(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0133480
(43) 공개일자 2018년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 5/0783* (2010.01) *A61K 35/12* (2015.01)
*A61K 35/15* (2014.01) *A61K 47/64* (2017.01)
*A61K 48/00* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
*C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 5/0636* (2013.01)
*A61K 35/15* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7032542
(22) 출원일자(국제) 2017년04월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년11월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/027767
(87) 국제공개번호 WO 2017/181110
국제공개일자 2017년10월19일
(30) 우선권주장
62/322,581 2016년04월14일 미국(US)
62/442,890 2017년01월05일 미국(US)

(71) 출원인
**프레드 헛친슨 켄서 리서치 센터**
미국 워싱턴 98109, 시애틀, 1100 페어뷰 애버뉴 엔.,
(72) 발명자
**스테판, 마티아스**
미국 98109 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애버뉴 노스 1100
**모페트, 호웰 에프.**
미국 98109 워싱턴주 시애틀 페어뷰 애버뉴 노스 1100
(74) 대리인
**양영준, 김영**

전체 청구항 수 : 총 102 항

(54) 발명의 명칭 **표적화 핵산 나노수송체를 이용하여 치료 세포를 프로그램화하기 위한 조성물 및 방법**

## (57) 요 약

조혈모세포(또는 이로부터 유래한 세포)를 빠르고 선별적으로 변형시켜 핵산의 일시적인 발현을 제공함으로써 치료적 목적을 성취하기 위한 조성물 및 방법이 기술된다. 일시적인 발현은 변형된 세포에서 본 명세서에서 "히트 앤드 런(hit and run)" 효과로 지칭되는 영구적인 치료적 변화를 야기한다.

(52) CPC특허분류
*A61K 47/6455* (2017.08)
*A61K 48/0025* (2013.01)
*A61K 48/005* (2013.01)
*C07K 16/2809* (2013.01)
*C07K 16/2812* (2013.01)
*C07K 16/2815* (2013.01)
*C07K 16/2818* (2013.01)
*C12N 9/22* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

개체에게 투여하기 위한 조혈 유래의 선택된 세포 집단을 제조하는 방법이되 상기 방법은:

개체로부터 샘플을 수득하는 단계 여기서 샘플은 조혈 유래의 선택된 세포 집단을 포함하는 세포의 이종 혼합물을 포함함;

다음을 포함하는 합성 나노수송체에 샘플을 노출시키는 단계를 포함하고

(i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

(ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

(iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

여기서 노출시키는 단계는 선택된 세포 집단으로의 나노수송체의 선별적 송달을 야기하여 선택된 세포 집단 내에 세포 변형을 생성하고; 및 샘플 내에서 세포를 증식시키고;

이를 통해 개체에게 투여하기 위한 선택된 세포 집단을 제조하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하고 수용체-유도 엔도사이토시스를 개시하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서 샘플 내 증식된 세포는 선택된 세포 집단의 변형된 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서 제조된 선택된 세포 집단을 세포-기반 조성물로 제형화하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서 세포-기반 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서 노출시키기 전에 세포의 이종 혼합물에서 선택된 세포 집단의 백분율을 증가시키기 위한 단리 단계가 없거나 제한된 단리 단계만 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서 합성 핵산은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN); 메가TAL; 및/또는 아연 집게 뉴클레아제 중에서 선택된 유전자 편집 물질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서 합성 핵산은 서열 번호: 1의 메가TAL을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서 유전자 편집 물질은 Shp-1 포스파타제, PD1 수용체, T 세포 수용체 (TCR), CCR5 및/또는 CXCR4를 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서 유전자 편집 물질은 TCRα 사슬을 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서 합성 핵산은 전사 인자, 키나아제, 및/또는 세포 표면 수용체 중에서 선택된 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서 표현형-개조 단백질은 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b, 및/또는 CCR4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하고 수용체-유도 엔도사이토시스를 개시하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서 이종 세포 집단은 생체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제13항에 있어서 이종 세포 집단은 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T 세포, NK 세포, 단핵백혈구, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈모세포, 또는 이들의 조합에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 수용체 리간드, 림프구 수용체 항체, 림프구 수용체 펩티드 압타머, 림프구 수용체 핵산 압타머, 림프구 수용체 거울상 압타머, 또는 이들의 조합 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ 사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 또는 트랜스페린 수용체에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD69; CD62L; CD80; CD95; CD127; CD137; CD209; 또는 DEC-205에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52

항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서 결합 도메인은 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체의 scFv 단편으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서 합성 핵산은 합성 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서 수송체는 양으로 하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서 양으로 하전된 중합체는 폴리(β-아미노 에스테르, 폴리(L-라이신), 폴리(에틸렌 이민) (PEI), 폴리-(아미도아민) 덴드리머 (PAMAM), 폴리(아민-co-에스테르), 폴리(디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 키토산, 폴리-(L-락티드-co-L-라이신), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산] (PAGA), 또는 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) (PHP)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 25**

제1항에 있어서 코팅은 중성 또는 음으로-하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 26**

제24항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 폴리글루탐산 (PGA), 폴리(아크릴산), 알긴 산, 또는 콜레스테릴 헤미석시네이트/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 27**

제24항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 쌍이온성 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 28**

제24항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 리포좀을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 29**

제27항에 있어서 리포좀은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디옥타데실-아미도 글리실스페민 (DOGS), 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 30**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 및/또는 CD8에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 31**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 32**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체의 scFv 단편 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 33**

제1항에 있어서 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 34**

제1항에 있어서 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 35**

제1항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하고; 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하고; 및 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 36**

개체를 치료하기 위한 세포를 제조하는 방법이되 상기 방법은:

개체로부터 림프구를 수득하는 단계;

다음을 포함하는 합성 나노수송체와 림프구를 조합하는 단계를 포함하고

(i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

(ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

(iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

여기서 조합 후 나노수송체는 림프구에 선별적으로 도입되어 림프구가 핵산을 일시적으로 발현하게 하는 방법.

**청구항 37**

제35항에 있어서 림프구를 증식시키는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 38**

제35항에 있어서 림프구를 세포-기반 조성물로 제형화하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 39**

제35항에 있어서 노출시키기 전에 세포의 이종 혼합물에서 선택된 세포 집단의 백분율을 증가시키기 위한 단리 단계가 없거나 제한된 단리 단계만 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 40**

제35항에 있어서 합성 핵산은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN); 메가TAL; 및/또는 아연 집게 뉴클레아제 중에서 선택된 유전자 편집 물질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 41**

제35항에 있어서 합성 핵산은 서열 번호: 1의 메가TAL을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 42**

제35항에 있어서 유전자 편집 물질은 Shp-1 포스파타제, PD1 수용체, T 세포 수용체 (TCR), CCR5 및/또는 CXCR4

를 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 43**

제35항에 있어서 유전자 편집 물질은 TCRα 사슬을 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 44**

제35항에 있어서 합성 핵산은 전사 인자, 키나아제, 및/또는 세포 표면 수용체 중에서 선택된 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 45**

제35항에 있어서 표현형-개조 단백질은 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b, 및/또는 CCR4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 46**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 47**

제45항에 있어서 이종 세포 집단은 생체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 48**

제45항에 있어서 이종 세포 집단은 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 49**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T 세포, NK 세포, 단핵백혈구, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈모세포, 또는 이들의 조합에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 50**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 수용체 리간드, 림프구 수용체 항체, 림프구 수용체 펩티드 압타머, 림프구 수용체 핵산 압타머, 림프구 수용체 거울상 압타머, 또는 이들의 조합 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 51**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ 사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 또는 트랜스페린 수용체에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 52**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD62L; CD69; CD80; CD95; CD127; CD137; CD209; 또는 DEC-205에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 53**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5

항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 54**

제35항에 있어서 결합 도메인은 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체의 scFv 단편으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 55**

제35항에 있어서 합성 핵산은 합성 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 56**

제35항에 있어서 수송체는 양으로 하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 57**

제55항에 있어서 양으로 하전된 지질 또는 중합체는 폴리(β-아미노 에스테르, 폴리(L-라이신), 폴리(에틸렌 이민) (PEI), 폴리-(아미도아민) 덴드리머 (PAMAM), 폴리(아민-co-에스테르), 폴리(디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 키토산, 폴리-(L-락티드-co-L-라이신), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산] (PAGA), 또는 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) (PHP)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 58**

제55항에 있어서 코팅은 중성 또는 음으로-하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 59**

제57항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 폴리글루탐산 (PGA), 폴리(아크릴산), 알긴 산, 또는 콜레스테릴 헤미석시네이트/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 60**

제57항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 쌍이온성 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 61**

제57항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 리포좀을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 62**

제60항에 있어서 리포좀은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디옥타데실-아미도 글리실스페민 (DOGS), 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 63**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 및/또는 CD8에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 64**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 65**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체의 scFv 단편 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 66**

제35항에 있어서 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 67**

제35항에 있어서 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 68**

제35항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하고; 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하고; 및 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 69**

다음을 포함하는 나노수송체에 의해 세포로 선별적으로 송달된 핵산의 일시적인 발현에 의해 변형된 세포의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 방법이되:

(i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

(ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

(iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

여기서 조합 후 나노수송체는 림프구에 선별적으로 도입되어 림프구가 핵산을 일시적으로 발현하게 하고

이를 통해 이를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법.

