포 빈도, P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커의 평가를 위해 골수 흡인물 샘플 및 골수 생검 샘플을 (연구 참조 매뉴얼에 설명된 바와 같이) 제출해야 한다. P-BCMA-101 세포, BCMA 및 다른 바이오마커 평가를 위해 골수외 생검의 일부도 제출해야 한다. PET/CT 는 임상적으로 지시된 바와 같이 수행되어야 한다.



공개특허 10-2023-0011295

3. 가임 여성은 스크리닝 후 모든 제시된 방문 시에 소변 임신 검사를 받을 것이다. R 코호트 및 RP 코호트의 모든 여성 대상체: 요법을 시작하기 전에 2 번의 임신 검사에서 음성이어야 한다. 레날리도마이드 요법을 시작하기 전 첫 번째 검사는 10 내지 14 일 이내에, 두 번째 검사는 대상체가 레날리도마이드를 처방받기 전 24 시간 이내에 수행해야 하며, 첫 번째 댑에는 매주, 그 후 월경 주기가 규칙적인 여성의 경우 매월 또는 월경이 불규칙한 여성의 경우 2 주마다 수행되어야 한다.
4. 혈액 화학 검사는 나트륨, 칼륨, 염화물, 마그네슘, 중탄산염, 혈액 요소 질소, 크레아티닌, 칼슘, 알부민, 포도당, LDH, 총 단백질, ALT, AST, 빌리루빈(총 및 직접), 알칼리성 포스파타제, PTT 및 PT 또는 INR 을 포함한다. 중앙 용해(요산 및 인산염)에 대한 평가는 기준선 및 제 1 일, 제 4 일, 제 7 일에 그 다음 임상적으로 지시된 바와 같이 수행될 것이다. 혈액학적 연구는 다음을 포함한다:
    - 전혈구 수치
        - 혈소판
        - B(CD19) 및 T 세포 수치(CD3) 및 CD4 및 CD8
5. P-BCMA-101 세포를 평가할 것이다; 예를 들어, 등록 시 벡터 카피 수/P-BCMA-101 세포의 혈액 mL, 표면 마커 표현형, 클론성 등. 기준선, 제 0 일(P-BCMA-101 투여 1 시간 후), 제 4 일, 제 7 일, 제 10 일, 제 3 주, 제 4 주, 제 6 주, 제 8 주, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월 및 그 후 3 개월마다. 각각의 시점에서 샘플에 대해 수행된 세포 특징규명 및 표현형 평가는 각각의 검정의 시간적 관련성에 따라 달라질 것이다.
6. CRS 는 Lee 기준(문헌[Lee, 2014])을 사용하여 등급 매겨질 것이다.
7. 제 0 일에 MMSE(대상체에 의한 필적 샘플을 포함해야 함), 12-리드 ECG, 신체 검사, 화학 패널, 혈액학 및 응고는 P-BCMA-101 투여 전 및 투여 후 대략 1 시간(+/- 15 분)에 얻어질 수 있어야 한다. 활력 징후(체온, 호흡률, 맥박, O2 포화도 및 혈압)는 P-BCMA-101 투여 전후에 그 다음 적어도 1 시간 동안 그리고 이러한 징후가 만족스럽고 안정적일 때까지 15 분(+/- 5 분)마다 측정될 것이다. 다른 제 0 일 평가 및 샘플은 달리 제시되지 않는 한 P-BCMA-101 투여 전에 얻어야 한다. P-BCMA-101 의 투여 후, 이들 평가(또는 연구자가 임상적으로 제시한 것으로 간주되는 임의의 다른 평가)는 표 3 에 기재된 바와 같이 그리고 관찰된 이상 반응에 의해서 또는 기관 표준에 의해서 임상적으로 지시된 만큼 자주 수행될 것이다.
8. 대상체가 P-BCMA-101 투여 후 이 연구를 중단하는 경우, 예정된 다음 방문에 대한 사건은 대체 의료, 방사선 또는 외과 개입을 시작하기 전에 수행되어야 하며 이 연구의 연구 종료 방문으로 기록되어야 한다. 대상체가 프로토콜 P-BCMA-101-002 에 등록하는 경우, 그 대상체는 프로토콜 P-BCMA-101-001 을 중단한 후에 해당 프로토콜에 사전동의하고 등록되어야 하고, 프로토콜 P-BCMA-101-002 의 제 1 방문에 대한 사건이 수행되고, 이러한 프로토콜에 대한 P-BCMA-101 의 투여와 관련하여 해당 프로토콜에 규정된 일정에 따라 기록된다.
9. 제 10 일 평가는 필요한 경우 제 10 일 후 최대 2 일까지 수행할 수 있지만, 제 2 주차 평가와 같은 날에는 수행할 수 없다.
10. 모든 의약, 보충제 및 알레르기(임의의 현재 증상의 중증도 포함)는 각각의 방문 시에 기록되어야 한다.
11. "~용/의 샘플" 또는 "~용 혈액 샘플"이라는 라벨이 있는 검사실 연구는 중앙 검사실로 보내지는 반면, 그러 한 라벨이 없는 것은 조사 현장에서 일반적으로 수행된다. P-BCMA-101-001 A3 의 승인(개정 3) 이전에 등록된 대상체는 골수종 반응; HIV, B 형 및 C 형 간염 및 HTLV 스크리닝; 혈청 IgG; 및 조사 현장에서 수행된 사이토카인 방출 증후군 마커(CRS)에 대한 평가를 계속 받을 것이다.
12. 컨디셔닝 화학요법을 시작한 후 7 일 이내에 기준선에서 그리고 임상적으로 지시된 바와 같이(예를 들어, 기준선에서 연조직 형질세포종이 발견되어 반응 평가의 일부로 또는 반응을 확인하기 위해 영상화가 필요한 경우 8 주마다) 얻어진 PET/CT.
13. 코호트 R 의 레날리도마이드; P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 10 내지 25 mg.
14. 코호트 RP 의 레날리도마이드; 성분제집술 전 7 일 동안 매일 경구로 10 mg, 그 다음 P-BCMA-101 주입 1 주 전에 시작하여 28 일마다 21 일 동안 매일 경구로 10 내지 25 mg.
15. 코호트 RIT 의 리툭시맙; P-BCMA-101 주입 12 일 및 5 일 전에 주입을 통해 375 mg/m2, 그 다음 8 주마다

[0962]

[0963] **실시예 7 - P-BCMA 101로 치료된 다발성 골수종 환자의 항-약물 항체 반응 및 약동학적 평가**

[0964] P-BCMA-101을 골수종 환자에게 도 18에 도시된 일정에 따라 단독으로 또는 리툭시맙과 조합으로 투여하였다. P-BCMA-101을 제0일에 투여하였다. 리툭시맙을 P-BCMA-101 투여 12일 및 5일 전에 투여한 후, 골수종이 진행될 때까지 8주마다 투여하였다. P-BCMA-101의 약동학은 qPCR을 사용하여 시간 경과에 따라 말초 혈액에서 순환하는 P-BCMA-101/μg DNA의 카피를 측정하여 평가하였다. 말초 혈액에서 P-BCMA-101에 대한 항-약물 항체(ADA) 반응을 중간 규모 발견(MSD) 검정을 사용하여 시간 경과에 따라 평가하였다. 리툭시맙이 없는 환자 102-006(도 19a)에서, P-BCMA-101에 대한 항체 반응이 보이고, P-BCMA-101은 골수종의 단기 반응을 동반한 짧은 기간 동안 말초 혈액에서 지속된다. 리툭시맙을 투여한 환자 113-003(도 19b)에서, P-BCMA-101에 대한 항체 반응이 보이지 않고, P-BCMA-101은 골수종의 긴 반응을 동반하여, 높은 수준으로 장기간 동안 말초 혈액에서 지속된다(마지막 평가 시점까지 연장). 최대 P-BCMA-101 카피/ug DNA는 두 환자(리툭시맙 유무에 관계없이) 모두에 대해 약 30일인 반면, P-BCMA-101 카피/ug DNA는 리툭시맙 없이 치료받은 환자에서 약 130일에 기준선으로 떨어지는 반면,

P-BCMA-101 카피/ug DNA는 리툭시맙으로 치료된 환자에서 190일 동안 지속된다. 또한, 리툭시맙이 없는 환자에서, 임상적 예후는 P-BCMA-101 카피/ug DNA가 감소함에 따라 안정적인 질환에서 최소 반응으로 변화되고, 또한 ADA 양성 반응을 갖는다. 이에 비해서, 리툭시맙을 사용한 환자에서, 임상 예후는 P-BCMA-101 카피/ug DNA가 지속되고 ADA 음성 반응을 갖기 때문에 안정적인 질환에서 부분 반응 범주로 변화된다.

[0965] 총 9명의 환자를 P-BCMA-101과 리툭시맙의 조합물로 치료하였고, 치료에 대한 그들의 반응을 다음과 같이 주석을 달았다: 엄격한 완전 반응(sCR); 완전 반응(CR); 매우 우수한 부분 반응(VGPR); 부분 반응(PR); 또는 최소 반응(MR).

[0966] **참조에 의한 포함**

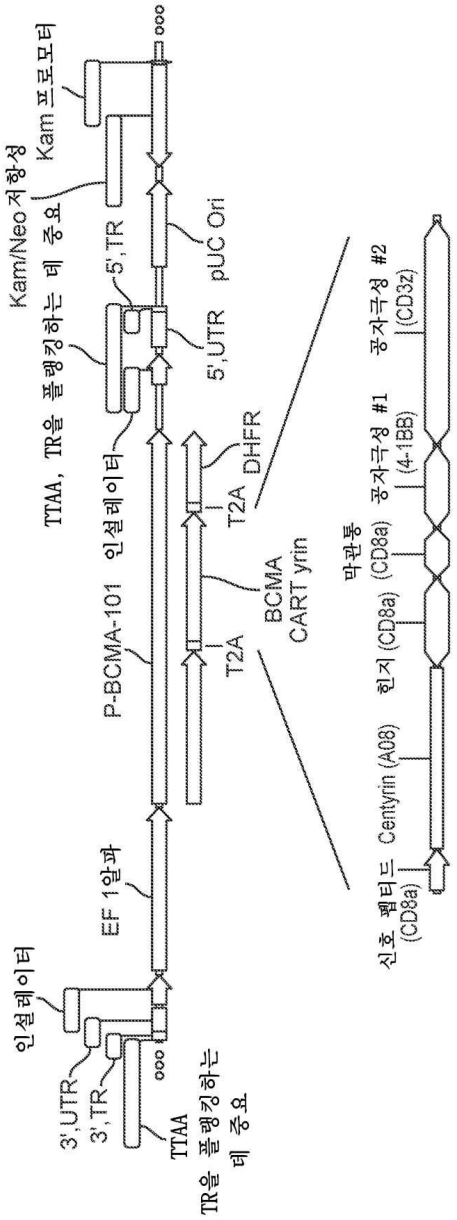
[0967] 임의의 상호 참조되거나 관련 특허 또는 출원을 포함하여 본원에 인용된 모든 문서는 명시적으로 제외되거나 달리 제한되지 않는 한 전체적으로 참조에 의해 본원에 포함된다. 임의의 문서의 인용은, 그것이 본원에 개시되거나 청구된 발명에 대한 종래 기술이거나, 단독으로 또는 임의의 다른 참고 문헌 또는 참고 문헌들과 임의로 조합되어 임의의 이러한 발명을 교시하거나, 시사하거나, 개시한다는 것을 인정하는 것이 아니다. 또한, 본 문서의 용어의 임의의 의미 또는 정의가 참조에 의해 포함된 문서에 있는 동일한 용어의 임의의 의미 또는 정의와 충돌하는 경우 본 문서에서 해당 용어에 할당된 의미 또는 정의가 우선한다.

[0968] **다른 실시형태**

[0969] 본 개시내용의 특정 실시형태가 예시되고 기재되었지만, 본 개시내용의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 다른 변경 및 수정이 행해질 수 있다. 첨부된 청구 범위의 영역은 본 개시내용의 범위 내에 있는 그러한 모든 변경 및 수정을 포함한다.

도면

도면1


인설레이터
3',UTR
3',TR
TTAA
TR을 플랭킹하는 데 중요
EF 1알파
P-BCMA-101
인설레이터
TTAA, TR을 플랭킹하는 데 중요
Kam/Neo 저항성
Kam 프로모터
5',TR
pUC Ori
5',UTR
DHFR
T2A
BCMA CART yrin
T2A
막관통
신호 펩티드 (CD8a)
Centyrin (A08)
힌지 (CD8a)
공자극성 #1 (4-1BB)
공자극성 #2 (CD3z)

P-BCMA-101

신호 펩티드: MALPVTALLLPLALLLHAARP ( 서열번호 3)

CENTYRIN (A08):
MLPAPKNLVVSRITEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVVITGVKGGRF
SSPLVASFTT ( 서열번호 41)

힌지(CD8A): TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD ( 서열번호 10)

막관통(CD8A): IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC ( 서열번호 4)

공자극성 도메인 #1(4-1BB): KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL ( 서열번호 8)

공자극성 도메인 #2(CD3제타):
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR ( 서열번호 6)

P-BCMA-101 작제물:

MALPVTALLLPLALLLHAARPMLPAPKNLVVSRITEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDL
TGLKPGTEYAVVITGVKGGRFSSPLVASFTTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR ( 서열번호 42)



공개특허 10-2023-0011295

P-BCMA-101

신호 펩티드: MALPVTALLLPLALLLHAARP ( 서열번호 3)

CENTYRIN (A08):
MLPAPKNLVVSRITEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVVITGVKGGR
FSSPLVASFTT ( 서열번호 43)

힌지(CD8A): TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD ( 서열번호 10)

막관통(CD8A): IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC ( 서열번호 4)

공자극성 도메인 #1(4-1BB): KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL ( 서열번호 8)

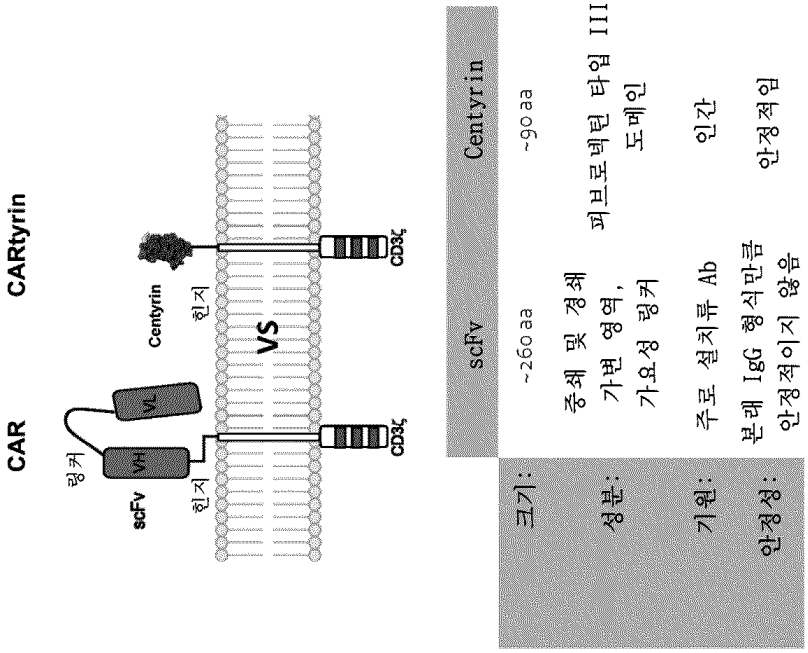
공자극성 도메인 #2(CD3제타):
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR ( 서열번호 6)