**청구항 70**

개체에게 투여하기 위한 선택된 세포 집단을 제조하는 방법이되 상기 방법은:

개체로부터 샘플을 수득하는 단계 여기서 샘플은 선택된 세포 집단을 포함하는 세포의 이종 혼합물을 포함함;

다음을 포함하는 합성 나노수송체에 샘플을 노출시키는 단계를 포함하고

(i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

(ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

(iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

여기서 노출시키는 단계는 선택된 세포 집단으로의 나노수송체의 선별적 송달을 야기하여 선택된 세포 집단 내에 세포 변형을 생성하고; 및

샘플 내에서 세포를 증식시키고;

이를 통해 개체에게 투여하기 위한 선택된 세포 집단을 제조하는 방법.

**청구항 71**

다음을 포함하는 합성 나노수송체

(i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 핵산 여기서 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

(ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

(iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

**청구항 72**

제70항에 있어서 합성 핵산은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN); 메가TAL; 및/또는 아연 집게 뉴클레아제 중에서 선택된 유전자 편집 물질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 73**

제70항에 있어서 합성 핵산은 서열 번호: 1의 메가TAL을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 74**

제70항에 있어서 유전자 편집 물질은 Shp-1 포스파타제, PD1 수용체, T 세포 수용체 (TCR), CCR5 및/또는 CXCR4를 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 75**

제70항에 있어서 유전자 편집 물질은 TCRα 사슬을 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 76**

제70항에 있어서 합성 핵산은 전사 인자, 키나아제, 및/또는 세포 표면 수용체 중에서 선택된 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 77**

제70항에 있어서 표현형-개조 단백질은 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b, 및/또는 CCR4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 78**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 79**

제77항에 있어서 이종 세포 집단은 생체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 80**

제77항에 있어서 이종 세포 집단은 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 81**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T 세포, NK 세포, 단핵백혈구, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈모세포, 또는 이들의 조합에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 82**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 수용체 리간드, 림프구 수용체 항체, 림프구 수용체 펩티드 압타머, 림프구 수용체 핵산 압타머, 림프구 수용체 거울상 압타머, 또는 이들의 조합 중에서 선택된 결합 도메

인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 83**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ 사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 또는 트랜스페린 수용체에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 84**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD62L; CD69; CD80; CD95; CD127; CD137, CD209 또는 DEC-205에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 85**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 86**

제70항에 있어서 결합 도메인은 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체의 scFv 단편으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 87**

제70항에 있어서 합성 핵산은 합성 mRNA인 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 88**

제70항에 있어서 수송체는 양으로 하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 89**

제87항에 있어서 양으로 하전된 지질 또는 중합체는 폴리(β-아미노 에스테르, 폴리(L-라이신), 폴리(에틸렌 이민) (PEI), 폴리-(아미도아민) 덴드리머 (PAMAM), 폴리(아민-co-에스테르), 폴리(디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 키토산, 폴리-(L-락티드-co-L-라이신), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산] (PAGA), 또는 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) (PHP)를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 90**

제70항에 있어서 코팅은 중성 또는 음으로-하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 91**

제89항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 폴리글루탐산 (PGA), 폴리(아크릴산), 알긴 산, 또는 콜레스테릴 헤미석시네이트/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 92**

제89항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 쌍이온성 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 93**

제89항에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 리포좀을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 94**

제92항에 있어서 리포좀은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디옥타데실-아미도글리실스페민 (DOGS), 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 95**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 및/또는 CD8에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 96**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 97**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체의 scFv 단편 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 98**

제70항에 있어서 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 99**

제70항에 있어서 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 100**

제70항에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하고; 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하고; 및 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

**청구항 101**

제70항의 합성 나노수송체를 포함하는 조성물.

**청구항 102**

이를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법이되 제70항의 나노수송체 또는 제100항의 조성물의 치료적으로 효과적

인 양을 투여하는 단계를 포함하고 이를 통해 이를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 1월 5일에 출원된 US 가출원 특허 제62/442,890호 및 2016년 4월 14일에 출원된 US 가출원 특허 제62/322,581호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본 명세서에 참고로서 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 개시는 조혈모세포(또는 이로부터 유래한 세포)를 빠르고 선별적으로 변형시켜 핵산의 일시적인 발현을 제공함으로써 치료적 목적을 성취하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일시적인 발현은 변형된 세포에서 본 명세서에서 "히트 앤드 런(hit and run)" 효과로 지칭되는 영구적인 치료적 변화를 야기한다. 이 방법은 배양된 세포에서 또는 인시추로 실시될 수 있다.

### 배 경 기 술

[0005] 발명의 배경

[0006] 성공적인 유전자 치료는 선택된 관심 세포로의 성공적인 유전자 송달 메커니즘에 의존적이다. 현재, 가령 렌티바이러스 벡터를 이용하는 부류의 바이러스 시스템은 장기-지속 유전자 치료를 성취하기 위한 가장 일반적인 방식이다. 이들 유전자 요법은 치료적 가치를 지닌 단백질의 지속적인 세포 발현에 의존한다. 그러한 바이러스 시스템이 유전자 요법을 위한 유전자를 효과적으로 송달할 수 있는 반면, 이들은 비-선택적이고, 비용이 많이 들며 널리 이용가능하지 못하다. 게다가, 지속적인 치료 단백질의 발현은 시간이 지나면서 일어나는 세포 현상으로 인해 점차 감소할 수 있다.

[0007] 전기천공이 또한 유전자 요법을 위해 세포로 유전자를 송달하기 위한 메커니즘으로 개발된 바 있다. 전기천공은, 그러나, 기계적인 파괴 및 세포막의 투과화에 의존하며, 따라서 세포의 생존능을 양보하여, 치료적 사용에 있어서 이들 세포를 덜 이상적이 되게 한다. 게다가, 바이러스-기반 방법처럼, 전기천공은 이종 풀 중에서 특정한 세포 유형에게 선별적으로 유전자를 송달하지 못하며, 따라서 세포 선별 및 정제 과정이 선행되어야 한다.

### 발명의 내용

[0008] 발명의 요약

[0009] 본 개시는 조혈모세포(또는 이로부터 유래한 세포)를 빠르고 선별적으로 변형시켜 핵산의 일시적인 발현을 제공함으로써 치료적 목적을 성취하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일시적인 발현은 변형된 세포에서 본 명세서에서 "히트 앤드 런(hit and run)" 효과로 지칭되는 영구적인 치료적 변화를 야기한다. 지속적인 치료적 효과를 얻기 위해서는 일시적인 발현만 요구되기 때문에, 시간에 따른 치료적 단백질 발현 감소에 대한 우려가 극복된다. 게다가, 본 조성물 및 방법은 선택된 세포 유형을 선별적으로 변형시키므로, 변형 전에 세포 선별 또는 정제 과정이 요구되지 않는다. 이는 생체외에서의 치료적 세포의 제조를 촉진하고 또한 생체 내 세포의 표적화 유전자 변형을 가능하게 한다.

[0010] 본 명세서에 기술된 히트 앤드 런 효과는 유전자 편집을 유도하는 핵산의 일시적인 발현 또는 세포의 표현형을 영구히 개조하는 단백질의 일시적인 발현을 이용함으로써 가능하게 된다. 유전자 편집을 유도하는 핵산의 예시는 TALEN, 메가TALS, 아연 집게 뉴클레아제 및 CRISPR-Cas 시스템을 포함한다. 표현형 개조 단백질의 예시는 전사 인자, 키나아제, 및 세포 표면 수용체를 포함한다.

[0011] 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에 있어서 수많은 응용이 존재한다. 배양 세포에서의 예시는 조혈 세포 (조혈모세포 포함)의 유전자를 표적화 뉴클레아제로 편집; 특정 전사 인자를 일시적으로 발현시켜 입양 전달된 세포에서 치료적으로 요망되는 표현형을 출력, 텔로머라제 역전사효소 또는 항-아폽토시스 유전자를 발현시켜 이입 전달된 세포에서 세포 노화를 감소, 또는 케모카인 수용체의 발현을 통해 이들의 고유한 세포 향성을 개조하는 것을 포함한다. 인시추 예시는 수지상 세포를 선별적으로 형질감염시켜 이들의 항원 제시 능력을 촉진하는 핵산-로딩된 수송체를 동시-주입함으로써 백신의 효능을 증대; 또는 백신-감작 T 세포를 형질감염시켜 장기 기

억 표현형을 유도하는 것을 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

[0012] 도면의 간단한 설명

본 명세서에 제출된 도면 대다수는 컬러인 편이 더 이해하기 쉬우나 출원 시점의 특허 출원 공보에는 사용할 수 없었다. 출원인은 도면의 컬러 버전을 원 제출된 출원의 일부로서 생각하며 이후 절차에서 도면의 컬러 이미지를 제출할 권리를 보유한다.

도 1A-1C. 치료적 T 세포를 유전적으로 프로그램화하기 위한 mRNA 나노수송체의 생성. (도 1A) 어떻게 배양된 T 세포가 중합체 나노입자에 의해 수송되는 치료적으로 관련된 전이유전자를 발현하도록 프로그램될 수 있는지에 대한 도식적 설명. 이들 입자는 리간드로 코팅되어 특정한 세포 유형을 표적으로 하게 되고, 이는 이들로 하여금 이들의 mRNA 화물을 주입하게 하고 표적 세포가 선택된 단백질 (유사 전사 인자 또는 유전체-편집 물질)을 발현하게 만든다. (도 1B) 표적화 mRNA-수송 나노입자의 설계. 삽도는 대표적인 나노입자의 투과 전자 현미경 이미지를 나타낸다; 스케일 막대, 50 nm. 또한 도시된 것은 나노입자 내에 봉입된 합성 mRNA이다. 도 1C. 유전자 편집 물질, 표현형-개조 단백질, 표적화 유전자의 예시, 및 이들의 용도가 본 명세서에 개시된 구체예에서 사용될 수 있다.

도 2. 유세포 분석 항체.

도 3A-3C. mRNA-로딩된 나노입자의 물리적 특성. (도 3A) 개별적인 입자의 한정된 트랙 길이 조정 크기 분포. (도 3B) 단일 나노입자 (왼쪽, 스케일 막대 = 100 nm) 및 한 나노입자 집단(우측, 스케일 막대 = 2 μm)의 투과 전자 현미경. (도 3C) PBS pH 7.4 내에 1:40으로 희석 후(n=5) 측정한, 항체(+PGA-Ab)와 커플링된 PGA로 코팅된 것들과 비교한 대조 나노입자(-PGA-Ab)의 제타 전위.

도 4A-4D. mRNA 나노입자 형질감염은 최소의 세포 처리를 필요로 하며 세포의 생존능에는 영향을 미치지 않고 림프구에 의한 강한 전이유전자 발현을 연출한다. (도 4A) 원발성 T 세포를 Cy5-표지된 mRNA를 수송하는 CD3-표적화 중합체 나노입자와 혼합하였다. 공초점 현미경 사진은 세포 표면으로부터 이들 입자가 빠르게 내부화되는 것을 확증하였다. 사진은 15개의 무작위 선택된 영역을 나타낸다. (도 4B) eGFP-인코딩 mRNA를 내포하는 CD3-표적화 나노입자와 함께 배양하고 24h 후 T 세포의 유세포 분석. (도 4C, 도 4D) 전기천공 및 나노입자 유전자 송달이 세포 증식에 미친 효과의 비교. 왼쪽 패널은 나노입자 (상단) 및 전기천공 (하단)을 이용한 형질감염의 작업 과정을 나타낸다. 우측 패널은 제0 및 12일에 촉진 비드로 처리된 세 가지 독립적 공여체로부터의 PBMC 배양물의 -배 증식을 나타낸다. 각각의 공여체로부터 매칭된 배양물은 미처리된, 또는 제5 및 12일에 CD3/CD28-표적화 나노입자로 (도 4C, 우측) 또는 전기천공을 통해 (도 4D, 우측) 형질감염된 것이다. 모든 선은 하나의 공여체를 나타내며 각각의 점은 -배 T 세포 증식을 나타낸다. 집단간 쌍방식 차이를 스튜던트의 t 시험으로 분석하였다; ns, 비-유의미; *, 유의미, n=3).

도 5A, 5B. 나노입자 형질감염은 빠르며 동결건조에 의해 오염되지 않는다. (도 5A) 미처리된, 또는 항-CD3로 표적화시킨 eGFP-인코딩 NP를 부가하고 5 h 후 측정된 $10^6$ 활성화 T 세포 내 eGFP 발현. (도 5B) NP의 형질감염 효율은 동결건조 및 재현탁 후에도 유지된다. 조건당 $10^6$ 활성화 T 세포를 갓 제조된, 또는 동결건조시키고, -80℃에 저장했다가, 이후 본래의 부피로 현탁시킨 NP (항-CD3 또는 항-CD8 항체를 통해 표적화)로 형질감염시켰다.

도 6. 나노입자 형질감염 및 전기천공된 T 세포의 상대 생존능. 조건당 $2x10^6$ 활성화 T 세포의 샘플은 미처리된 것, NP로 형질감염된 것, 또는 도 2C에 기술된 바와 같이 전기천공된 것이었다. 처리 18 h 후, 세포를 형광 염료로 표지하여 생존능을 평가하였다. 여기에 제시된 결과는 세 가지 개별 실험을 나타낸다.

도 7A-7H TCRα-표적화 메가TAL 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA를 수송하는 나노수송체는 CAR-프로그램화 림프구에서 T 세포 수용체를 넉아웃시킬 수 있다. (도 7A) CAR-T 세포의 일반적 제조로의 나노입자 형질감염의 통합. 항-CD3/CD28- 코팅된 비드로의 자극(제0일) 후, CD8-표적화 mRNA NP를 제1 및 2일에 도입하고, 이후 백혈병-특이적 19-41BBζCAR을 인코딩하는 벡터를 이용한 렌티바이러스 형질도입을 제3일에 수행하였다. 메가TAL 뉴클레아제 더하기 eGFP를 인코딩하는 mRNA를 수송하는 NP, 또는 eGFP mRNA 단독으로 로딩된 대조 입자를 부가하였다. (도 7B) NP 형질감염 효율의 유세포 분석 (eGFP 신호 기준)을 NP 처리 후 T 세포에 의한 TCR의 표면 발현 수준 (CD3 신호 기준)과 상호연관시킨 것. (도 7C) 제14일에 CD3 표면 발현의 손실로 측정한 편집 효율을 나타내는

요약 도표 (n=5). (도 7D) 서베이어 어세이로 확인한 TCRα 사슬 유전자 좌위 방해. (도 7E) 유전체- 편집된 세포 대비 대조 T 세포에서 렌티바이러스 형질도입의 유세포 분석. (도 7F) 방사선조사된 TM-LCL 백혈병 세포에서 동시-배양된 TCR+ (대조) 및 TCR- (mTAL NP-처리) CAR-T 세포의 증식. (도 7G) CD19-K562 표적 세포의 CAR-T 세포에 의한 용해에 대한 세포독성 어세이. (도 7H) PMA 및 이오노마이신 (P/I)으로의 자극 후 IL-2 및 IFN-γ의 세포내 사이토킨 발현.

도 8A-8F. Foxo13A 전사 인자를 인코딩하는 mRNA를 가진 나노수송체는 CD8+ 중앙 기억 T 세포의 표면 마커 및 전사 패턴 특징을 유도한다. (도 8A) CD3-표적화 대조 (GFP+) 또는 Foxo13A-GFP NP로 처리된 Jurkat 및 원발성 T 세포에서 세포내 표지에 의해 측정된 총 Foxo1 단백질의 발현. (도 8B) 세포를 Foxo13A-eGFP NP에 노출시킨 후 시간에 따른 상대 Foxo13A mRNA 발현의 qPCR 측정. 입자 처리 24 h 후 CD62L 발현에 대한 CD8-표적화 Foxo13A-GFP NP의 효과. (도 8D) 입자를 도입한 후 제1, 8, 및 20일에 CD8- 표적화 대조 또는 Foxo13A/eGFP-인코딩 NP로 처리된 분류된 CD8+ eGFP+ 세포 내 CD62L+ 세포의 백분율. 이들 결과는 3가지 독립적인 공여체로부터 온 것이다. 표시된 조건 사이의 * P<0.05; ** P <0.01은 비-매칭 t-시험으로부터 산출한 것. (도 8E) 처리 8일 후 TCM, 미경험, 및 대조 세포에서의 TCM 시그니처 유전자 발현의 히트맵. (도 8F) 8일 후 Foxo13A NP-처리된 세포에서의 차등한 유전자 발현의 볼케이노 플롯. TCM 시그니처 유전자 및 선택된 기억 표현형 유전자가 표시된다. Foxo13A 및 TCM 시그니처 유전자 집합 사이의 중첩 P값을 GSEA로(도 9B에 나타난 분석을 통해) 측정하였다.

도 9A, 9B. 유전자 집합 농축은 TCM 및 Foxo13A 나노입자-처리된 세포 사이에 강한 상관관계를 드러냈다. (도 9A) 처리 8일 후 TCM, 미경험, 및 대조 세포에서의 TCM 하단 시그니처 유전자 발현의 히트맵. (도 9B) TCM-상단 및 TCM-하단 시그니처 유전자 집합에 대해 시험된 Foxo13A NP-처리된 대비 대조 NP-처리된 세포에서 차등적으로 발현된 유전자의 유전자 집합 농축 분석.