도면3b

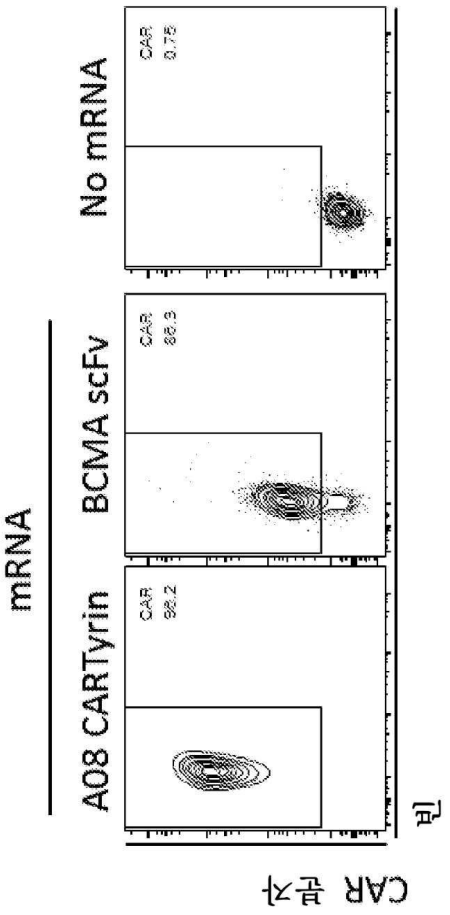
P-BCMA-101 CARTYRIN 작제물:

ATGGCACTGCCAGTCACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCAGCTAGACCAATGCTGCCTGCA
CCAAAGAACCTGGTGGTGAGCCGGATCACAGAGGACTCCGCCAGACTGTCTTGGACCGCCCCTGACGCCGCCTT
CGATTCCTTTCCAATCCGGTACATCGAGACACTGATCTGGGGCGAGGCCATCTGGCTGGACGTGCCCGGCTCTGA
GAGGAGCTACGATCTGACAGGCCTGAAGCCTGGCACCGAGTATGCAGTGGTCATCACAGGAGTGAAGGGCGGCA
GGTTCAGCTCCCCTCTGGTGGCCTCTTTTACCACAACCACACAACCCCTGCCCCCAGACCTCCCACACCGCCCCTAC
CATCGCGAGTCAGCCCCTGAGTCTGAGACCTGAGGCCTGCAGGCCAGCTGCAGGAGGAGCTGTGTGCACACCAGGG
GCCTGGACTTCGCCTGCGACATCTACATTTGGGCACCACTGGCCGGGACCTGTGGAGTGCTGCTGCTGAGCCTGG
TCATCACACTGTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAACTGCTGTATATATTTTCAAACAGCCCTTCATGCGCCCCGTGC
AGACTACCCAGGAGGAAGACGGGTGCTCCTGTCGATTCCCTGAGGAAGAGGCGGGTGTGAGCTGCGCGTG
AAGTTTAGTCGATCAGCAGATGCCCCCAGCTTACAAACAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGC
CGCCGAGAGGAATATGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGACGCGACCCCGAAATGGGAGGCAAGCCCAGGCGCA
AAAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCAGAAGCCTATTCTGAGATCGGCATG
AAGGGGGAGCGACGGAGAGGCAAAGGGCACGATGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACAAAGGACACCT
ATGATGCTCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGG ( 서열번호 44)

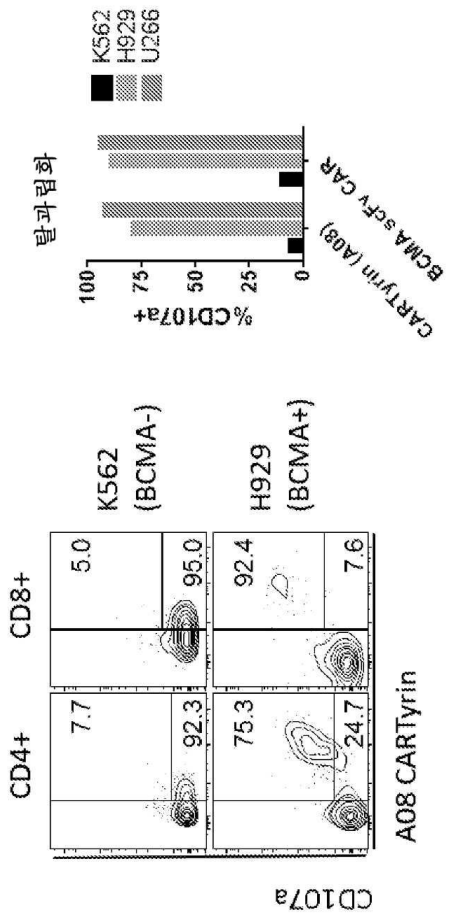
도면4


CAR
CARTyrin
링커
VH
VL
scFv
힌지
Centyrin
힌지
VS
CD3ζ
CD3ζ
scFv
Centyrin
크기:
~260 aa
~90 aa
성분:
중쇄 및 경쇄 가변 영역, 가요성 링커
피브로넥틴 타입 III 도메인
기원:
주로 설치류 Ab
인간
본래 IgG 형식만큼 안정적이지 않음
안정성:
안정적임

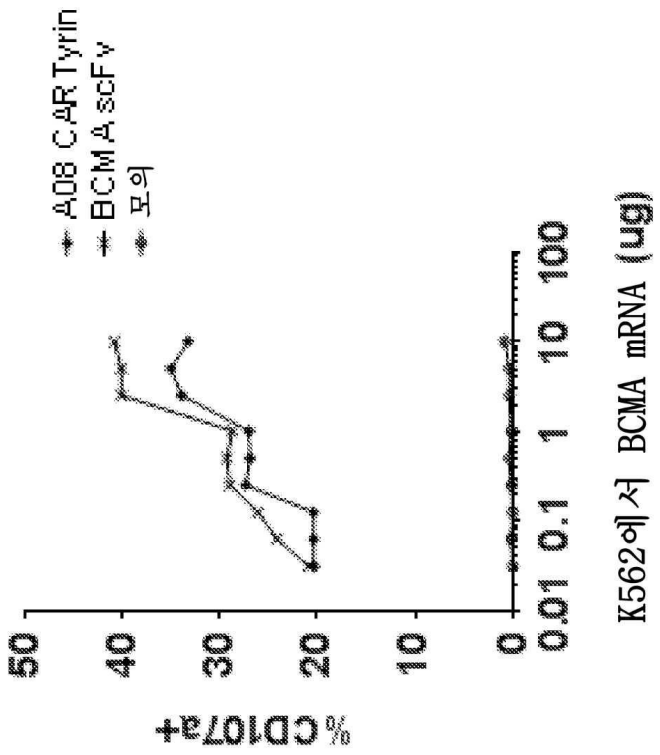
도면5a


mRNA
A08 CARTyrin
BCMA scFv
No mRNA
CAR
86.2
CAR
86.3
CAR
0.75
CAR 분자
빈

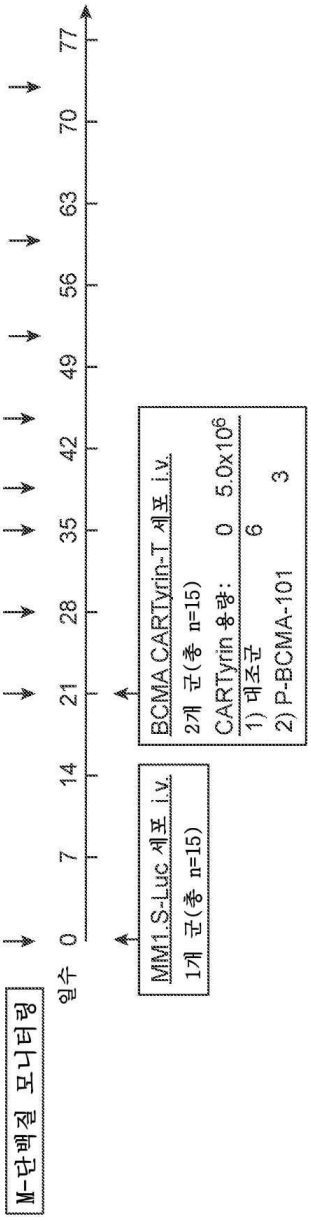
도면5b


K562
H929
U266
탈과립화
100
75
50
25
0
%CD107a+
CARTyrin (A08)
BCMA scFv CAR
CD107a
CD4+
CD8+
7.7
92.3
5.0
95.0
75.3
24.7
92.4
7.6
K562
(BCMA-)
H929
(BCMA+)
A08 CARTyrin

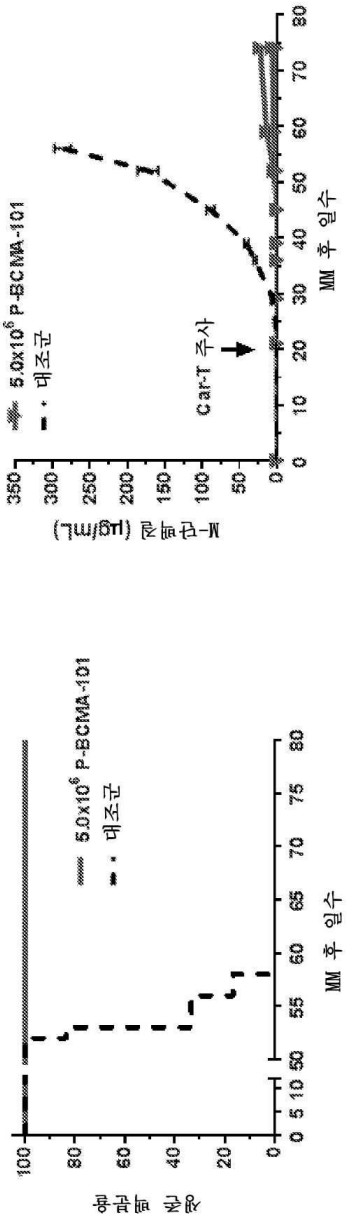
도면5c


A08 CAR Tyrin
BCMA scFv
모의
50
40
30
20
10
0
%CD107a+
0.01
0.1
1
10
100
K562에서 BCMA mRNA (ug)

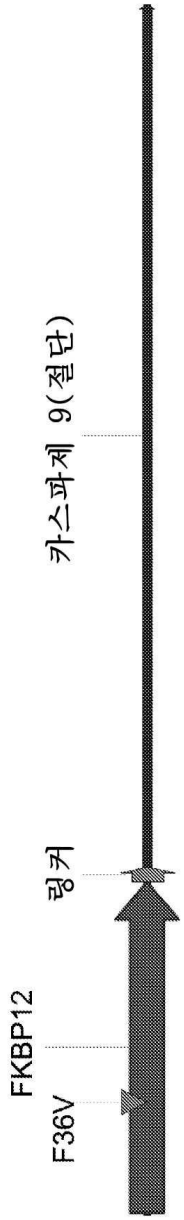
도면6


M-단백질 모니터링
일수 0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77
MM1.S-Luc 세포 i.v.
1개 군(총 n=15)
BCMA CARTyrin-T 세포 i.v.
2개 군(총 n=15)
CARTyrin 용량: 0 5.0x10^6
1) 대조군 6
2) P-BCMA-101 3

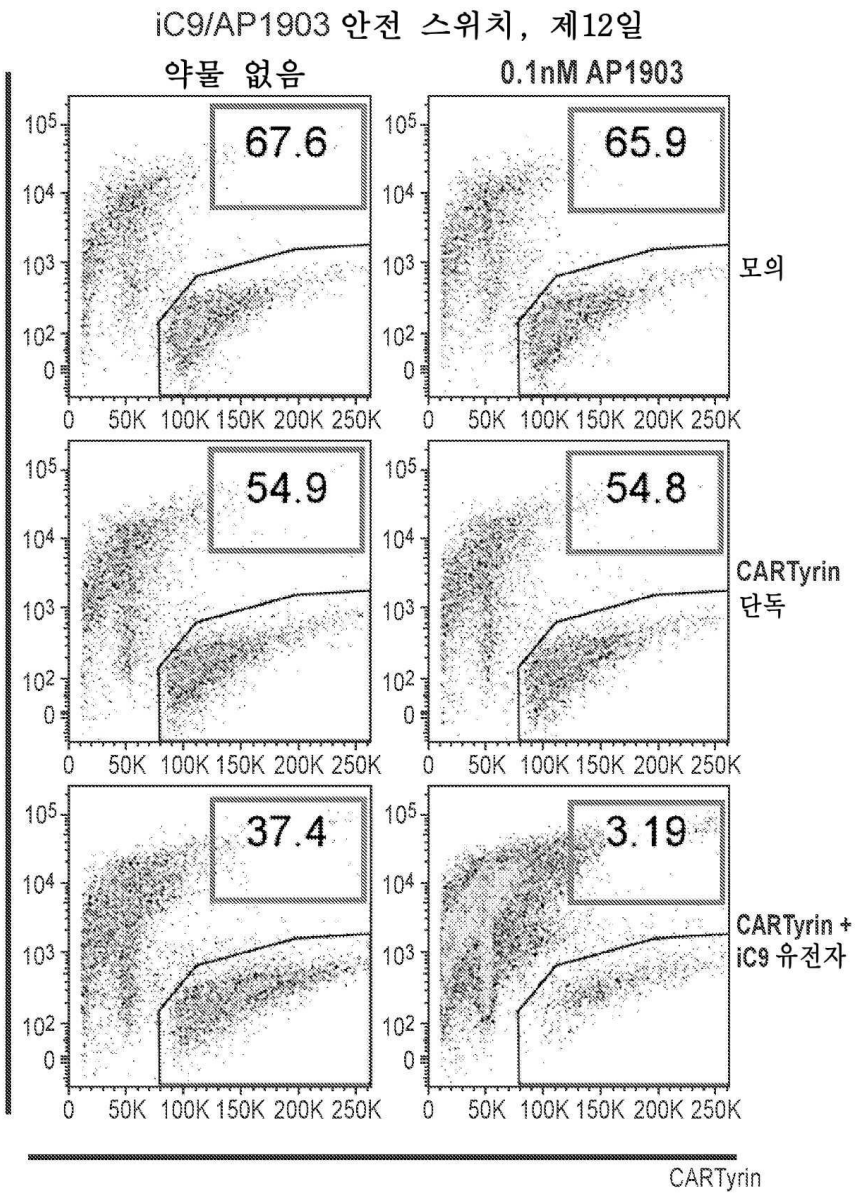
도면7


5.0x10^6 P-BCMA-101
대조군
Car-T 주사
M-단백질 (μg/mL)
MM 후 일수
5.0x10^6 P-BCMA-101
대조군
생존 백분율
MM 후 일수

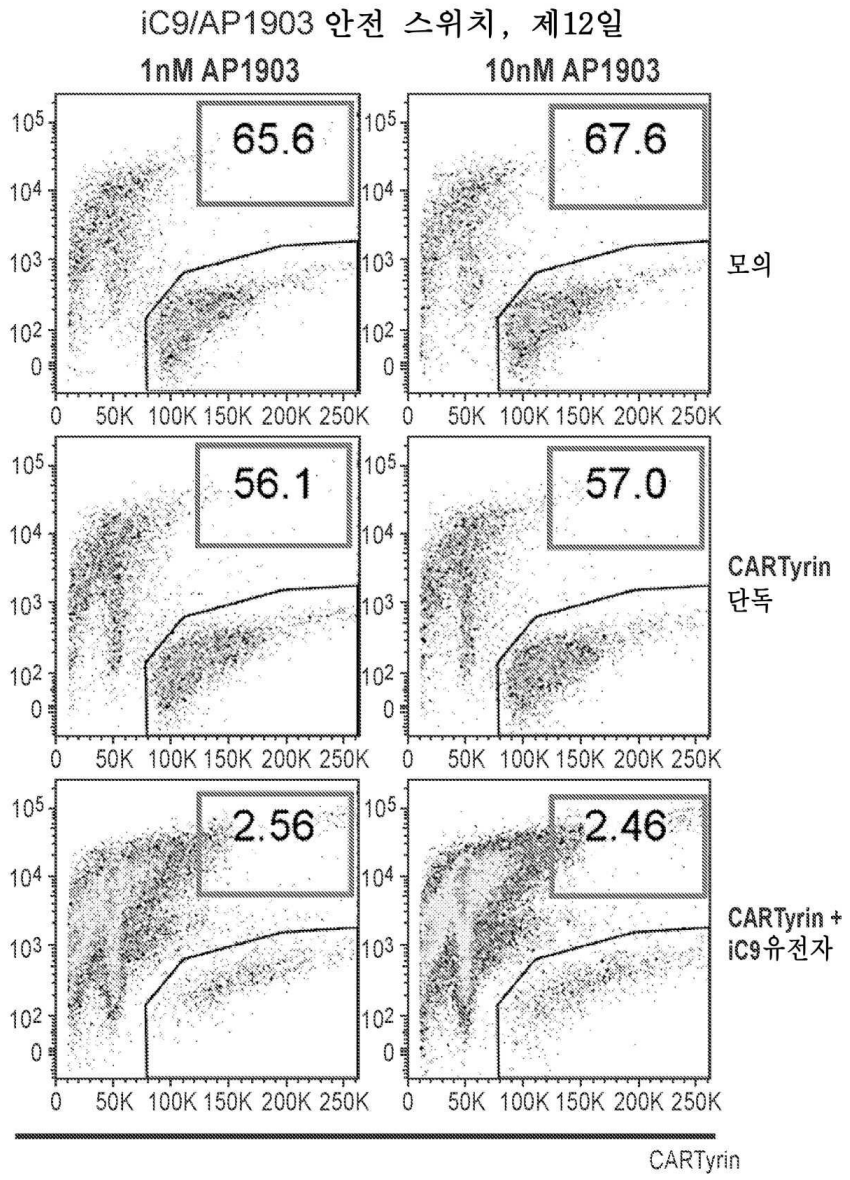
도면8



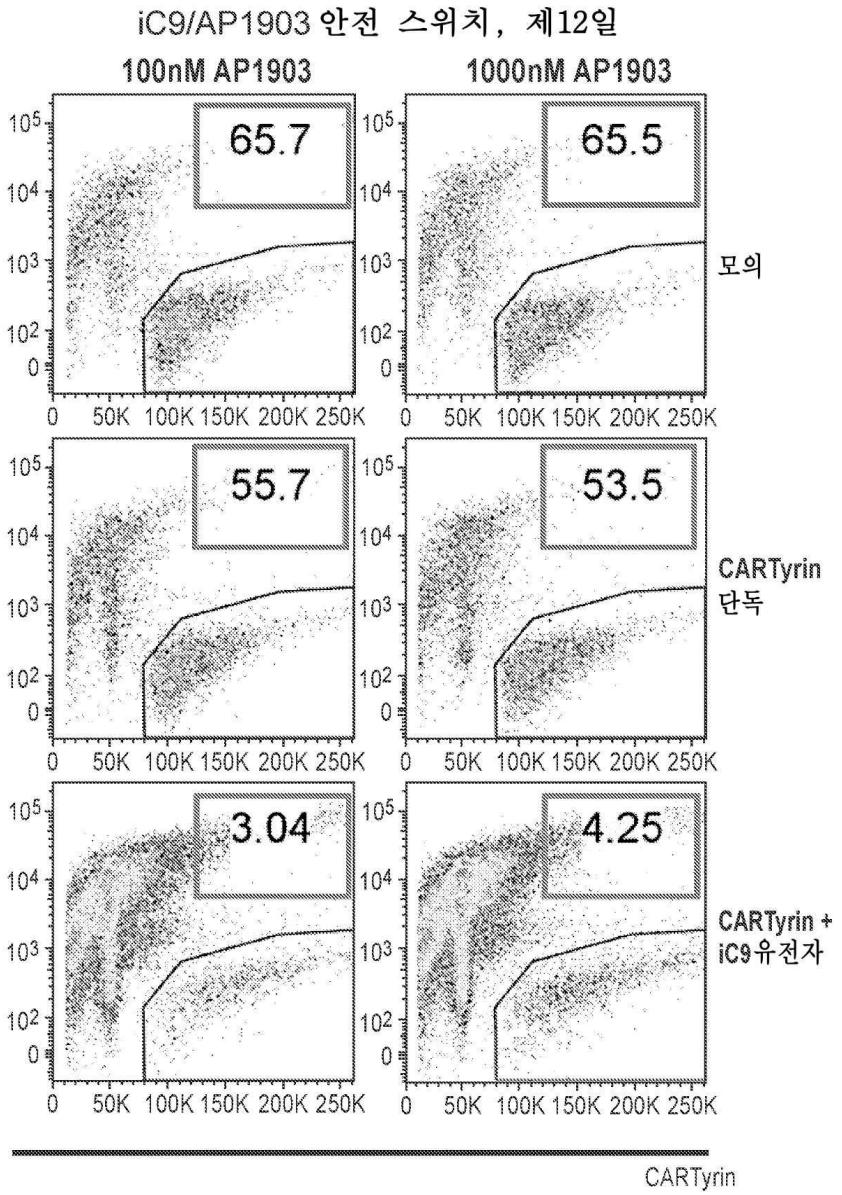
도면9a


iC9/AP1903 안전 스위치, 제12일
약물 없음
0.1nM AP1903
67.6
65.9
54.9
54.8
37.4
3.19
모의
CARTyrin 단독
CARTyrin + iC9 유전자
CARTyrin
0
50K
100K
150K
200K
250K

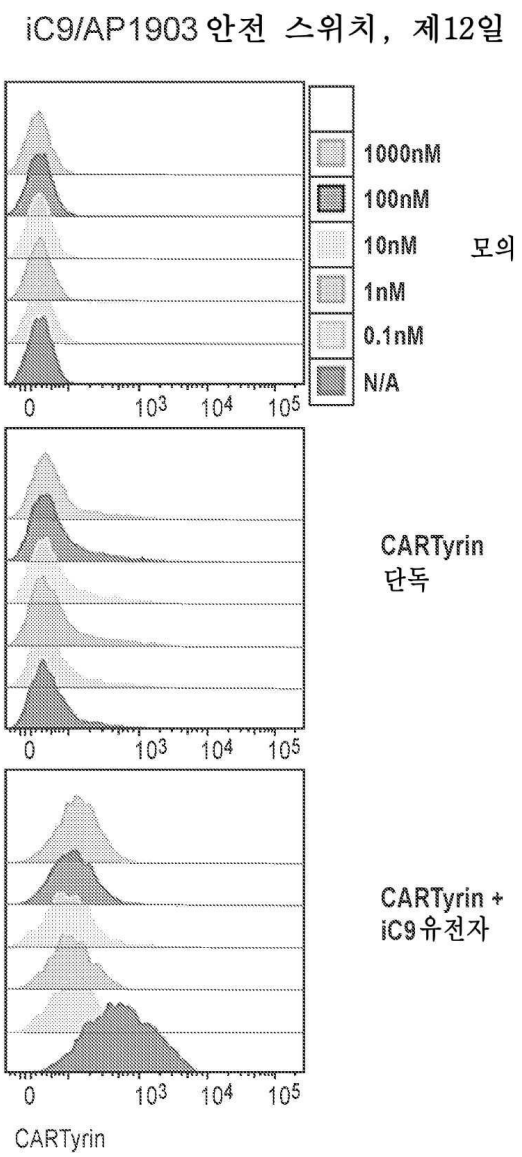
도면9b


iC9/AP1903 안전 스위치, 제12일
1nM AP1903
10nM AP1903
65.6
67.6
모의
56.1
57.0
CARTyrin
단독
2.56
2.46
CARTyrin +
iC9유전자
CARTyrin

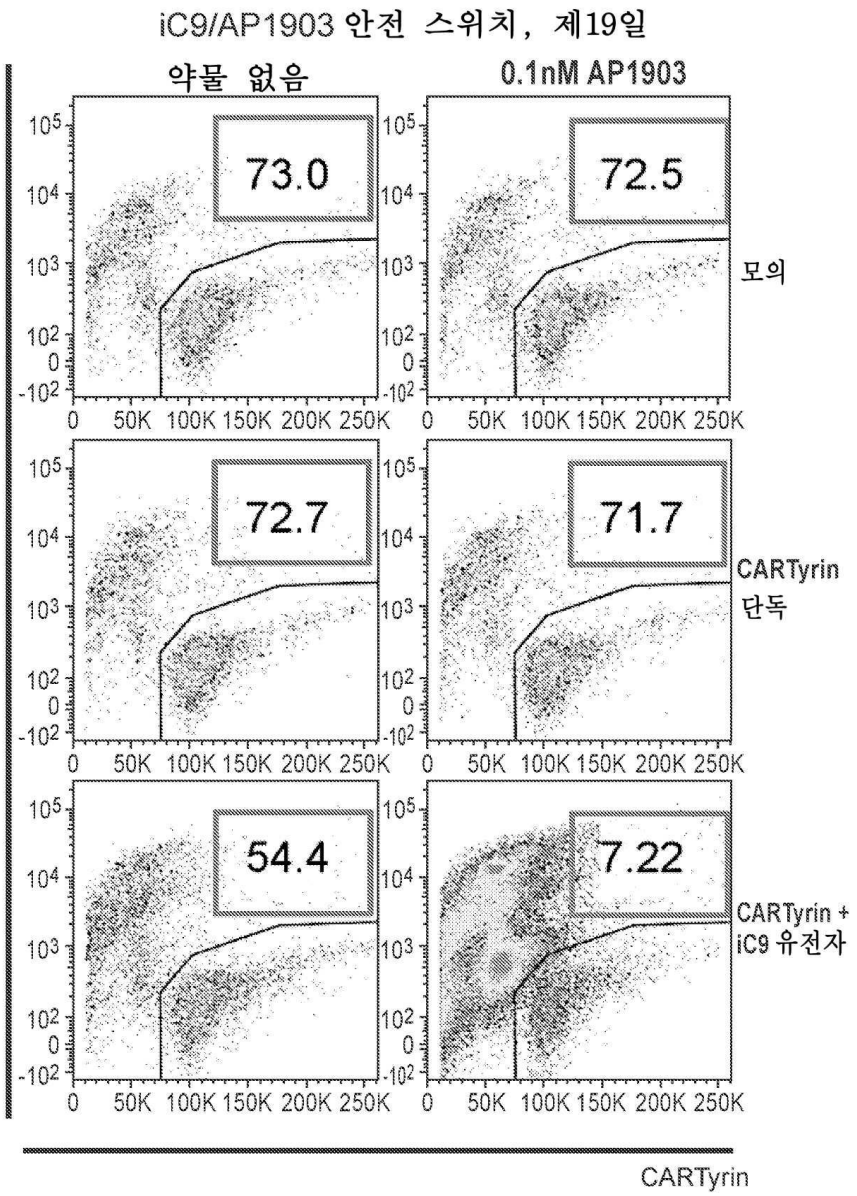
도면9c


iC9/AP1903 안전 스위치, 제12일
100nM AP1903
1000nM AP1903
65.7
65.5
모의
55.7
53.5
CARTyrin
단독
3.04
4.25
CARTyrin +
iC9유전자
CARTyrin

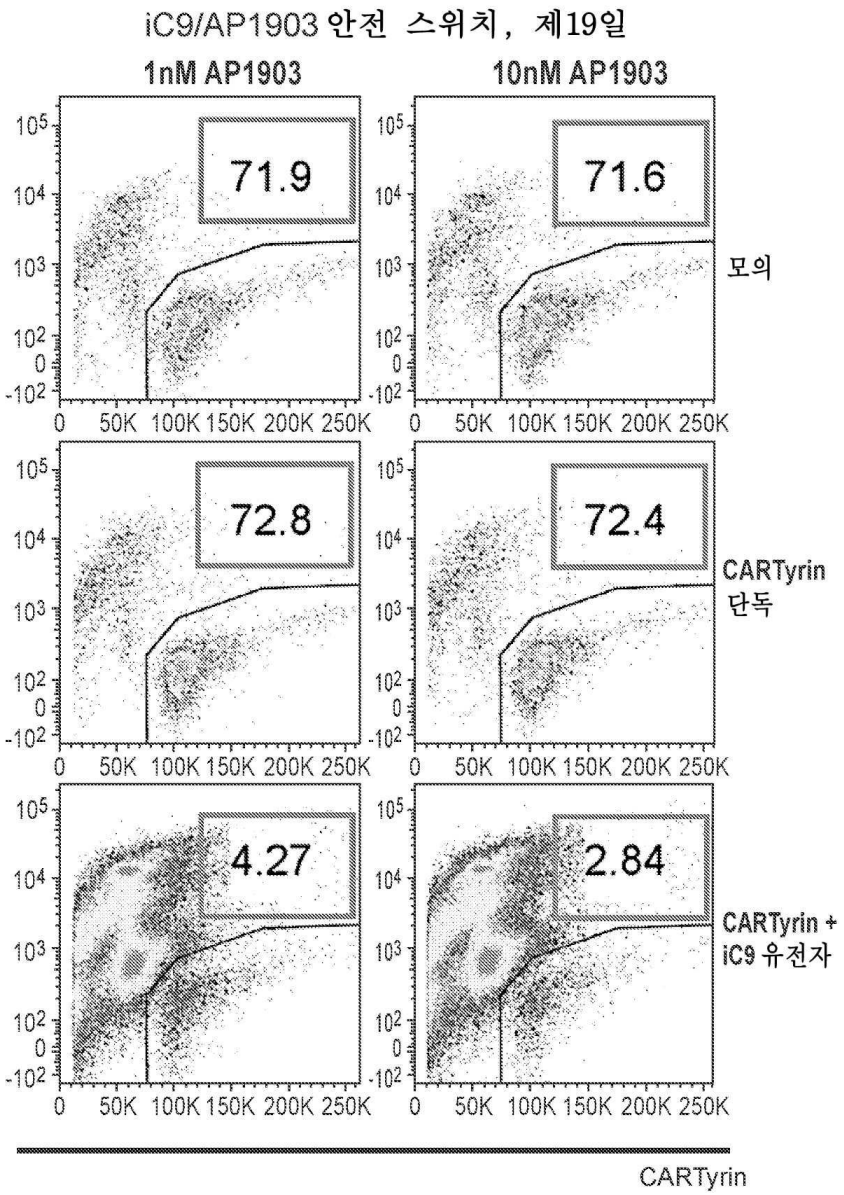
도면9d


iC9/AP1903 안전 스위치, 제12일
1000nM
100nM
10nM
1nM
0.1nM
N/A
모의
0
10^3
10^4
10^5
CARTyrin
단독
CARTyrin +
iC9 유전자
CARTyrin