도 10A-10D. mRNA 나노수송체는 증식 또는 표현형에 대한 최소의 효과와 함께 CD34+ 인간 조혈모세포의 특이적 형질감염을 가능하게 한다. (도 10A) CD105의 표적화는 이동된 PBSC로부터 수득된 HSC CD34+ 세포의 특이적 형질감염을 가능하게 한다. 이들 세포는 미처리된 상태로 두었거나, 또는 비-특이적 대조 항체 (대조 Ab-eGFP NP) 또는 항-CD105 (α-CD105 NP)에 커플링된 PGA로 코팅된 NP에서 eGFP-인코딩 mRNA로 형질감염되었다. 형질감염 효율을 NP 노출 24 h 후 유세포 분석기로 분석하였다. (도 10B) 3가지 독립적인 공여체로부터의 CD34+ 샘플에서 NP 형질감염 효율. (도 10C) 대조 또는 CD105-표적화 NP의 부가 후 CD34+ HSC의 시험관 내 증식. 세포를 도 10A에서처럼 형질감염시키고, 이후 입자 노출 후 제0, 4 및 8일에 총 세포 수를 측정하였다. (도 10D) 배양 8일 후 미형질감염된 세포 (파선) 또는 항-CD105 mRNA로 처리된 세포 (실선)에서 HSC 마커 CD34, CD133 및 CD49f의 유세포 분석. 결과는 NP의 부가가 핵심 줄기 세포 마커의 표면 발현을 변형시키지 않음을 시사한다.

도 11. 예시적인 보충 서열.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0013] 상세한 설명

[0014] 성공적인 유전자 치료는 선택된 관심 세포로의 성공적인 유전자 송달 메커니즘에 의존적이다. 현재, 가령 렌티바이러스 벡터를 이용하는 부류의 바이러스 시스템은 장기-지속 유전자 치료를 성취하기 위한 가장 일반적인 방식이다. 이들 유전자 요법은 치료적 가치를 지닌 단백질의 지속적인 세포 발현에 의존한다. 그러한 바이러스 시스템이 유전자 요법을 위한 유전자를 효과적으로 송달할 수 있는 반면, 이들은 비-선택적이고, 비용이 많이 들며 널리 이용가능하지 못하다. 게다가, 지속적인 치료 단백질의 발현은 시간이 지나면서 일어나는 세포 현상으로 인해 점차 감소할 수 있다.

[0015] 전기천공이 또한 유전자 요법을 위해 세포로 유전자를 송달하기 위한 메커니즘으로 개발된 바 있다. 전기천공은, 그러나, 기계적인 파괴 및 세포막의 투과화에 의존하며, 따라서 세포의 생존능을 양보하여, 치료적 사용에 있어서 이들 세포를 덜 이상적이 되게 한다. 게다가, 바이러스-기반 방법처럼, 전기천공은 이종 풀 중에서 특정한 세포 유형에게 선별적으로 유전자를 송달하지 못하며, 따라서 세포 선별 및 정제 과정이 선행되어야 한다.

[0016] 본 개시는 세포를 빠르고 선별적으로 변형시켜 핵산의 일시적인 발현을 제공함으로써 치료적 목적을 성취하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일시적인 발현은 변형된 세포에서 본 명세서에서 "히트 앤드 런" 효과로 지칭되는 영구적인 치료적 변화를 야기한다. 지속적인 치료적 효과를 얻기 위해서는 일시적인 발현만 요구되기 때문에, 시간에 따른 치료적 단백질 발현 감소에 대한 우려가 극복된다. 게다가, 본 조성물 및 방법은 선택된 세포 유형을 선별적으로 변형시키므로, 변형 전에 세포 선별 또는 정제 과정이 요구되지 않는다. 이는 생체외에서의

치료적 세포의 제조를 촉진하고 또한 생체 내 세포의 표적화 유전자 변형을 가능하게 한다.

[0017] 본 명세서에 기술된 히트 앤드 런 효과는 유전자 편집을 유도하는 핵산의 일시적인 발현 또는 세포의 표현형을 영구히 개조하는 단백질의 일시적인 발현을 이용함으로써 가능하게 된다. 유전자 편집을 유도하는 핵산의 예시는 TALEN, 메가TALS, 아연 집게 뉴클레아제 및 CRISPR-Cas 시스템을 포함한다. 세포의 표현형을 영구적으로 개조하는 단백질의 예시는 전사 인자, 키나아제, 및 세포 표면 수용체를 포함한다. 일시적인 발현은 세포로의 핵산 전이 후 짧은 기간에 걸쳐 재조합 유전자 산물이 생산되는 것을 가리킨다. 특정한 구체예에서, 일시적인 발현은 12 시간 내지 20 일; 18 시간 내지 18 일; 24 시간 내지 14 일; 또는 36 시간 내지 10 일 유지된다. 세포의 표현형은 이의 물리적 특징 및/또는 신체 내 이의 위치를 가리킨다.

[0018] 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에 있어서 수많은 응용이 존재한다. 예시는 표적화 뉴클레아제를 이용하여 림프구 (예컨대, 조혈모세포 (HSC))의 유전체를 편집; 수지상 세포를 형질감염시켜 이들의 항원 제시 능력을 촉진하는 핵산-로딩된 수송체를 동시-주입함으로써 백신의 효능 증대; 및 백신-감작 T 세포를 형질감염시켜 장기 기억 표현형을 유도하는 것을 포함한다.

[0019] 특정한 구체예는 선택된 특정 세포에 표적화될 수 있는 나노수송체 및 나노수송체를 배양물 내 세포와 생체외로 또는 개체 내 세포와, 생체 내로 단순히 혼합함으로써 핵산의 용량-제어된 송달을 달성하는 것을 포함한다. 특정한 구체예에서, 나노수송체는: (1) 선택 세포 표적화 리간드; (2) 수송체; 및 (3) 수송체 내부의 핵산을 포함한다. 특정한 구체예는 (1) 선택 세포 표적화 리간드; (2) 수송체; (3) 수송체 내부의 핵산; 및 (4) 코팅을 포함하는 나노수송체를 포함한다.

[0020] 특정한 구체예에서, 선택 세포 표적화 리간드는 나노수송체를 선택된 세포에 선별적으로 결합시키고 이들을 내부화하는 빠른 수용체-유도 엔도사이토시스를 개시하는 표면-고정 표적화 리간드를 포함할 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 더 자세히 개시되는 바와 같이, 선택 세포 표적화 리간드는 항체, scFv 단백질, DART 분자, 펩티드, 및/또는 압타머를 포함할 수 있다. 특정한 구체예는 인간 T 세포를 형질감염시키는 항-CD8 항체, 및 CD34, CD133, 또는 CD46를 인식하여 HSC를 표적으로 하는 항체를 이용한다.

[0021] 특정한 구체예에서, 수송체는 핵산을 응축시키고 효소적 분해로부터 보호하는 수송체 분자를 포함한다. 본 명세서의 다른 곳에서 더 자세히 개시되는 바와 같이, 수송체는 양으로 하전된 지질 및/또는 중합체를 포함할 수 있다. 특정한 구체예는 폴리(β-아미노 에스테르)를 이용한다.

[0022] 특정한 구체예에서, 핵산은 수송체 내에 봉입되어 있고, 선택된 세포에 의한 세포 흡수 후, 유전자-편집 물질 및/또는 세포의 표현형을 영구적으로 개조하는 단백질을 발현한다. 본 명세서의 다른 곳에서 더 자세히 개시되는 바와 같이, 핵산은 메가TAL 또는 전사 인자를 발현하는 합성 mRNA를 포함할 수 있다. 특정한 구체예는 (i) 기억 CD8 T 세포를 유도하는 전사 인자 FOXO1; 또는 (ii) 림프구에 의한 T 세포 수용체 발현을 방해하는 희소-절단(rare-cleaving) 메가TAL 뉴클레아제 (예컨대, Boissel & Scharenberg, Methods Mol. Biol. 1239, 171-196 (2015)를 참조)를 발현하는 시험관 내-전사된 mRNA (예컨대, Grudzien-Nogalska 등, Methods Mol. Biol. 969, 55-72 (2013)을 참조)를 이용한다.

[0023] 특정한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 나노수송체는 봉입된 핵산을 보호하고 표적-이탈 결합을 감소 또는 방지하는 코팅을 포함한다. 표적-이탈 결합은 나노수송체의 표면 전하를 중성 또는 음으로 환원시킴으로써 감소 또는 방지된다. 본 명세서의 다른 곳에서 더 자세히 개시되는 바와 같이, 코팅은 중성 또는 음으로 하전된 중합체- 및/또는 리포좀-기반 코팅을 포함할 수 있다. 특정한 구체예는 나노수송체 코팅으로서 폴리글루탐산(PGA)을 이용한다. 사용된 경우, 코팅이 나노수송체를 전부 코팅할 필요는 없지만, 나노수송체에 의한 표적-이탈 결합을 감소하기에 충분해야 한다.

[0024] 개시된 나노수송체가 세포의 이종 혼합물 (예컨대, 생체외 세포 배양물 또는 생체 내 환경)에 부가되는 경우, 조작된 나노수송체는 선택된 세포 집단에 결합하고 수용체-매개 엔도사이토시스를 촉진하며; 이러한 과정은 이들이 수송하는 핵산 (예컨대, 합성 mRNA)의 침입을 가능하게 하고, 결과적으로 선택된 세포는 인코딩된 분자를 발현하기 시작한다 (도 1A). 핵 수송 및 전이유전자의 전사가 요구되지 않으므로, 이러한 과정은 빠르고 효율적이다. 필요시, 요망되는 결과가 얻어질 때까지 나노수송체의 추가적인 적용이 수행될 수 있다. 특정한 구체예에서, 나노수송체는 생분해가능하고 생체적합성이며, 및, 생체외 세포 제조에서, 변형된 세포는 치료를 위해 개체에 주입되기 전에 원심분리에 의해 미결합 나노입자로부터 손쉽게 분리될 수 있다.

[0025] 특정한 구체예에서, 빠르다는 것은 본 명세서에 개시된 나노수송체에 세포의 이종 샘플을 노출시키고 24 시간 이내 또는 12 시간 이내에 선택된 세포 유형 내에서 인코딩된 핵산의 발현이 시작되는 것을 의미한다. 이러한

시간전개는 표적화 세포의 세포질로의 방출과 거의 동시에(예컨대, 수 분 이내) 전사를 시작하는 mRNA와 같은 핵산을 이용하면 가능하다.

[0026] 특정한 구체예에서, 효율적이라는 것은 표적화 세포 (예컨대, 원발성 인간 T 세포)로의 유전자 전이가 >80%이고 표현형 변형이 이들 세포의 적어도 80%, 이들 세포의 적어도 90% 또는 이들 세포의 100%에서 일어나는 것을 의미한다. 특정한 구체예에서, 효율적이라는 것은 표적화 세포로의 유전자 전이가 >80%이고 표현형 변형이 이들 세포의 적어도 25%, 이들 세포의 적어도 33% 또는 이들 세포의 적어도 50%에서 일어나는 것을 의미한다. 특정한 구체예에서, 표현형 변형은 나노수송체를 흡수한 선택된 세포의 1/3에서 일어날 수 있고 여기서 수송된 핵산은 뉴클레아제를 인코딩한다.

[0027] 본 개시의 추가적인 선택사항 및 구체예가 이제 더 자세히 서술될 것이다.

[0028] 선택 세포 표적화 리간드. 개시된 나노수송체의 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 관심의 면역 세포에 선별적으로 결합한다. 특정한 구체예에서, 관심의 면역 세포는 림프구다. 림프구는 T-세포, B 세포, 자연 살해 (NK) 세포, 단핵백혈구/대식 세포 및 HSC를 포함한다.

[0029] 각각 구별된 기능이 있는 T-세포의 여러 다양한 하위 집합이 발견된 바 있다. 특정한 구체예에서, 선택 세포 표적화 리간드는 수용체-매개 엔도사이토시스를 통해 특정 림프구 집단에 대한 선별 유도를 성취한다. 예를 들면, 대부분의 T-세포는 여러 단백질의 복합체로 존재하는 T-세포 수용체 (TCR)를 갖는다. 실제의 T-세포 수용체는 독립적인 T-세포 수용체 알파 및 베타 (TCRα 및 TCRβ) 유전자로부터 생산되고 α- 및 β-TCR 사슬로 지칭되는 두 개의 개별 펩티드 사슬로 구성된다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 α- 및/또는 β-TCR 사슬을 결합시켜 이들 T 세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0030] γδ T-세포는 이들 표면에 구별되는 T-세포 수용체 (TCR)을 보유하는 T-세포의 작은 하위집합을 나타낸다. γδT-세포에서, TCR은 하나의 γ-사슬 및 하나의 δ-사슬로 이루어진다. 이러한 T-세포 군은 αβ T-세포보다 훨씬 덜 흔하다(총 T-세포의 2%). 그렇지만, 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 γ및/또는 δTCR 사슬을 결합시켜 이들 T 세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0031] CD3는 모든 성숙한 T 세포 상에 발현된다. 따라서, 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD3를 결합시켜 모든 성숙한 T-세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다. 활성화 T-세포는 4-1BB (CD137), CD69, 및 CD25를 발현한다. 따라서, 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 4-1BB, CD69 또는 CD25를 결합시켜 활성화 T-세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다. CD5 및 트랜스페린 수용체가 또한 T-세포 상에 발현되며 T-세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0032] T-세포는 추가로 헬퍼 세포 (CD4+ T-세포) 및 세포독성 T-세포 (CTL, CD8+ T-세포)로 분류될 수 있고, 후자는 세포용해 T-세포를 포함한다. T 헬퍼 세포는 다른 기능 중에서도 B 세포의 혈장 세포로의 성숙 및 세포독성 T-세포 및 대식 세포의 활성화를 비롯한 면역 과정에서 다른 백혈구를 보조한다. 이들 세포는 또한 CD4+ T-세포로 공지되어 있는데 이들이 표면에 CD4 단백질을 발현하기 때문이다. 헬퍼 T-세포는 항원 제시 세포 (APC)의 표면 상에 발현된 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩티드 항원를 받는 경우 활성화된다. 일단 활성화되면, 이들은 빠르게 갈라지고 활성 면역 반응을 조절 또는 보조하는 사이토킨이라 지칭되는 소형 단백질을 분비한다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD4를 결합시켜 T 헬퍼 세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0033] 세포독성 T-세포는 바이러스 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하며, 또한 이식 거부의 원인이다. 이들 세포는 또한 CD8+ T-세포로 공지되어 있는데 이들이 표면에 CD8 당단백질을 발현하기 때문이다. 이들 세포는 신체의 거의 모든 세포 표면에 존재하는 MHC 클래스 I과 연관된 항원에 결합함으로써 이들 표적을 인식한다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD8을 결합시켜 CTL로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 "중앙 기억" T-세포 (또는 "TCM")는 표면에 CD62L 또는 CCR7 및 CD45RO를 발현하는 항원 경험이 있는 CTL로서, 미경험 세포와 비교할 때 CD45RA을 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖는다. 특정한 구체예에서, 중앙 기억 세포는 CD62L, CCR7, CD25, CD127, CD45RO, 및 CD95의 발현에 있어서 양성이고, 미경험 세포와 비교할 때 CD45RA의 감소된 발현을 갖는다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD62L, CCR7, CD25, CD127, CD45RO 및/또는 CD95을 결합시켜 TCM으로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 "이펙터 기억" T-세포 (또는 "TEM")는 중앙 기억 세포와 비교할 때 표면에 CD62L을 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖는 항원 경험 T-세포로서, 미경험 세포와 비교할 때 CD45RA을 발현하지 않거나 감소된 발현을 갖는다. 특정한 구체예에서, 이펙터 기억 세포는 미경험 세포 또는 중앙 기억 세포와 비교할 때 CD62L 및 CCR7의 발현에 있어서 음성이고, CD28 및 CD45RA의 가변 발현을 갖는다. 이펙터 T-세포는 기억 또는

미경험 T-세포와 비교할 때 그랜자임 B 및 퍼포린에 대해 양성이다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 그랜자임 B 및/또는 퍼포린을 결합시켜 TEM으로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0036] 조절 T 세포 ("TREG")는 T 세포의 하위집단으로, 면역 시스템을 조율하고, 자가-항원에 내성을 유지하고, 자가 면역 질환을 없앤다. TREG은 CD25, CTLA-4, GITR, GARP 및 LAP을 발현한다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD25, CTLA-4, GITR, GARP 및/또는 LAP을 결합시켜 미경험 TREG으로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 "미경험" T-세포는 CD62L 및 CD45RA를 발현하는 항원 경험이 없는 T 세포로서, 중앙 또는 이펙터 기억 세포와 비교할 때 CD45RO을 발현하지 않는다. 특정한 구체예에서, 미경험 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD127, 및 CD45RA를 비롯한 미경험 T-세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD62L, CCR7, CD28, CD127 및/또는 CD45RA를 결합시켜 미경험 T-세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0038] 자연 살해 세포 (또한 NK 세포, K 세포, 및 킬러 세포로 공지됨)는 인터페론 또는 대식 세포-유래 사이토킨에 반응하여 활성화된다. 이들은 후천성 면역 반응이 감염을 없앨 수 있는 항원-특이적 세포독성 T 세포를 생성하는 동안 바이러스 감염을 억누르는 기능을 한다. NK 세포는 CD8, CD16 및 CD56를 발현하지만 CD3를 발현하지 않는다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD8, CD16 및/또는 CD56를 결합시켜 NK 세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0039] 대식 세포 (및 이들의 전구체, 단핵백혈구)는 신체의 모든 조직에 (특정한 경우 미소아교세포, Kupffer 세포 및 파골세포로서) 잔류하며 여기서 이들은 아폽토시스 세포, 병원체 및 다른 비-자가-성분을 집어삼킨다. 단핵백혈구/대식 세포가 비-자가-성분을 삼키기 때문에, 이들 세포에 의한 선별적 흡수에 있어서 본 명세서에 기술된 나노수송체에 대해서는 특정 대식 세포- 또는 단핵백혈구-유도 물질이 필요하지 않다. 대안적으로, 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD11b, F4/80; CD68; CD11c; IL-4Rα; 및/또는 CD163을 결합시켜 단핵백혈구/대식 세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0040] 미숙한 수지상 세포 (즉, 활성화-전)는 말초에서 항원 및 다른 비-자가-성분을 삼키며 나중에, 활성화 형태로, 림프계 조직의 T-세포 영역으로 이동하여 여기서 T 세포에게 항원 제시를 제공한다. 따라서, 대식 세포와 같이, 수지상 세포의 표적화는 선택 세포 표적화 리간드에 의존할 필요가 없다. 선택 세포 표적화 리간드가 수지상 세포를 선별적으로 표적화 하기 위해 사용되는 경우, 이것은 다음의 CD 항원에 결합할 수 있다: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD21, CD35, CD39, CD40, CD86, CD101, CD148, CD209, 및 DEC-205.