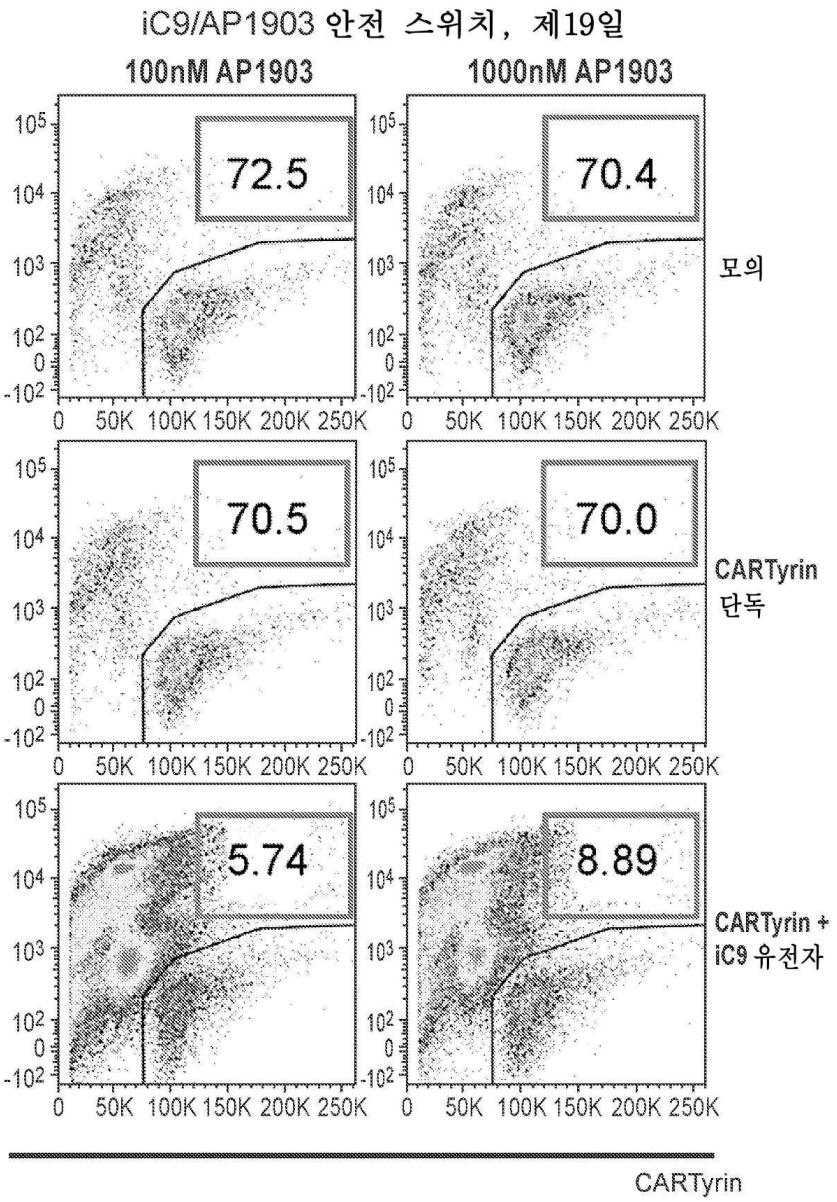
도면10a


iC9/AP1903 안전 스위치, 제19일
약물 없음
0.1nM AP1903
73.0
72.5
모의
72.7
71.7
CARTyrin
단독
54.4
7.22
CARTyrin +
iC9 유전자
CARTyrin

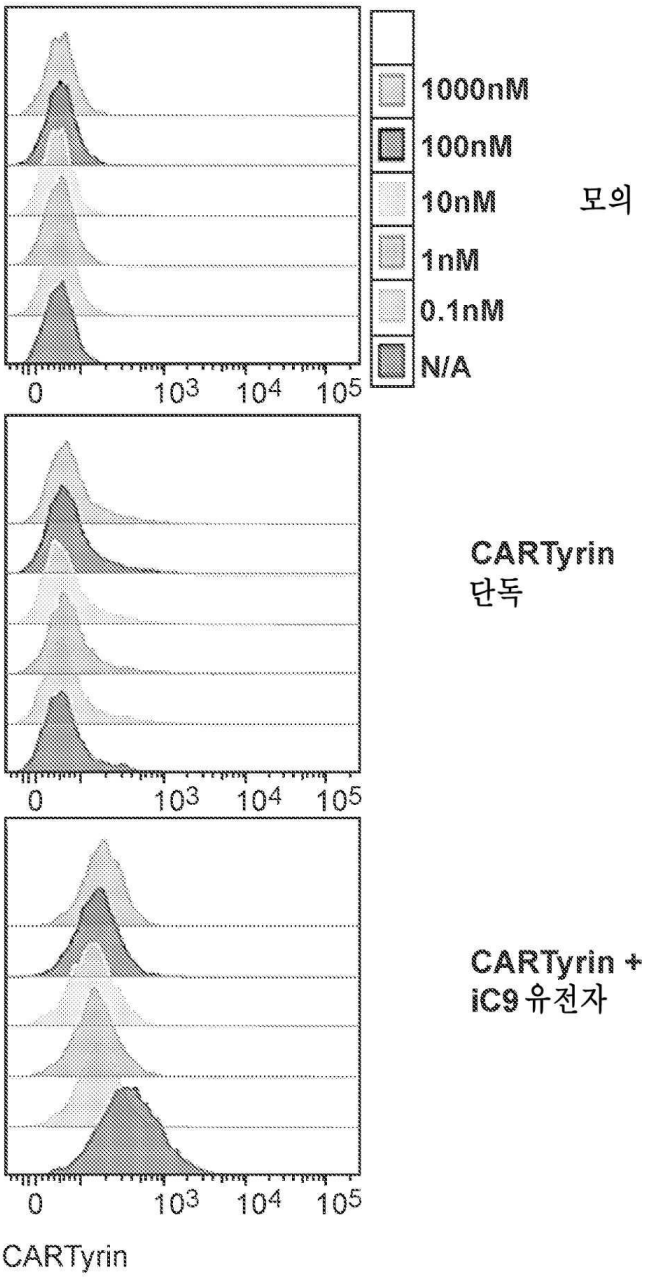
도면10b


iC9/AP1903 안전 스위치, 제19일
1nM AP1903
10nM AP1903
71.9
71.6
모의
72.8
72.4
CARTyrin
단독
4.27
2.84
CARTyrin +
iC9 유전자
CARTyrin

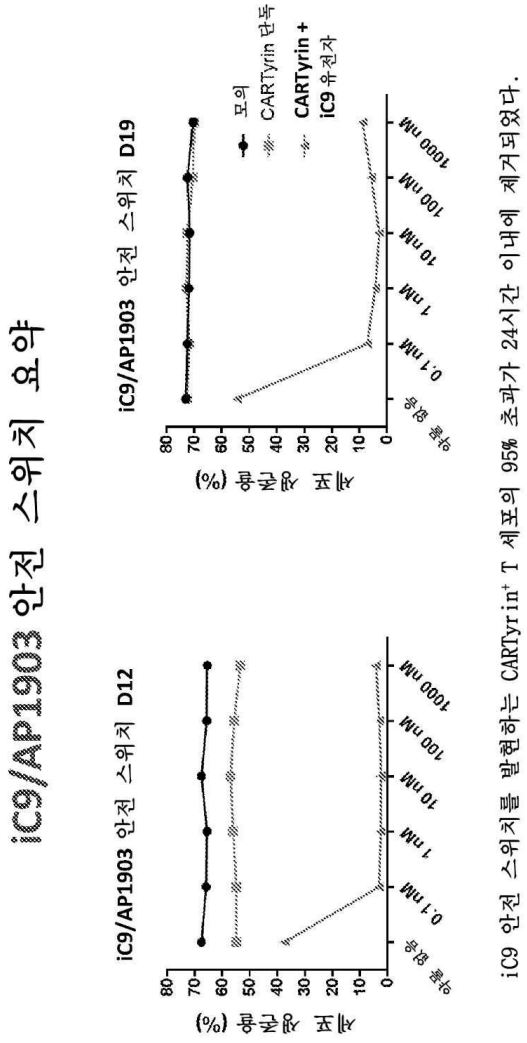
도면10c


iC9/AP1903 안전 스위치, 제19일
100nM AP1903
1000nM AP1903
72.5
70.4
모의
70.5
70.0
CARTyrin
단독
5.74
8.89
CARTyrin +
iC9 유전자
CARTyrin

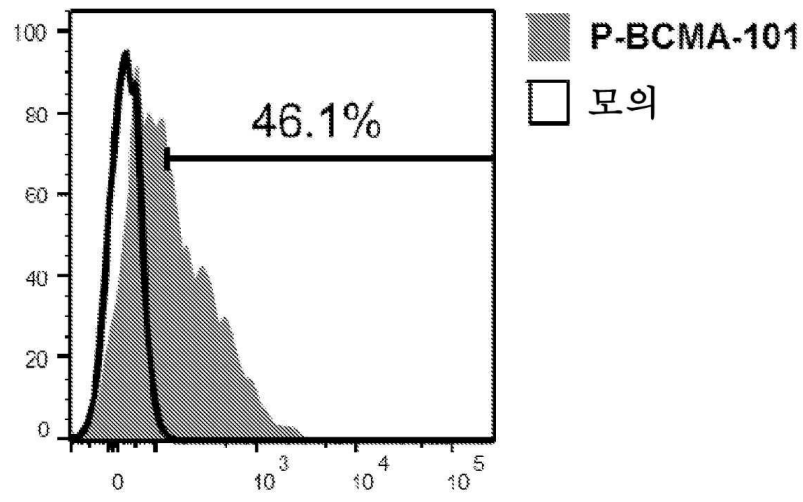
도면10d


1000nM
100nM
10nM
1nM
0.1nM
N/A
모의
0
$10^3$
$10^4$
$10^5$
CARTyrin
단독
CARTyrin +
iC9 유전자
CARTyrin

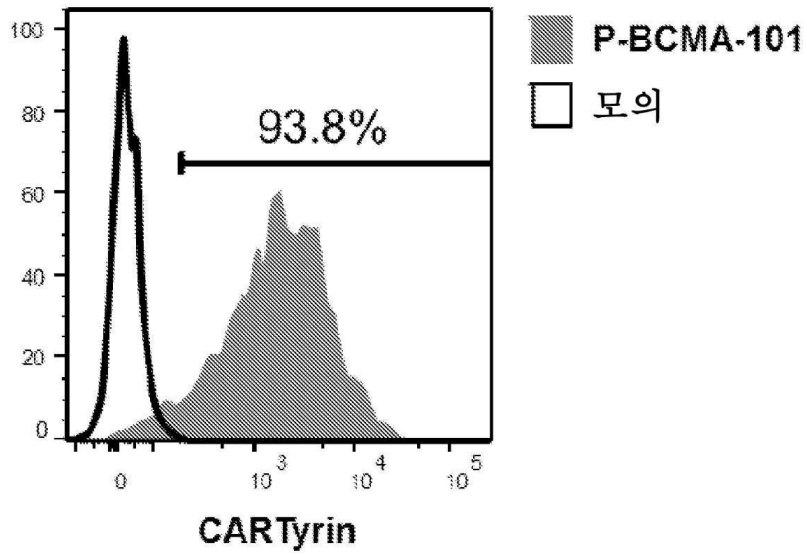
도면11


iC9/AP1903 안전 스위치 요약
iC9/AP1903 안전 스위치 D19
iC9/AP1903 안전 스위치 D12
모의
CARTyrin 단독
CARTyrin + iC9 유전자
세포 생존율 (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
용량 없음
0.1 nM
1 nM
10 nM
100 nM
1000 nM
iC9 안전 스위치를 발현하는 CARTyrin+ T 세포의 95% 초과가 24시간 이내에 제거되었다.