[0041] B 세포는 B 세포 수용체 (BCR)의 존재에 의해 다른 림프구와 구별될 수 있다. B 세포의 주요 기능은 항체를 만드는 것이다. B 세포는 CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD35, CD40, CD52, 및 CD80을 발현한다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD35, CD40, CD52, 및/또는 CD80을 결합시켜 B-세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다. 또한 B-세포 수용체 이소형 불변 영역 (IgM, IgG, IgA, IgE)을 표적으로 하는 항체가 B-세포 아형을 표적화 하기 위해 사용될 수 있다.

[0042] 림프구 기능-연관 항원 1 (LFA-1)은 모든 T-세포, B-세포 및 단핵백혈구/대식 세포에 의해 발현된다. 따라서, 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 LFA-1을 결합시켜 T-세포, B-세포 및 단핵백혈구/대식 세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0043] HSC가 또한 본 명세서에 개시된 나노수송체의 선별적 송달을 위해 표적화될 수 있다. HSC는 CD34, CD46, CD133, Sca-1 및 CD117을 발현한다. 본 명세서에 개시된 선택 세포 표적화 리간드는 CD34, CD46, CD133, Sca-1 및/또는 CD117를 결합시켜 조혈모세포로의 핵산의 선별적 송달을 달성할 수 있다.

[0044] "선별적 송달"은 핵산이 송달되고 하나 이상의 선택된 림프구 집단에 의해 발현되는 것을 의미한다. 특정한 구체예에서, 선별적 송달은 선택된 림프구 집단으로만 이루어진다. 특정한 구체예에서, 투여된 핵산의 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99%가 선택된 림프구 집단에 의해 송달 및/또는 발현된다. 특정한 구체예에서, 선별적 송달은 비-림프구 세포가 송달된 핵산을 발현하지 않도록 보장한다. 예를 들면, 표적화 물질이 T-세포 수용체 (TCR) 유전자인 경우, T 세포만 TCR 발현을 위해 요구되는 제타 사슬을 가지기 때문에 선별성이 보장된다. 선별적 송달은 또한 선택되지 않은 세포로의 핵산 흡수 결여를 기반으로 또는 핵산 서열 내부의 특정 프로모터의 존재를 기반으로 일어날 수 있다. 예를 들면, 일시적-발현된 핵산은 T-세포-특이적 CD3-델타 프로모터를 포함할 수 있다. 선별적 송달을 달성할 수 있는 추가적인 프로모터는 다음을 포함한다: 쥐의 줄기세포 바이러스 프로모터 또는 T 세포 또는 HSC를 위한 원위 lck 프로모터; HSC를 위한 CD45 프로모터, WASP 프

로모터 또는 IFN-베타 프로모터; B 세포를 위한 B29 프로모터; 또는 단핵백혈구/대식 세포를 위한 CD14 프로모터 또는 CD11b 프로모터.

[0045] 언급한 것처럼, 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 세포에서 발견되는 모티프를 위한 결합 도메인을 포함할 수 있다. 선택 세포 표적화 리간드는 또한 림프구로의 선별적 흡수를 가능하게 하는 임의의 선별적 결합 메커니즘을 포함할 수 있다. 특정한 구체예에서, 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 트랜스페린 수용체; 및 이들의 조합을 위한 결합 도메인을 포함한다.

[0046] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 세포 마커 리간드, 수용체 리간드, 항체, 펩티드, 펩티드 압타머, 핵산, 핵산 압타머, 거울상 압타머(spiegelmer) 또는 이들의 조합을 포함한다. 선택 세포 표적화 리간드의 맥락에서, 결합 도메인은 또다른 물질에 결합하여 엔도사이토시스를 매개할 수 있는 복합체를 형성하는 임의의 물질을 포함한다.

[0047] "항체"는 결합 도메인의 한 예시이고 림프구에 의해 발현되는 모티프에 특이적으로 결합하는 전장 항체 또는 항체의 결합 단편, 예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')2, Fc, 및 단일 사슬 Fv 단편 (scFv) 또는 임의의 생물학적으로 효과적인 면역글로불린 단편을 포함한다. 항체 또는 항원 결합 단편은 다클론 항체, 단클론 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 미니 바디, 및 선형 항체의 전부 또는 일부를 포함한다.

[0048] 인간 유래의 항체 또는 인간화된 항체는 인간에서 낮아진 면역원성을 가지거나 가지지 않으며 인간이-아닌 항체와 비교할 때 더 적은 수의 비-면역원성 에피토프를 갖는다. 항체 및 이들의 단편은 일반적으로 인간 개체에서 감소된 항원성 수준을 가지거나 가지지 않도록 선별될 것이다.

[0049] 림프구에 의해 발현된 모티프에 특이적으로 결합하는 항체는 단클론 항체를 얻는 방법, 파지 전시 방법, 인간 또는 인간화된 항체 생산 방법, 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지인 바와 같이 항체를 생산하도록 조작된 형질전환 동물 또는 식물을 이용하는 방법 (예를 들면, 미국 특허 제6,291,161 및 6,291,158호를 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 부분적으로 또는 전부 합성인 항체의 파지 전시 라이브러리가 이용가능하며 림프구 모티프에 결합할 수 있는 항체 또는 이들의 단편에 대해 선별될 수 있다. 예를 들면, 결합 도메인은 관심의 표적에 특이적으로 결합하는 Fab 단편에 대한 Fab 파지 라이브러리를 선별함으로써 규명될 수 있다 (Hoet 등, *Nat. Biotechnol. 23*:344, 2005을 참조). 인간 항체의 파지 전시 라이브러리가 또한 이용가능하다. 추가적으로, 편리한 시스템 (예컨대, 마우스, HuMAb 마우스®, TC 마우스™, KM-마우스®, 라마, 닭, 래트, 햄스터, 토끼, 등)에서 면역원으로서 관심의 표적을 이용한 하이브리도마 개발을 위한 전통적인 전략이 결합 도메인을 개발하기 위해 사용될 수 있다. 특정한 구체예에서, 항체는 선택된 림프구에 의해 발현된 모티프에 특이적으로 결합하고 불특정 성분 또는 연관성 없는 표적과 교차 반응하지 않는다. 일단 규명되면, 항체를 암호화하는 아미노산 서열 또는 핵산 서열은 단리 및/또는 결정될 수 있다.

[0050] 특정한 구체예에서, 선택 세포 표적화 리간드의 결합 도메인은 T-세포 수용체 모티프 항체; T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체를 포함한다. 이들 결합 도메인은 또한 전술된 항체의 scFv 단편으로 구성될 수 있다.

[0051] 펩티드 압타머는 단백질 스캐폴드의 양쪽 말단에 부착된 펩티드 루프 (이것은 표적 단백질에 특이적임)를 포함한다. 이러한 이중 구조적 제약은 펩티드 압타머의 결합 친화성을 항체에 필적하는 수준까지 크게 끌어올린다. 가변 루프 길이는 전형적으로 8 내지 20 아미노산 (예컨대, 8 내지 12 아미노산)이고, 스캐폴드는 안정한, 가용성, 소형, 및 무독성인 임의의 단백질일 수 있다 (예컨대, 티오레독신-A, 스테핀 A 삼중 돌연변이, 녹색 형광 단백질, 에글린 C, 및 세포 전사 인자 Spl). 펩티드 압타머 선별은 상이한 시스템, 가령 효모 두 가지-하이브리

드 시스템 (예컨대, Gal4 효모-두 가지-하이브리드 시스템) 또는 LexA 상호작용 포획 시스템을 이용하여 이루어질 수 있다.

[0052] 핵산 압타머는 표적 단백질 또는 다른 분자에 높은 친화성 및 특이성으로 결합하도록 지시하는 특정한 구형 구조로 접힘으로써 기능하는 단일-가닥 핵산 (DNA 또는 RNA) 리간드이며, Osborne 등, Curr. Opin. Chem. Biol. 1:5-9, 1997; 및 Cerchia 등, FEBS Letters 528:12-16, 2002에 의해 기술된 바와 같다. 특정한 구체예에서, 압타머는 소형 (15 KD; 또는 15-80 뉴클레오티드 또는 20-50 뉴클레오티드)이다. 압타머는 일반적으로 $10^{14}$-$10^{15}$ 무작위 올리고뉴클레오티드 서열로 이루어진 라이브러리로부터 SELEX (지수적 농축에 의한 리간드의 체계적 발달(systematic evolution of ligands by exponential enrichment); 예를 들면, Tuerk 등, Science, 249:505-510, 1990; Green 등, Methods Enzymology. 75-86, 1991; 및 Gold 등, Annu. Rev. Biochem., 64: 763-797, 1995를 참조)로 지칭되는 절차에 의해 단리된다. 압타머를 생산하는 추가적인 방법은 예를 들면, 미국 특허 제6,344,318; 6,331,398; 6,110,900; 5,817,785; 5,756,291; 5,696,249; 5,670,637; 5,637,461; 5,595,877; 5,527,894; 5,496,938; 5,475,096; 및 5,270,16호에 기술되어 있다. 거울상 압타머는 적어도 하나의 β-리보스 단위가 β-D-데옥시리보스 또는 예를 들면, β-D-리보스, α-D-리보스, β-L-리보스 중에서 선택된 변형된 당 단위체로 대체된 것을 제외하고 핵산 압타머와 유사하다.