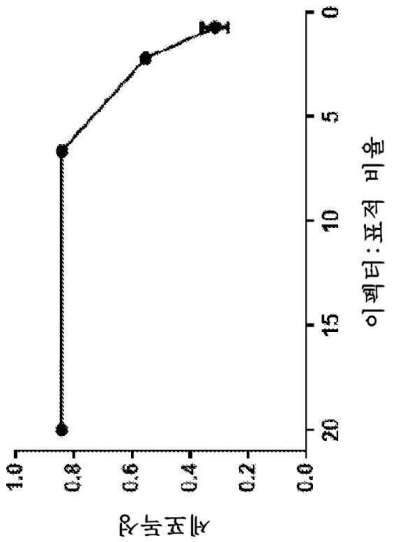
도면12a


100
80
60
40
20
0
46.1%
0
10^3
10^4
10^5
P-BCMA-101
모의

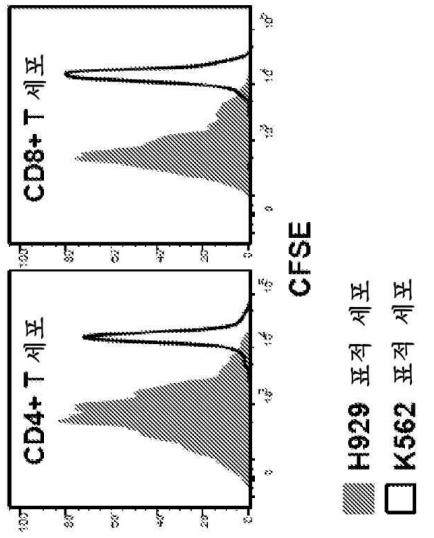
도면12b



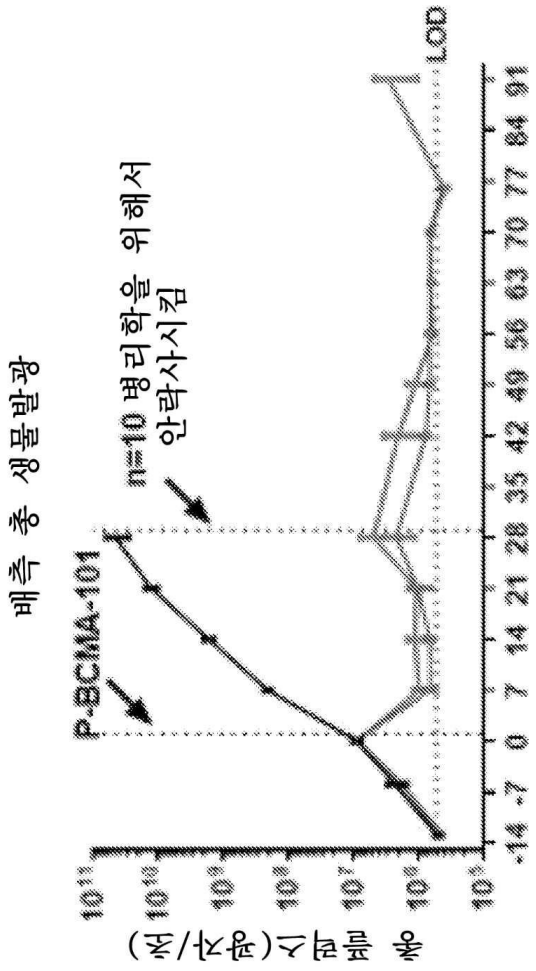

도면12c



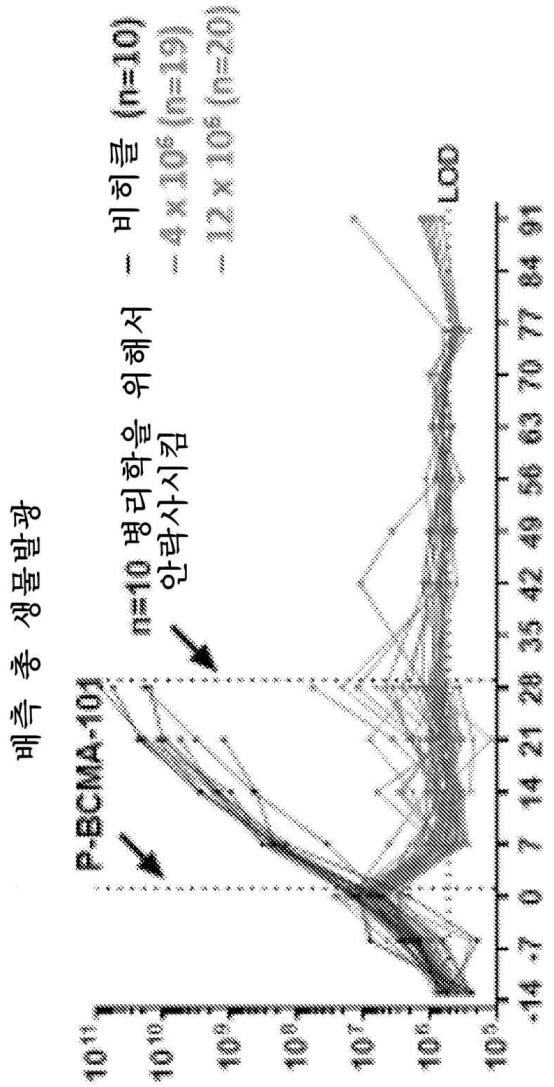
도면12d


CD4+ T 세포
CD8+ T 세포
CFSE
H929 표적 세포
K562 표적 세포

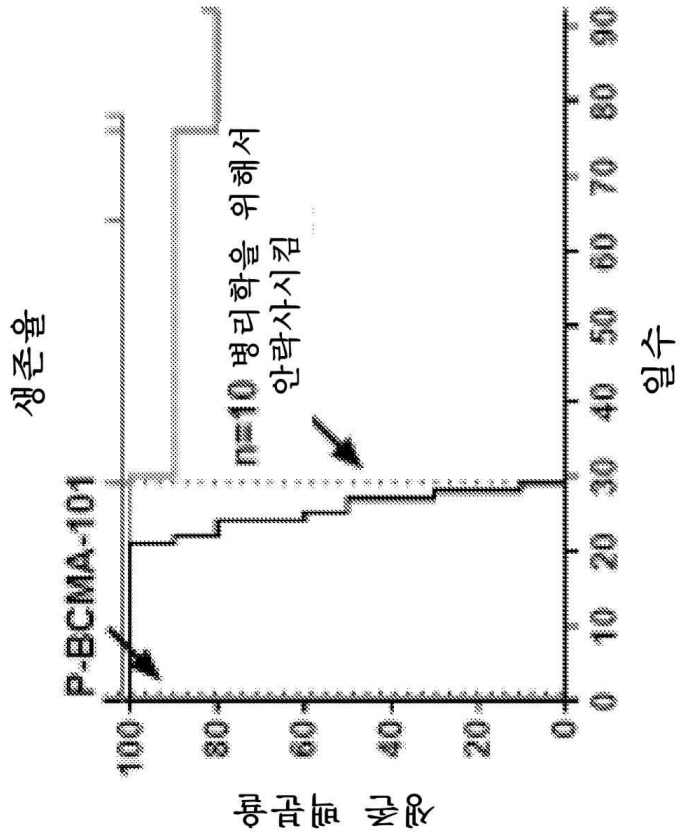
도면13a


배측 총 생물발광
P-BCMA-101
n=10 병리학을 위해서
안락사시킴
LOD
총 플럭스(광자/초)
-14 -7 0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91

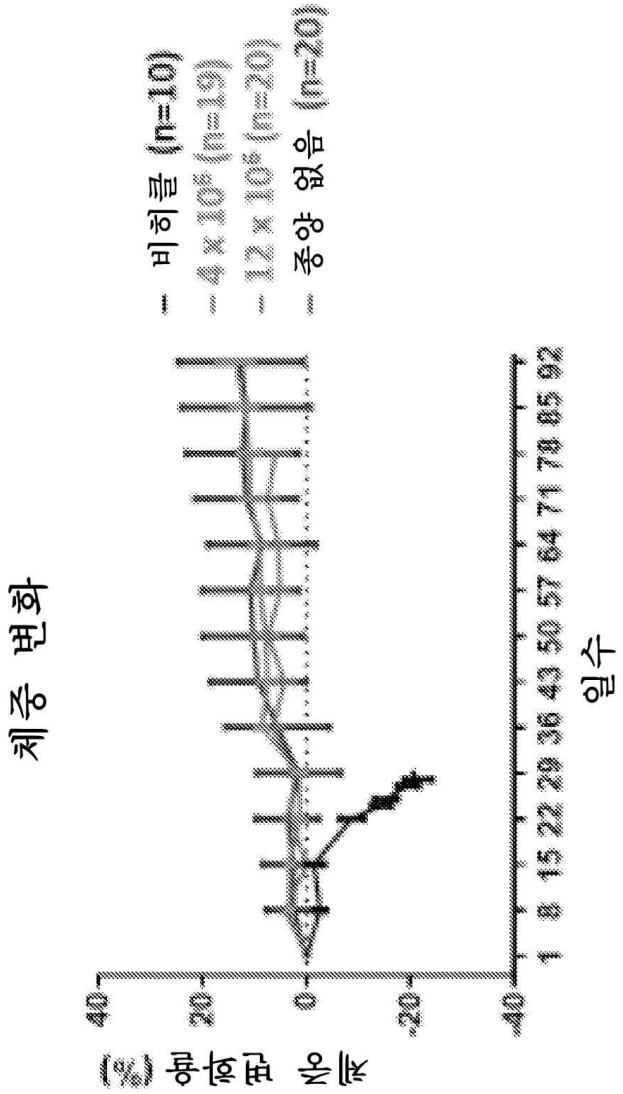
도면13b


배측 총 생물발광
P-BCMA-101
n=10 병리학을 위해서
안락사시킴
비히클 (n=10)
4 x 10^6 (n=19)
12 x 10^6 (n=20)
LOD
10^11
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
91

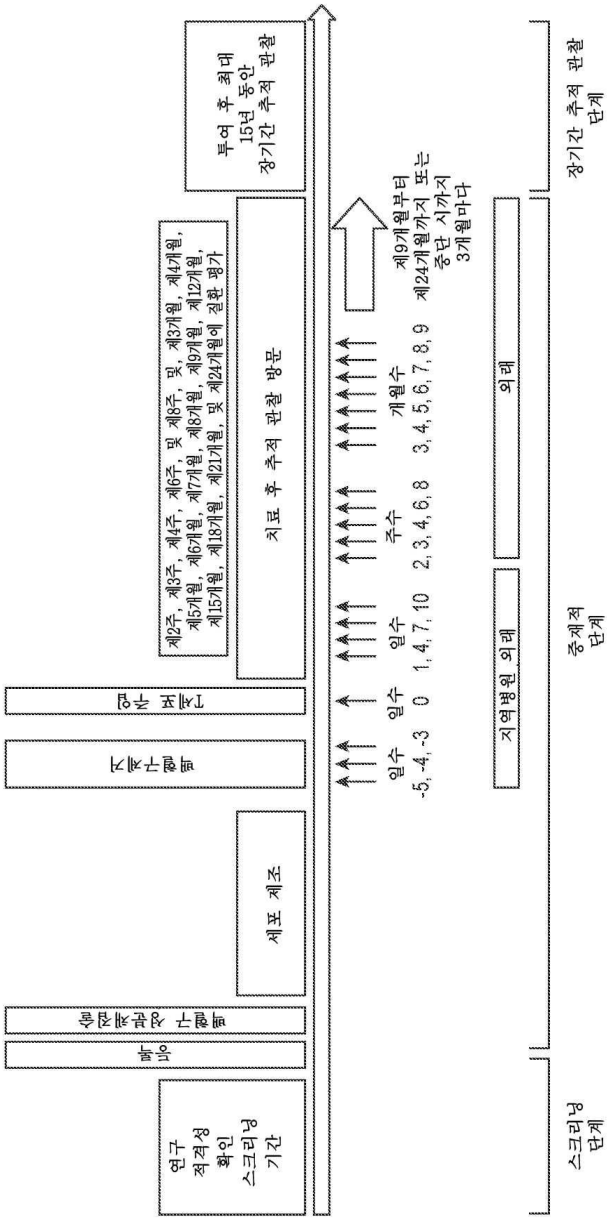
도면13c


생존율
P-BCMA-101
n=10 병리학을 위해서
안락사시킴
일수
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
80
60
40
20
0
생존 백분율

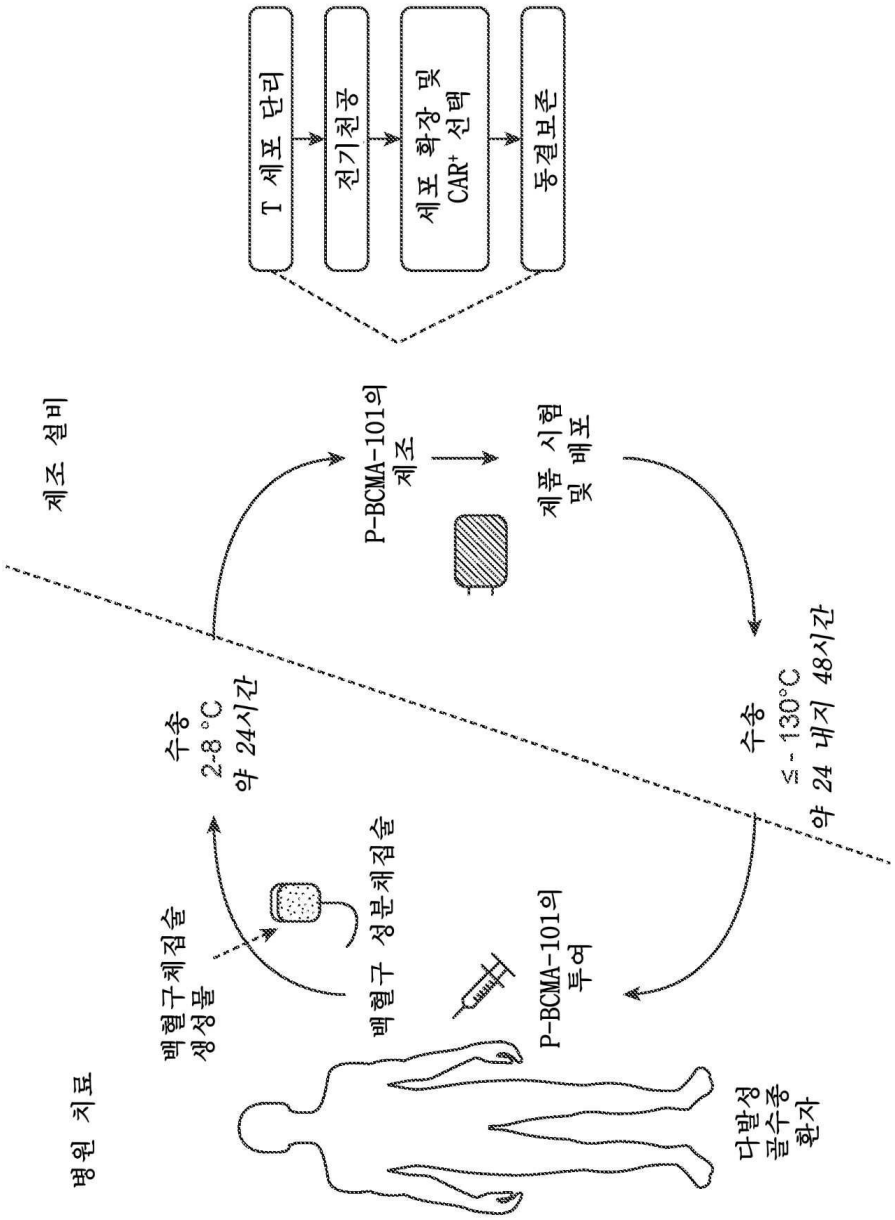
도면13d


체중 변화
비히클 (n=10)
4 x 10⁵ (n=19)
12 x 10⁵ (n=20)
중앙 없음 (n=20)
체중 변화율 (%)
40
20
0
-20
-40
1 8 15 22 29 36 43 50 57 64 71 78 85 92
일수

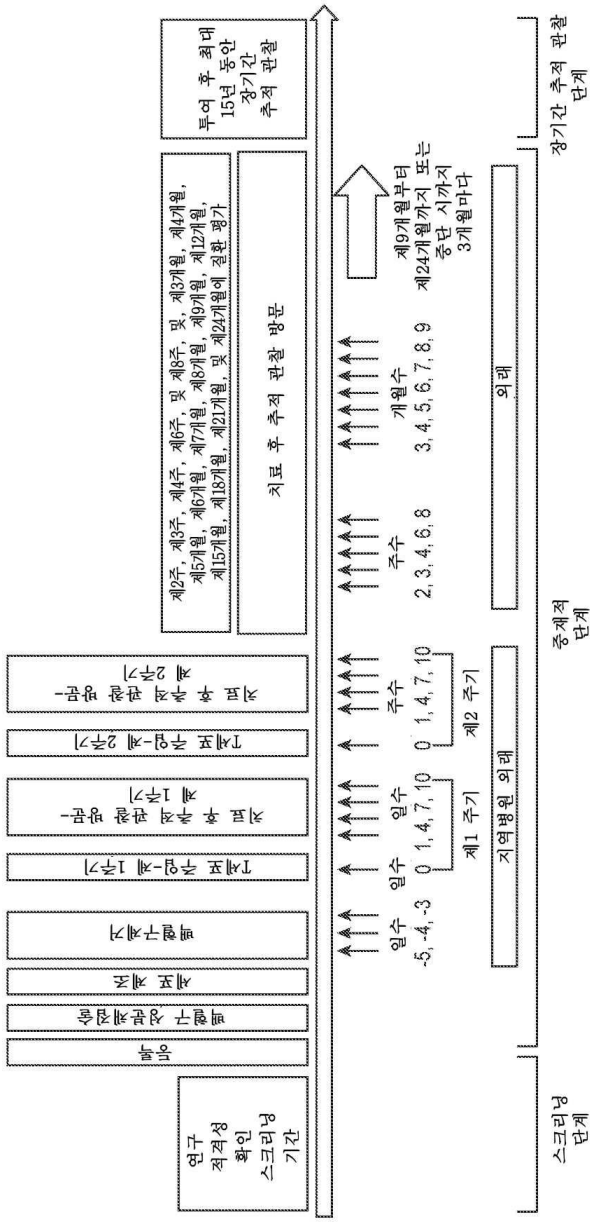
도면14


연구 적격성 확인 스크리닝 기간
혈액 검체 채취
백혈구 성분 채집술
세포 제조
림프구 제거 저용량 전처치
고용량 전처치
제2주, 제3주, 제4주, 제6주, 및 제8주, 및, 제3개월, 제4개월, 제5개월, 제6개월, 제7개월, 제8개월, 제9개월, 제12개월, 제15개월, 제18개월, 제21개월, 및 제24개월에 질환 평가
치료 후 추적 관찰 방문
투여 후 최대 15년 동안 장기간 추적 관찰
일수 일수 일수 주수 개월수
-5, -4, -3 0 1, 4, 7, 10 2, 3, 4, 6, 8 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
제9개월부터 제24개월까지 또는 중단 시까지 3개월마다
지역병원 외래
외래
스크리닝 단계
중재적 단계
장기간 추적 관찰 단계

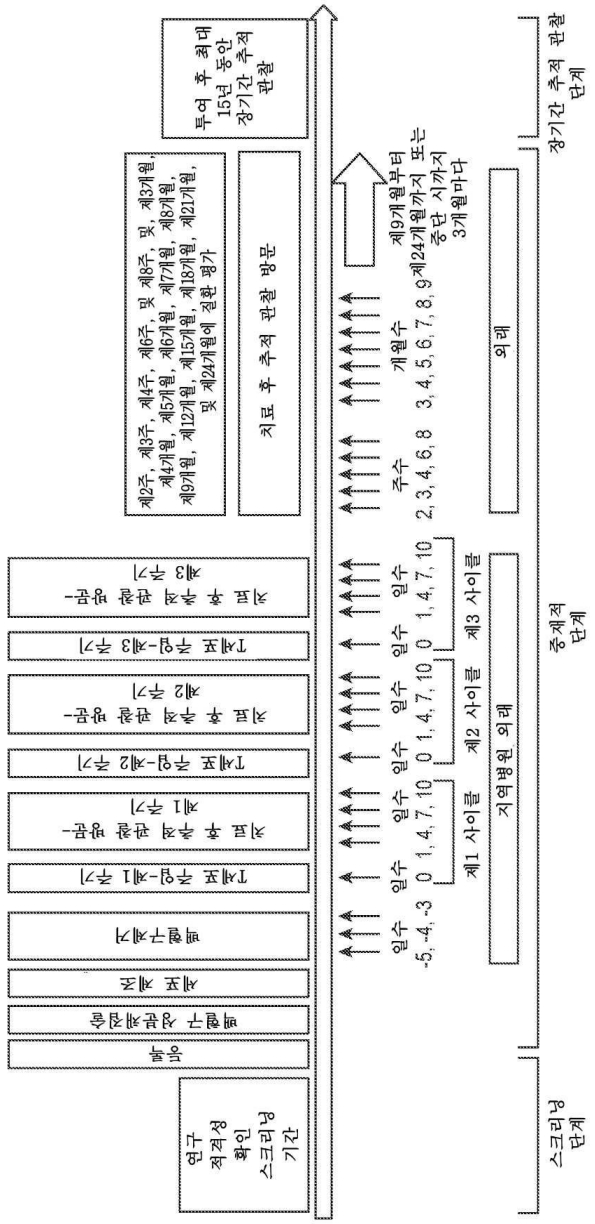
도면15


T 세포 단리
전기천공
세포 확장 및 CAR+ 선택
동결보존
제조 설비
P-BCMA-101의 제조
제품 시험 및 배포
수송 ≤ -130°C 약 24 내지 48시간
수송 2-8 °C 약 24시간
백혈구채집술 생성물
백혈구 성분채집술
P-BCMA-101의 투여
병원 치료
다발성 골수종 환자

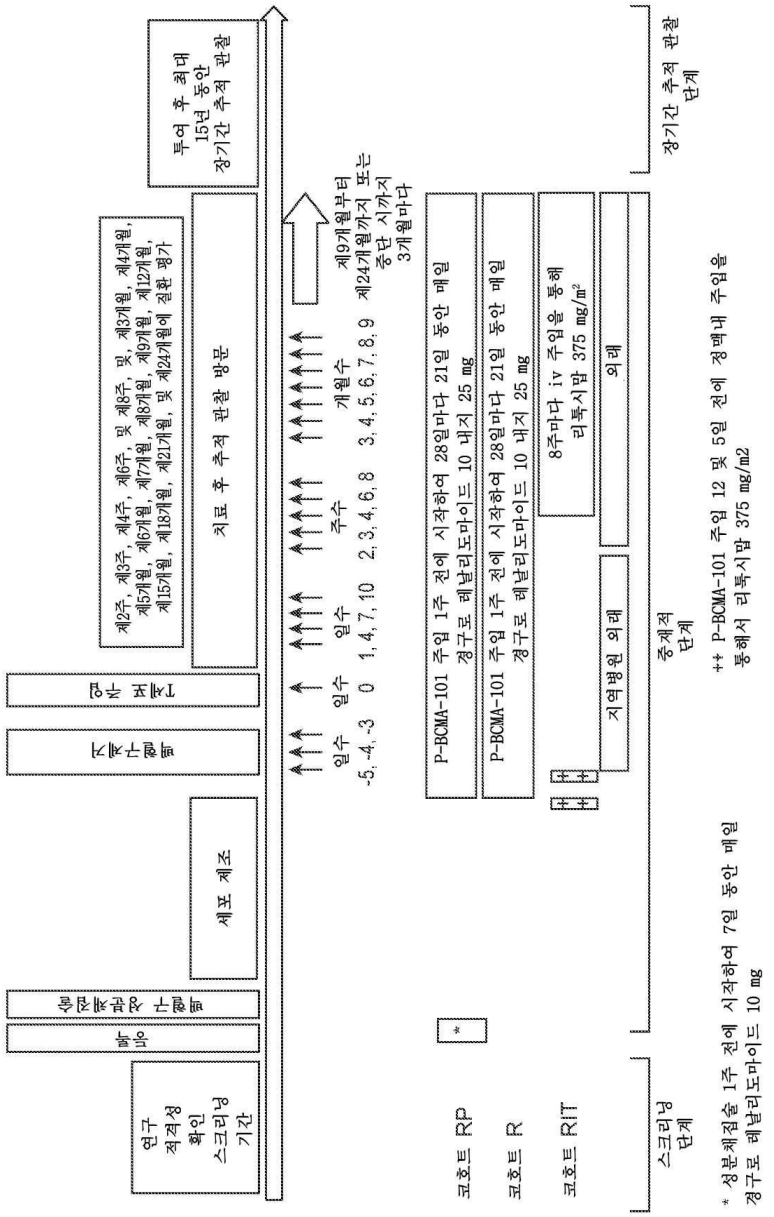
도면16


등록
혈액 검체 채취
혈액 검체
혈액 검사
T세포 수입-제 1주기
치료 후 추적 관찰 방문-
제 1주기
T세포 수입-제 2주기
치료 후 추적 관찰 방문-
제 2주기
연구 적격성 확인 스크리닝 기간
일수
-5, -4, -3
일수
0, 1, 4, 7, 10
제1 주기
주수
0, 1, 4, 7, 10
제2 주기
지역병원 외래
제2주, 제3주, 제4주, 제6주, 및 제8주, 및, 제3개월, 제4개월, 제5개월, 제6개월, 제7개월, 제8개월, 제9개월, 제12개월, 제15개월, 제18개월, 제21개월, 및 제24개월에 질환 평가
치료 후 추적 관찰 방문
주수
2, 3, 4, 6, 8
개월수
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
제9개월부터 제24개월까지 또는 중단 시까지 3개월마다
외래
투여 후 최대 15년 동안 장기간 추적 관찰
스크리닝 단계
중재적 단계
장기간 추적 관찰 단계

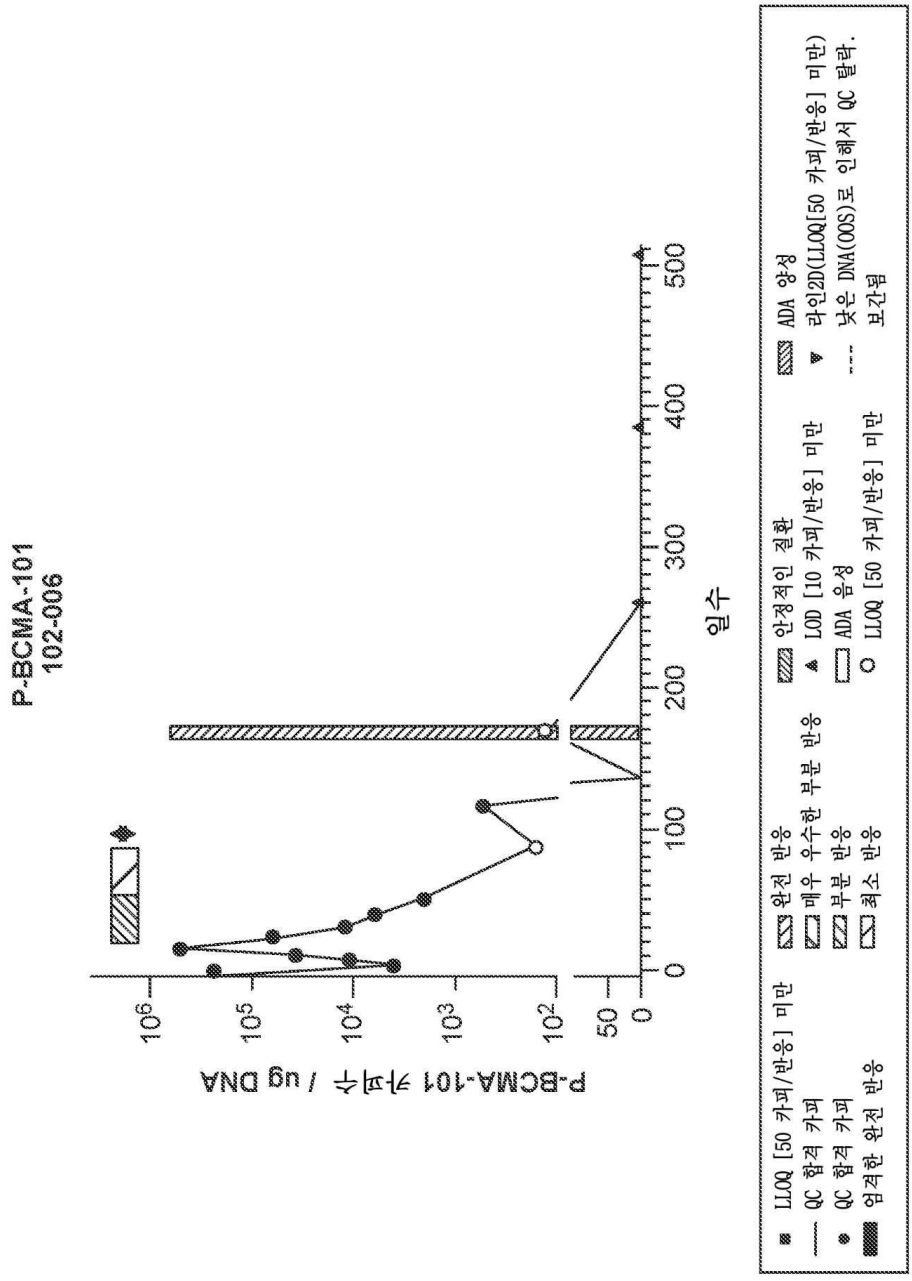
도면17


연구 적격성 확인 스크리닝 기간
베이스라인
혈액 샘플 채취
혈액 채취
혈액 구체적 주기
T세포 주입-제1 주기
치료 후 추적 관찰 방문-제1 주기
T세포 주입-제2 주기
치료 후 추적 관찰 방문-제2 주기
T세포 주입-제3 주기
치료 후 추적 관찰 방문-제3 주기
제2주, 제3주, 제4주, 제6주, 및 제8주, 및, 제3개월, 제4개월, 제5개월, 제6개월, 제7개월, 제8개월, 제9개월, 제12개월, 제15개월, 제18개월, 제21개월, 및 제24개월에 질환 평가
치료 후 추적 관찰 방문
투여 후 최대 15년 동안 장기간 추적 관찰
일수 -5, -4, -3
일수 0, 1, 4, 7, 10
제1 사이클
일수 0, 1, 4, 7, 10
제2 사이클
일수 0, 1, 4, 7, 10
제3 사이클
주수 2, 3, 4, 6, 8
개월수 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
제9개월부터 제24개월까지 또는 중단 시까지 3개월마다
지역병원 외래
외래
스크리닝 단계
중재적 단계
장기간 추적 관찰 단계