[0053] 림프구의 세포내 함입 및/또는 형질감염을 촉진할 수 있는 다른 물질, 가령 폴리(에틸렌이민)/DNA (PEI/DNA) 복합체가 또한 사용될 수 있다.

[0054] 수송체. 언급된 바와 같이, 개시된 나노수송체의 수송체는 핵산을 응축시키고 효소적 분해로부터 보호하는 기능을 한다. 수송체로 사용하기에 특히 유용한 물질은 양으로 하전된 지질 및/또는 폴리(β-아미노 에스테르)를 비롯한 중합체를 포함한다.

[0055] 양으로 하전된 지질의 추가적인 예시는 아미노알코올을 갖는 포스파티드산의 에스테르, 가령 하이드록시에틸을 갖는 디팔미토일 포스파티드산 또는 디스테아로일 포스파티드산의 에스테르를 포함한다. 양으로 하전된 지질의 더욱 특정한 예시는 3β-[N--(N',N'-디메틸아미노에틸)카바모일) 콜레스테롤 (DC-콜); N,N'-디메틸-N,N'-디옥타실 암모늄 브로마이드 (DDAB); N,N'-디메틸-N,N'-디옥타실 암모늄 클로라이드 (DDAC); 1,2-디올레일옥시프로필-3-디메틸-하이드록시에틸 암모늄 클로라이드 (DORI); 1,2-디올레일옥시-3-[트리메틸암모니오]-프로판 (DOTAP); N-(1-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드 (DOTMA); 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC); 1,2-디옥타데실옥시-3-[트리메틸암모니오]-프로판 (DSTAP); 및 예컨대 Martin 등, Current Pharmaceutical Design 2005, 11, 375-394에 기술된 양이온성 지질을 포함한다.

[0056] 본 개시 내에서 수송체로서 사용될 수 있는 양으로 하전된 중합체의 예시는 폴리아민; 폴리유기 아민 (예컨대, 폴리에틸렌이민 (PEI), 폴리에틸렌이민 셀룰로오스); 폴리(아미도아민) (PAMAM); 폴리아미노산 (예컨대, 폴리리신 (PLL), 폴리아르기닌); 다당류 (예컨대, 셀룰로오스, 덱스트란, DEAE 덱스트란, 전분); 스페르민, 스페르미딘, 폴리(비닐벤질 트리알킬 암모늄), 폴리(4-비닐-N-알킬-피리디늄), 폴리(아크릴로일-트리알킬 암모늄), 및 Tat 단백질을 포함한다.

[0057] 임의 농도 및 임의 비율의 지질 및 중합체의 배합물이 또한 사용될 수 있다. 다양한 등급을 이용하여 상이한 비율로 상이한 중합체 유형을 배합하면 기여하는 각각의 중합체로부터 빌려온 특징들이 생성될 수 있다. 다양한 말단 기 화학이 또한 채택될 수 있다.

[0058] 전술된 내용을 제한함 없이, 본 명세서에 개시된 특정 구체예는 또한 다공성 네트워크를 형성할 수 있는 임의의 물질로부터 구성된 다공성 나노입자를 이용할 수 있다. 예시적인 물질은 금속, 전이 금속 및 준금속을 포함한다. 예시적인 금속, 전이 금속 및 준금속은 리튬, 마그네슘, 아연, 알루미늄 및 실리카를 포함한다. 특정한 구체예에서, 다공성 나노수송체는 실리카를 포함한다. 메조다공성 실리카 (1,000 m2/g를 초과)의 특별히 높은 표면적은 통상적인 DNA 수송체 가령 리포좀을 초과하는 수준으로 핵산을 로딩할 수 있다.

[0059] 수송체는 구형, 입방형, 각추형, 장방형, 원주형, 도넛형, 등을 비롯한 여러 상이한 모양으로 형성될 수 있다. 핵산은 수송체의 공극 내에 다양한 방식으로 포함될 수 있다. 예를 들면, 핵산은 다공성 나노수송체 내에 봉입될 수 있다. 다른 양태에서, 핵산은 다공성 나노수송체의 표면에 연결 (예컨대, 공유적으로 및/또는 비-공유적으로) 되거나 표면과 가까이 놓일 수 있다. 특정한 구체예에서, 핵산은 다공성 나노수송체 내에 포함될 수 있고 예컨대, 다공성 나노수송체의 구성물질 내에 통합된다. 예를 들면, 핵산은 중합체 나노수송체의 중합체 기질 내에 편입될 수 있다.

[0060] 코팅. 특정한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 나노수송체는 봉입된 핵산을 보호하고 표적-이탈 결합을 감소 또

는 방지하는 코팅을 포함한다. 표적-이탈 결합은 나노수송체의 표면 전하를 중성 또는 음으로 환원시킴으로써 감소 또는 방지된다. 본 명세서의 다른 곳에서 더 자세히 개시되는 바와 같이, 코팅은 중성 또는 음으로 하전된 중합체- 및/또는 리포좀-기반 코팅을 포함할 수 있다. 특정한 구체예에서, 코팅은 봉입된 핵산이 선택된 세포에 방출되기 전에 환경에 노출되는 것을 방지하기에 충분한 친수성 및/또는 중성 하전된 친수성 중합체의 조밀한 표면 코팅이다. 특정한 구체예에서, 코팅은 나노수송체 표면의 적어도 80% 또는 적어도 90%를 덮는다. 특정한 구체예에서, 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함한다.

[0061] 본 개시의 구체예에서 코팅으로 사용될 수 있는 중성으로 하전된 중합체의 예시는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리(프로필렌 글리콜); 및 폴리알킬렌 옥사이드 공중합체, (PLURONIC®BASF Corp., Mount Olive, NJ)를 포함한다.

[0062] 중성으로 하전된 중합체는 또한 쌍이온성 중합체를 포함한다. 쌍이온성은 양성 및 음성 전기적 전하를 모두 가지면서 종합적으로는 중성 전하인 특성을 가리킨다. 쌍이온성 중합체는 세포 및 단백질 부착에 저항하는 세포막의 영역처럼 거동할 수 있다.

[0063] 쌍이온성 중합체는 쌍이온성 기를 갖는 펜던트 기(즉, 중합체 백본에 걸려있는 기)를 비롯한 쌍이온성 구성 단위를 포함한다. 예시적인 쌍이온성 펜던트 기는 카르복시베타인 기를 포함한다 (예컨대, -Ra-N+(Rb)(Rc)-Rd-CO2-, 여기서 Ra는 중합체 백본을 카르복시베타인 기의 양이온성 질소 중심에 공유적으로 연결하는 링커 기이고, Rb 및 Rc는 질소 치환기이고, 및 Rd는 양이온성 질소 중심을 카르복시베타인 기의 카르복시 기에 공유적으로 연결하는 링커 기).

[0064] 음으로 하전된 중합체의 예시는 알긴산; 카르복실산 다당류; 카르복시메틸 셀룰로오스; 카르복시메틸 셀룰로오스-시스테인; 카라기난 (예컨대, Gelcarin® 209, Gelcarin® 379; 콘드로이틴 설페이트; 글리코사미노글리칸; 뮤코다당류; 음으로 하전된 다당류 (예컨대, 덱스트란 설페이트); 폴리(아크릴산); 폴리(D-아스파르트산); 폴리(L-아스파르트산); 폴리(L-아스파르트산) 나트륨 염; 폴리(D-글루탐산); 폴리(L-글루탐산); 폴리(L-글루탐산) 나트륨 염; 폴리(메타크릴산); 나트륨 알지네이트 (예컨대, Protanal® LF 120M, Protanal® LF 200M, Protanal® LF 200D); 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스 (CMC); 설페이트화 다당류 (헤파린, 아가로펙틴); 펙틴, 젤라틴 및 히알루론산을 포함한다.

[0065] 특정한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 중합체는 "별 모양 중합체"를 포함할 수 있고, 이는 둘 이상의 중합체 가지가 중심에서 연장된 분지형 중합체를 가리킨다. 중심은 둘 이상의 관능기를 가지는 원자의 군이며 이로부터 중합에 의해 가지가 연장될 수 있다.

[0066] 특정한 구체예에서, 가지는 쌍이온성 또는 음으로-하전된 중합체 가지이다. 별 중합체에 있어서, 가지 전구체는 가수분해, 자외선 방사선조사, 또는 열을 통해 쌍이온성 또는 음으로-하전된 중합체로 전환될 수 있다. 중합체는 또한 불포화된 단량체의 중합에 효과적인 임의의 중합 방법, 가령 원자 전이 라디칼 중합 (ATRP), 가역적 부가-분절 연쇄 전이 중합 (RAFT), 광-중합, 고리-개방 중합 (ROP), 축합반응, Michael 부가, 분지 생성/증식 반응, 또는 기타 반응에 의해 얻어질 수 있다.