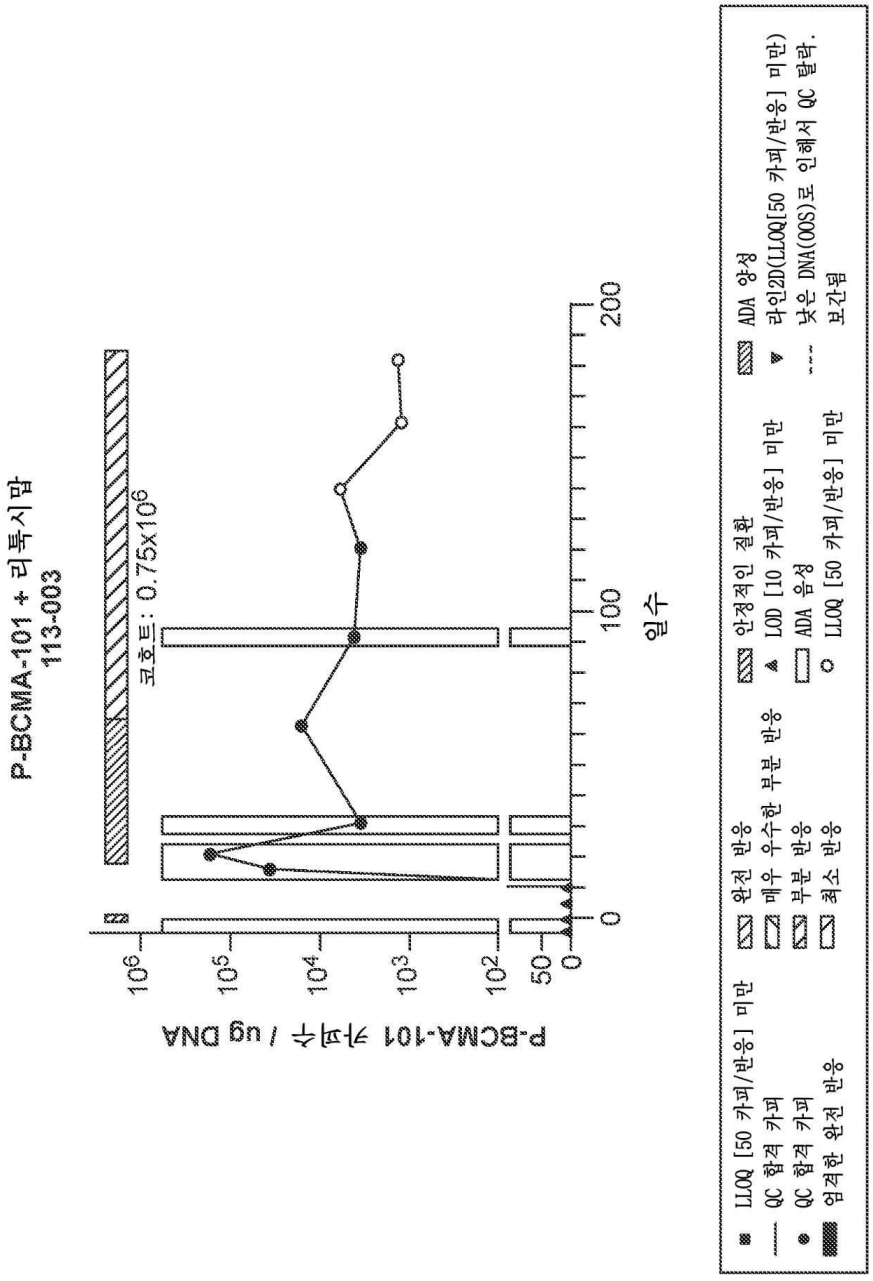
도면18


연구 적격성 확인 스크리닝 기간
혈액 채취
백혈구 성분채집술
세포 제조
림프구 제거 화학요법
치료 후 추적 관찰 방문
제2주, 제3주, 제4주, 제6주, 및 제8주, 및, 제3개월, 제4개월, 제5개월, 제6개월, 제7개월, 제8개월, 제9개월, 제12개월, 제15개월, 제18개월, 제21개월, 및 제24개월에 질환 평가
투여 후 최대 15년 동안 장기간 추적 관찰
일수 -5, -4, -3
일수 0
일수 1, 4, 7, 10
주수 2, 3, 4, 6, 8
개월수 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
제9개월부터 제24개월까지 또는 중단 시까지 3개월마다
코호트 RP
코호트 R
코호트 RIT
*
P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 내지 25 mg
P-BCMA-101 주입 1주 전에 시작하여 28일마다 21일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 내지 25 mg
8주마다 iv 주입을 통해 리툭시맙 375 mg/m²
지역병원 외래
외래
스크리닝 단계
중재적 단계
장기간 추적 관찰 단계
* 성분채집술 1주 전에 시작하여 7일 동안 매일 경구로 레날리도마이드 10 mg
++ P-BCMA-101 주입 12 및 5일 전에 정맥내 주입을 통해서 리툭시맙 375 mg/m2

도면19a


P-BCMA-101
102-006
P-BCMA-101 카피수 / ug DNA
$10^6$
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
50
0
0
100
200
300
400
500
일수
LLOQ [50 카피/반응] 미만
QC 합격 카피
QC 합격 카피
엄격한 완전 반응
완전 반응
매우 우수한 부분 반응
부분 반응
최소 반응
안정적인 질환
LOD [10 카피/반응] 미만
ADA 음성
LLOQ [50 카피/반응] 미만
ADA 양성
라인2D(LLOQ[50 카피/반응] 미만)
낮은 DNA(OOS)로 인해서 QC 탈락.
보간됨

도면19b




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> POSEIDA THERAPEUTICS, INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR USE IN THE TREATMENT OF CANCER

<130> POTH-057/001WO 325002-2527

<150> US 63/009,569

<151> 2020-04-14

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
20 25 30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85

<210> 2

<211> 594

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> piggybac transposase

<400> 2

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Val Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn

65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His

85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu

100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile

115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile

130 135 140

Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg

145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Ser Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile

165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn

180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr

195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu

210 215 220

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val

225 230 235 240

Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile

245 250 255

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu

260 265 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Val Tyr Ile Pro Asn Lys Pro

275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys

290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn

305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335
His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn

370 375 380
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400
Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430
Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr

435 440 445
Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460
Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480
Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495
Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser

500 505 510
Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525
Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Lys Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540
Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr
545 550 555 560
Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys

565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser

580 585 590

Cys Phe

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 5

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atctacattt gggcaccact ggccgggacc tgtggagtgc tgctgctgag cctggtcatc 60

acactgtact gc 72

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgcgtgaagt ttagtcgatc agcagatgcc ccagcttaca aacagggaca gaaccagctg 60

tataacgagc tgaatctggg ccgccgagag gaatatgacg tgctggataa gcggagagga 120

cgcgaccccg aaatgggagg caagcccagg cgcaaaaacc ctcaggaagg cctgtataac 180

gagctgcaga aggacaaaat ggcagaagcc tattctgaga tcggcatgaa gggggagcga 240

cggagaggca aagggcacga tgggctgtac cagggactga gcaccgccac aaaggacacc 300

tatgatgctc tgcatatgca ggcactgcct ccaagg 336

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 9

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagagaggca ggaagaaact gctgtatatt ttcaaacagc ccttcatgcg ccccgtgcag 60

actacccagg aggaagacgg gtgctcctgt cgattccctg aggaagagga aggcgggtgt 120

gagctg 126

<210> 10

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 10

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

<210> 11

<211> 135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

actaccacac cagcacctag accaccaact ccagctccaa ccatcgcgag tcagcccctg 60

agtctgagac ctgaggcctg caggccagct gcaggaggag ctgtgcacac caggggcctg 120

gacttcgcct gcgac 135

<210> 12

<211> 594

<212> PRT

<213> Trichoplusia ni

<400> 12

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175

Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
180 185 190

His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
195 200 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu

210 215 220

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val

225 230 235 240

Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile

245 250 255

Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu

260 265 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro

275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Tyr Lys

290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn

305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val

325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile

340 345 350

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

355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn

370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro

385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu

405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys

420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr

435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg

450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480
Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val

485 490 495
Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510
Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525
Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Asn Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540
Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr

545 550 555 560
Tyr Cys Pro Ser Lys Ile Arg Arg Lys Ala Asn Ala Ser Cys Lys Lys
565 570 575
Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser
580 585 590
Cys Phe

<210> 13
<211> 90
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15

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

65 70 75 80

Ser Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
85 90

<210> 14

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FN3 domain consensus sequence

<400> 14

atgctgcctg caccaaagaa cctggtggtg tctcatgtga cagaggatag tgccagactg 60

tcatggactg ctcccgacgc agccttcgat agttttatca tcgtgtaccg ggagaacatc 120

gaaaccggcg aggccattgt cctgacagtg ccagggtccg aacgctctta tgacctgaca 180

gatctgaagc ccggaactga gtactatgtg cagatcgccg gcgtcaaagg aggcaatatc 240

agcttccctc tgtccgcaat cttcaccaca 270

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 concensus sequence

<400> 15

Thr Glu Asp Ser

1

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 16

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain concensus

<400> 17

Ser Glu Lys Val Gly Glu

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 18

Gly Ser Glu Arg

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 19

Gly Leu Lys Pro Gly

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 20

Lys Gly Gly His Arg Ser Asn

1 5

<210> 21

<211> 958

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 21

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
1 5 10 15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu
20 25 30

Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
35 40 45

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

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
65 70 75 80

Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala
85 90 95

Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala
115 120 125

Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile
130 135 140

Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr
145 150 155 160

Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu
165 170 175

His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val
180 185 190

Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys
195 200 205

Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln
210 215 220

Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu

225 230 235 240

Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly
245 250 255
Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp
260 265 270
His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly
275 280 285
Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr
290 295 300

Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile
305 310 315 320
Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro
325 330 335
Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln
340 345 350
Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn
355 360 365

Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn
370 375 380
Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser Gly Ser Gly Glu Gly
385 390 395 400
Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
405 410 415
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
420 425 430

His Ala Ala Arg Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser
435 440 445
Arg Ile Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala
450 455 460
Ala Phe Asp Ser Phe Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly
465 470 475 480

Glu Ala Ile Trp Leu Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu
485 490 495

Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val
500 505 510

Lys Gly Gly Arg Phe Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr Thr
515 520 525

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
530 535 540

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
545 550 555 560

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
565 570 575

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
580 585 590

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
595 600 605

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
610 615 620

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
625 630 635 640

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
645 650 655

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
660 665 670

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
675 680 685

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
690 695 700

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
705 710 715 720

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

725 730 735

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser

740 745 750

Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn

755 760 765

Pro Gly Pro Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln

770 775 780

Asn Met Gly Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg

785 790 795 800

Asn Glu Ser Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu

805 810 815

Gly Lys Gln Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile

820 825 830

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

835 840 845

Arg Glu Leu Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser

850 855 860

Leu Asp Asp Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys

865 870 875 880

Val Asp Met Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala

885 890 895

Met Asn His Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln

900 905 910

Asp Phe Glu Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr

915 920 925

Lys Leu Leu Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu

930 935 940

Lys Gly Ile Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp

945 950 955

<210> 22

<211> 2874

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 22

atgggggtcc aggtcgagac tatttcacca ggggatgggc gaacatttcc aaaaaggggc 60

cagacttgcg tcgtgcatta caccgggatg ctggaggacg ggaagaaagt ggacagctcc 120

agggatcgca acaagccctt caagttcatg ctgggaaagc aggaagtgat ccgaggatgg 180

gaggaaggcg tggcacagat gtcagtcggc cagcgggcca aactgaccat tagccctgac 240

tacgcttatg gagcaacagg ccacccaggg atcattcccc ctcatgccac cctggtcttc 300

gatgtggaac tgctgaagct ggagggagga ggaggatccg gatttgggga cgtgggggcc 360

ctggagtctc tgcgaggaaa tgccgatctg gcttacatcc tgagcatgga accctgcggc 420

cactgtctga tcattaacaa tgtgaacttc tgcagagaaa gcggactgcg aacacggact 480

ggctccaata ttgactgtga gaagctgcgg agaaggttct ctagtctgca ctttatggtc 540

gaagtgaaag gggatctgac cgccaagaaa atggtgctgg ccctgctgga gctggctcag 600

caggaccatg gagctctgga ttgctgcgtg gtcgtgatcc tgtcccacgg gtgccaggct 660

tctcatctgc agttccccgg agcagtgtac ggaacagacg gctgtcctgt cagcgtggag 720

aagatcgtca acatcttcaa cggcacttct tgccctagtc tgggggggaaa gccaaaactg 780

ttctttatcc aggcctgtgg cggggaacag aaagatcacg gcttcgaggt ggccagcacc 840

agccctgagg acgaatcacc agggagcaac cctgaaccag atgcaactcc attccaggag 900

ggactgagga cctttgacca gctggatgct atctcaagcc tgcccactcc tagtgacatt 960

ttcgtgtctt acagtacctt cccaggcttt gtctcatggc gcgatcccaa gtcagggagc 1020

tggtacgtgg agacactgga cgacatcttt gaacagtggg cccattcaga ggacctgcag 1080

agcctgctgc tgcgagtggc aaacgctgtc tctgtgaagg gcatctacaa acagatgccc 1140

gggtgcttca attttctgag aaagaaactg ttctttaaga cttccggatc tggagaggga 1200

aggggaagcc tgctgacctg tggagacgtg gaggaaaacc caggaccaat ggcactgcca 1260

gtcaccgccc tgctgctgcc tctggctctg ctgctgcacg cagctagacc aatgctgcct 1320

gcaccaaaga acctggtggt gagccggatc acagaggact ccgccagact gtcttggacc 1380

gcccctgacg ccgccttcga ttcctttcca atccggtaca tcgagacact gatctggggc 1440

gaggccatct ggctggacgt gcccggctct gagaggagct acgatctgac aggcctgaag 1500

cctggcaccg agtatgcagt ggtcatcaca ggagtgaagg gcggcaggtt cagctcccct 1560

ctggtggcct cttttaccac aaccacaacc cctgccccca gacctcccac acccgcccct 1620

accatcgcga gtcagcccct gagtctgaga cctgaggcct gcaggccagc tgcaggagga 1680

gctgtgcaca ccaggggcct ggacttcgcc tgcgacatct acatttgggc accactggcc 1740

gggacctgtg gagtgctgct gctgagcctg gtcatcacac tgtactgcaa gagaggcagg 1800

aagaaactgc tgtatatttt caaacagccc ttcatgcgcc ccgtgcagac tacccaggag 1860

gaagacgggt gctcctgtcg attccctgag gaagaggaag gcgggtgtga gctgcgcgtg 1920

aagtttagtc gatcagcaga tgccccagct tacaaacagg gacagaacca gctgtataac 1980

gagctgaatc tgggccgccg agaggaatat gacgtgctgg ataagcggag aggacgcgac 2040

cccgaaatgg gaggcaagcc caggcgcaaa aaccctcagg aaggcctgta taacgagctg 2100

cagaaggaca aaatggcaga agcctattct gagatcggca tgaaggggga gcgacggaga 2160

ggcaaagggc acgatgggct gtaccaggga ctgagcaccg ccacaaagga cacctatgat 2220

gctctgcata tgcaggcact gcctccaagg ggaagtggag aaggacgagg atcactgctg 2280

acatgcggcg acgtggagga aaaccctggc ccaatggtcg ggtctctgaa ttgtatcgtc 2340

gccgtgagtc agaacatggg cattgggaag aatggcgatt tcccatggcc acctctgcgc 2400

aacgagtccc gatactttca gcggatgaca actacctcct ctgtggaagg gaaacagaat 2460

ctggtcatca tgggaaagaa aacttggttc agcattccag agaagaaccg gcccctgaaa 2520

ggcagaatca atctggtgct gtcccgagaa ctgaaggagc caccacaggg agctcacttt 2580

ctgagccggt ccctggacga tgcactgaag ctgacagaac agcctgagct ggccaacaaa 2640

gtcgatatgg tgtggatcgt cgggggaagt tcagtgtata aggaggccat gaatcacccc 2700

ggccatctga aactgttcgt cacacggatc atgcaggact ttgagagcga tactttcttt 2760

cctgaaattg acctggagaa gtacaaactg ctgcccgaat atcctggcgt gctgtccgat 2820

gtccaggaag agaaaggcat caaatacaag ttcgaggtct atgagaagaa tgac 2874

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP12 polypeptide

<400> 23

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro

1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp

20 25 30

Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
100 105

<210> 24

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP12 polypeptide

<400> 24

ggggtccagg tcgagactat ttcaccaggg gatgggcgaa catttccaaa aaggggccag 60

acttgcgtcg tgcattacac cgggatgctg gaggacggga agaaagtgga cagctccagg 120

gatcgcaaca agcccttcaa gttcatgctg ggaaagcagg aagtgatccg aggatgggag 180

gaaggcgtgg cacagatgtc agtcggccag cgggccaaac tgaccattag ccctgactac 240

gcttatggag caacaggcca cccagggatc attccccctc atgccaccct ggtcttcgat 300

gtggaactgc tgaagctgga g 321

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 26

ggaggaggag gatcc 15

<210> 27

<211> 281

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> truncated caspase 9

<400> 27

Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp

1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ile Ser Leu Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile

20 25 30

Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly

35 40 45

Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His

50 55 60

Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu

65 70 75 80

Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys

85 90 95

Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe

100 105 110

Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys

115 120 125

Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys

130 135 140

Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His

145 150 155 160

Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser

165 170 175

Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe

180 185 190

Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe

195 200 205

Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys

210 215 220

Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp

225 230 235 240

Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala

245 250 255

Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Asn Phe Leu

260 265 270

Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser

275 280

<210> 28

<211> 843

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> truncated caspase 9

<400> 28

tttggggacg tgggggccct ggagtctctg cgaggaaatg ccgatctggc ttacatcctg 60

agcatggaac cctgcggcca ctgtctgatc attaacaatg tgaacttctg cagagaaagc 120

ggactgcgaa cacggactgg ctccaatatt gactgtgaga agctgcggag aaggttctct 180

agtctgcact ttatggtcga agtgaaaggg gatctgaccg ccaagaaaat ggtgctggcc 240

ctgctggagc tggctcagca ggaccatgga gctctggatt gctgcgtggt cgtgatcctg 300

tcccacgggt gccaggcttc tcatctgcag ttccccggag cagtgtacgg aacagacggc 360

tgtcctgtca gcgtggagaa gatcgtcaac atcttcaacg gcacttcttg ccctagtctg 420

gggggaaagc caaaactgtt ctttatccag gcctgtggcg gggaacagaa agatcacggc 480

ttcgaggtgg ccagcaccag ccctgaggac gaatcaccag ggagcaaccc tgaaccagat 540

gcaactccat tccaggaggg actgaggacc tttgaccagc tggatgctat ctcaagcctg 600

cccactccta gtgacatttt cgtgtcttac agtaccttcc caggctttgt ctcatggcgc 660

gatcccaagt cagggagctg gtacgtggag acactggacg acatctttga acagtgggcc 720

cattcagagg acctgcagag cctgctgctg cgagtggcaa acgctgtctc tgtgaagggc 780

atctacaaac agatgcccgg gtgcttcaat tttctgagaa agaaactgtt ctttaagact 840

tcc 843

<210> 29

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> inducible proapoptotic polypeptide

<400> 29

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro
1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp
20 25 30

Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala
115 120 125

Asp Leu Ala Tyr Ile Ser Leu Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile
130 135 140

Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr
145 150 155 160

Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu
165 170 175

His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val

180 185 190

Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys

195 200 205

Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln

210 215 220

Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu

225 230 235 240

Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly

245 250 255

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp

260 265 270

His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly

275 280 285

Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr

290 295 300

Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile

305 310 315 320

Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro

325 330 335

Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln

340 345 350

Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn

355 360 365

Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Asn Phe

370 375 380

Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser

385 390

<210> 30

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> inducible proapoptotic polypeptide

<400> 30

ggggtccagg tcgagactat ttcaccaggg gatgggcgaa catttccaaa aaggggccag 60

acttgcgtcg tgcattacac cgggatgctg gaggacggga agaaagtgga cagctccagg 120

gatcgcaaca agcccttcaa gttcatgctg ggaaagcagg aagtgatccg aggatgggag 180

gaaggcgtgg cacagatgtc agtcggccag cgggccaaac tgaccattag ccctgactac 240

gcttatggag caacaggcca cccagggatc attccccctc atgccaccct ggtcttcgat 300

gtggaactgc tgaagctgga gggaggagga ggatccgaat ttggggacgt gggggccctg 360

gagtctctgc gaggaaatgc cgatctggct tacatcctga gcatggaacc ctgcggccac 420

tgtctgatca ttaacaatgt gaacttctgc agagaaagcg gactgcgaac acggactggc 480

tccaatattg actgtgagaa gctgcggaga aggttctcta gtctgcactt tatggtcgaa 540

gtgaaagggg atctgaccgc caagaaaatg gtgctggccc tgctggagct ggctcagcag 600

gaccatggag ctctggattg ctgcgtggtc gtgatcctgt cccacgggtg ccaggcttct 660

catctgcagt tccccggagc agtgtacgga acagacggct gtcctgtcag cgtggagaag 720

atcgtcaaca tcttcaacgg cacttcttgc cctagtctgg ggggaaagcc aaaactgttc 780

tttatccagg cctgtggcgg ggaacagaaa gatcacggct tcgaggtggc cagcaccagc 840

cctgaggacg aatcaccagg gagcaaccct gaaccagatg caactccatt ccaggaggga 900

ctgaggacct ttgaccagct ggatgctatc tcaagcctgc ccactcctag tgacattttc 960

gtgtcttaca gtaccttccc aggctttgtc tcatggcgcg atcccaagtc agggagctgg 1020

tacgtggaga cactggacga catctttgaa cagtgggccc attcagagga cctgcagagc 1080

ctgctgctgc gagtggcaaa cgctgtctct gtgaagggca tctacaaaca gatgcccggg 1140

tgcttcaatt ttctgagaaa gaaactgttc tttaagactt cc 1182

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Thosea asigna virus

<400> 31

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-T2A

<400> 32

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 33

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-T2A

<400> 33

ggatctggag agggaagggg aagcctgctg acctgtggag acgtggagga aaacccagga 60

cca 63

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Equine rhinitis A

<400> 34

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-G2A

<400> 35

Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 36
<211> 22
<212> PRT
<213> FMDV-O
<400> 36
Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 37
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> GSG-F2A
<400> 37
Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15
Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> Porcine Teschovirus
<400> 38
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 39

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-P2A

<400> 39

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 40

<211> 4897

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PB-EF1a vector

<400> 40

tgtacataga ttaaccctag aaagataatc atattgtgac gtacgttaaa gataatcatg 60

cgtaaaattg acgcatgtgt tttatcggtc tgtatatcga ggtttattta ttaatttgaa 120

tagatattaa gttttattat atttacactt acatactaat aataaattca acaaacaatt 180

tatttatgtt tatttattta ttaaaaaaaa acaaaaactc aaaatttctt ctataaagta 240

acaaaacttt tatcgaatac ctgcagcccg ggggatgcag agggacagcc ccccccaaa 300

gcccccaggg atgtaattac gtccctcccc cgctaggggg cagcagcgag ccgcccgggg 360

ctccgctccg gtccggcgct ccccccgcat ccccgagccg gcagcgtgcg gggacagccc 420

gggcacgggg aaggtggcac gggatcgctt tcctctgaac gcttctcgct gctctttgag 480

cctgcagaca cctgggggga tacggggaaa agttgactgt gcctttcgat cgaaccatgg 540

acagttagct ttgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg 600

gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg 660

cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta 720

gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttcc 780

cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa 840

cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt 900

tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacc tggctgcagt acgtgattct 960

tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc 1020

ccctttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat 1080

ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 1140

ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga 1200

tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca 1260

gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta 1320

gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 1380

ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc 1440

cggccctgct gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 1500

gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac 1560

ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc 1620

tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat ggagtttccc cacactgagt gggtggagac 1680

tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1740

tggatcttgg ttcattctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttccatttca 1800

ggtgtcgtga gaattctaat acgactcact atagggtgtg ctgtctcatc attttggcaa 1860

agattggcca ccaagcttgt cctgcaggag ggtcgacgcc tctagacggg cggccgctcc 1920

ggatccacgg gtaccgatca catatgcctt taattaaaca ctagttctat agtgtcacct 1980

aaattcccct tagtgagggt taatggccgt aggccgccag aattgggtcc agacatgata 2040

agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt 2100

tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt 2160

aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt 2220

tcggactcta ggacctgcgc atgcgcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgttt 2280

tccccgtatc cccccaggtg tctgcaggct caaagagcag cgagaagcgt tcagaggaaa 2340

gcgatcccgt gccaccttcc ccgtgcccgg gctgtccccg cacgctgccg gctcggggat 2400

gcgggggggag cgccggaccg gagcggagcc ccgggcggct cgctgctgcc ccctagcggg 2460

ggagggacgt aattacatcc ctgggggctt tgggggggggg ctgtccctct caccgcggtg 2520

gagctccagc ttttgttcga attggggccc cccctcgagg gtatcgatga tatctataac 2580

aagaaaatat atatataata agttatcacg taagtagaac atgaaataac aatataatta 2640

tcgtatgagt taaatcttaa aagtcacgta aaagataatc atgcgtcatt ttgactcacg 2700

cggtcgttat agttcaaaat cagtgacact taccgcattg acaagcacgc ctcacgggag 2760

ctccaagcgg cgactgagat gtcctaaatg cacagcgacg gattcgcgct atttagaaag 2820

agagagcaat atttcaagaa tgcatgcgtc aattttacgc agactatctt tctagggtta 2880

atctagctag ccttaagggc gcctattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga 2940

aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 3000

attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 3060

cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 3120

gcaggaaaga acatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 3180

cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 3240

ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 3300

actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 3360

gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct 3420

ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3480

gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 3540

acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta 3600

tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 3660

gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 3720

cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg 3780

cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg 3840

ccttttgctc acatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3900

tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag tcagaagaac 3960

tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg gagcggcgat accgtaaagc 4020

acgaggaagc ggtcagccca ttcgccgcca agctcttcag caatatcacg ggtagccaac 4080

gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag 4140

cggccatttt ccaccatgat attcggcaag caggcatcgc catgggtcac gacgagatcc 4200

tcgccgtcgg gcatgctcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga 4260

tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc 4320

tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccggatcaag cgtatgcagc 4380

cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaaggtg agatgacagg 4440

agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtccc ttcccgcttc agtgacaacg 4500

tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg 4560

tcttgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc 4620

tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca 4680

tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca 4740

atcataatat tattgaagca tttatcaggg ttcgtctcgt cccggtctcc tcccaatgca 4800

tgtcaatatt ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat caatattggc 4860

tattggccat tgcatacgtt gtatctatat cataata 4897

<210> 41

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Centyrin

<400> 41

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val Lys Gly Gly Arg Phe

65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr

85 90

<210> 42

<211> 334

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 42

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser

20 25 30

Arg Ile Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala

35 40 45

Ala Phe Asp Ser Phe Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly

50 55 60

Glu Ala Ile Trp Leu Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu

65 70 75 80

Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val

85 90 95

Lys Gly Gly Arg Phe Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr Thr

100 105 110

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

115 120 125

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly

130 135 140

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp

145 150 155 160

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile

165 170 175

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

180 185 190

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys

195 200 205

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val

210 215 220

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn

225 230 235 240

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

245 250 255

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

260 265 270

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

275 280 285

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

290 295 300

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

305 310 315 320

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

325 330

<210> 43

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Centyrin

<400> 43

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val Lys Gly Gly Arg Phe

65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr

85 90

<210> 44

<211> 1002

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 44

atggcactgc cagtcaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgcagctaga 60

ccaatgctgc ctgcaccaaa gaacctggtg gtgagccgga tcacagagga ctccgccaga 120

ctgtcttgga ccgcccctga cgccgccttc gattcctttc caatccggta catcgagaca 180

ctgatctggg gcgaggccat ctggctggac gtgcccggct ctgagaggag ctacgatctg 240

acaggcctga agcctggcac cgagtatgca gtggtcatca caggagtgaa gggcggcagg 300

ttcagctccc ctctggtggc ctcttttacc acaaccacaa cccctgcccc cagacctccc 360

acacccgccc ctaccatcgc gagtcagccc ctgagtctga gacctgaggc ctgcaggcca 420

gctgcaggag gagctgtgca caccaggggc ctggacttcg cctgcgacat ctacatttgg 480

gcaccactgg ccgggacctg tggagtgctg ctgctgagcc tggtcatcac actgtactgc 540

aagagaggca ggaagaaact gctgtatatt ttcaaacagc ccttcatgcg ccccgtgcag 600

actacccagg aggaagacgg gtgctcctgt cgattccctg aggaagagga aggcgggtgt 660

gagctgcgcg tgaagtttag tcgatcagca gatgccccag cttacaaaca gggacagaac 720

cagctgtata acgagctgaa tctgggccgc cgagaggaat atgacgtgct ggataagcgg 780

agaggacgcg accccgaaat gggaggcaag cccaggcgca aaaaccctca ggaaggcctg 840

tataacgagc tgcagaagga caaaatggca gaagcctatt ctgagatcgg catgaagggg 900

gagcgacgga gaggcaaagg gcacgatggg ctgtaccagg gactgagcac cgccacaaag 960

gacacctatg atgctctgca tatgcaggca ctgcctccaa gg 1002

<210> 45

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

atggcactgc cagtcaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgcagctaga 60

cca 63