[0067] 리포좀은 적어도 하나의 동심(concentric) 지질 이중층을 포함하는 미세 소포이다. 소포-형성 지질은 최종 복합체의 특정한 정도의 유동성 또는 강성을 얻도록 선택된다. 특정한 구체예에서, 리포좀은 다공성 나노입자를 감싸는 외부 층인 지질 조성물을 제공한다.

[0068] 리포좀은 중성 (콜레스테롤) 또는 양극성일 수 있고 인지질, 가령 포스파티딜콜린 (PC), 포스파티딜에탄올아민 (PE), 포스파티딜이노시톨 (PI), 및 스핑고미엘린 (SM) 및 14-22 범위의 탄화수소 사슬 길이를 가지고, 포화되거나 하나 이상의 이중 C=C 결합을 가지는 다른 유형의 양극성 지질 가령 디올레오일포스파티딜에탄올아민 (DOPE)을 포함한다. 단독으로, 또는 다른 지질 성분과 함께 안정한 리포솜을 생성할 수 있는 지질의 예시는 인지질, 가령 수소첨가 대두 포스파티딜콜린 (HSPC), 레시틴, 포스파티딜에탄올아민, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 스핑고미엘린, 세팔린, 카디오리핀, 포스파티드산, 세레브로시드, 디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (DSPE), 디올레오일포스파티딜콜린 (DOPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 팔미토일올레오일포스파티딜콜린 (POPC), 팔미토일올레오일포스파티딜에탄올아민 (POPE) 및 디올레오일포스파티딜에탄올아민 4-(N-말레이미도-메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트 (DOPE-말)이다. 리포좀에 포함될 수 있는 추가적인 비-인 함유 지질은 스테아릴아민, 도데실아민, 헥사데실아민, 이소프로필 미리스테이트, 트리에탄올아민-라우릴 설페이트, 알킬-아릴 설페이트, 아세틸 팔미테이트, 글리세롤 리시놀레이트, 헥사데실 스테아레이트, 양쪽성 아크릴 중합체, 폴리에틸옥실화 지방산 아미드, DDAB, 디옥타데실 디메틸 암모늄 클로라이드

(DODAC), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄 프로판 (DMTAP), DOTAP, DOTMA, DC-Chol, 포스파티드산 (PA), 디팔미토일포스파티딜글리세롤 (DPPG), 디올레오일포스파티딜글리세롤, DOPG, 및 디세틸포스페이트를 포함한다. 특정한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 리포좀을 생성하기 위해 사용되는 지질은 콜레스테롤, 수소첨가 대두 포스파티딜콜린 (HSPC) 및, 유도된 소포-형성 지질 PEG-DSPE를 포함한다.

[0069] 리포좀을 형성하는 방법은, 예를 들면, 미국 특허 제4,229,360; 4,224,179; 4,241,046; 4,737,323; 4,078,052; 4,235,871; 4,501,728; 및 4,837,028호, 뿐만 아니라 Szoka 등, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980) 및 Hope 등, Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986)에 기술되어 있다.

[0070] 핵산. 본 명세서에 개시된 나노수송체 내에서 사용되는 핵산은 세포 운명, 분화, 생존능 및/또는 이동을 조절하는 유전자 편집 물질 및/또는 표현형-개조 단백질을 일시적으로 발현할 수 있다(예컨대, 도 1B, 1C 참조).

[0071] 특정한 구체예에서, 핵산은 합성 mRNA를 포함한다. 특정한 구체예에서, 합성 mRNA는 증가된 세포내 안정성을 위해 5'-캡핑을 이용하여 조작된다. 복수의 뚜렷한 5'-캡 구조가 합성 mRNA 분자의 5'-캡을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 역방향-방지 캡 유사체 (ARCA) 캡은 5'-5'-트리포스페이트 구아닌-구아닌 연결을 보유하며 여기서 하나의 구아닌은 N7 메틸 기뿐 아니라 3'-O-메틸 기를 내포한다. 합성 mRNA 분자는 또한 5'-캡 구조를 생성하는 기능을 하는 효소를 이용하여 전사-후에 캡핑될 수 있다. 예를 들면, 재조합 백시니아 바이러스 캡핑 효소 및 재조합 2'-O-메틸트랜스페라제 효소는 mRNA의 5'-최말단 뉴클레오티드 및 구아닌 뉴클레오티드 사이에 표준 5'-5'-트리포스페이트 연결을 생성할 수 있고 여기서 구아닌은 N7 메틸화를 내포하고 최말단 5'-뉴클레오티드는 Cap1 구조를 생성하는 2'-O-메틸을 내포한다. 이는 더 높은 번역-성능 및 세포 안정성을 갖는 캡 및 세포 염증-촉진 사이토킨의 활성화 감소를 야기한다.

[0072] 합성 mRNA 또는 다른 핵산은 또한 고리형으로 생산될 수 있다. 합성 mRNA는 고리화, 또는 연쇄상으로 연결되어, 번역 능력이 있는 분자를 생성하여 폴리-A 결합 단백질 및 5'-말단 결합 단백질 사이의 상호작용을 보조할 수 있다. 고리화 또는 연쇄상 연결의 메커니즘은 적어도 3가지 다른 경로를 통해 일어날 수 있다: 1) 화학적, 2) 효소적, 및 3) 리보자임 촉매 경로. 신규하게 형성된 5'-/3'-연결은 분자내 또는 분자간일 수 있다.

[0073] 첫 번째 경로에서, 핵산의 5'-말단 및 3'-말단은, 서로 가까워지면 분자의 5'-말단 및 3'-말단 사이에 신규한 공유 연결을 형성하는 화학적으로 반응기를 내포할 수 있다. 5'-말단은 NHS-에스테르 반응기를 내포할 수 있고 3'-말단은 3'-아미노-종결 뉴클레오티드를 내포할 수 있어서, 유기 용매에서 합성 mRNA 분자의 3'-말단 상의 3'-아미노-종결 뉴클레오티드는 5'-NHS-에스테르 모이어티에 대한 친핵성 공격을 진행하여 신규한 5'-/3'-아미드 결합을 형성한다.

[0074] 두 번째 경로에서, T4 RNA 리가제는 5'-포스포릴화 핵산 분자를 핵산의 3'-하이드록실 기에 효소적으로 연결하기 위해 사용되어 신규한 포스포디에스테르 연결을 형성할 수 있다. 예시 반응에서, 1 μg의 핵산 분자는 37℃에서 1시간 동안 1-10 단위의 T4 RNA 리가제 (New England Biolabs, Ipswich, Mass.)와 함께 제조사의 프로토콜에 따라 배양될 수 있다. 결찰 반응은 효소의 결찰 반응을 보조하기 위해 5'- 및 3'-영역이 병렬로 배치되고 염기-쌍 형성이 가능한 쪼개진 올리고뉴클레오티드의 존재에서 일어날 수 있다.

[0075] 세 번째 경로에서, cDNA 주형의 5'- 또는 3'-말단이 리가제 리보자임 서열을 인코딩하여서 시험관 내 전사 도중, 생성된 핵산 분자는 핵산 분자의 5'-말단을 핵산 분자의 3'-말단에 결찰시킬 수 있는 활성 리보자임 서열을 보유할 수 있다. 리가제 리보자임은 그룹 I 인트론, 그룹 I 인트론, 간염 델타 바이러스, 헤어핀 리보자임으로부터 유래할 수 있거나 SELEX (지수적 농축에 의한 리간드의 체계적 발달)에 의해 선별될 수 있다. 리보자임 리가제 반응은 0 내지 37℃의 온도에서 1 내지 24 시간 소요될 수 있다.

[0076] 특정한 구체예에서, 핵산은 예컨대, 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 발현하기 위한 서열(예컨대, 유전자)을 포함할 수 있는 플라스미드, cDNA, 또는 mRNA를 포함한다. 적절한 플라스미드는 유전자를 림프구에 전달하기 위해 사용될 수 있는 표준 플라스미드 벡터 및 미니서클 플라스미드를 포함한다. 핵산 (예컨대, 미니서클 플라스미드)는 선별적으로 변형된 세포에서 일시적인 발현을 용이하게 하는 임의의 부가적인 서열 정보를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 핵산은 프로모터, 가령 일반적인 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 세포-특이적 프로모터, 및/또는 세포질에 대해 특이적인 프로모터를 포함할 수 있다. 언급한 바와 같이, 프로모터 및 플라스미드 (*예컨대*, 미니서클 플라스미드)는 일반적으로 당해 분야에 널리 공지되어 있고 통상적인 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0077] 본 명세서에서 사용된, 용어 "유전자"는 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 가리킨다. 이러한 정의는 다양한 서열 다형성, 돌연변이, 및/또는 서열 변이체를 포함하고 여기서 그러한 개조

는 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질의 기능에 영향을 주지 않는다. 용어 "유전자"는 암호화 서열뿐 아니라 조절 부위 가령 프로모터, 인핸서, 및 종결 영역을 포함할 수 있다. 상기 용어는 추가로 모든 인트론 및 mRNA 전사물로부터 스플라이싱된 다른 DNA 서열을, 대안적인 스플라이스 부위로부터 생성된 변이체와 함께 포함할 수 있다. 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질의 발현을 유도하는 RNA일 수 있다. 이들 핵산 서열은 특정한 구체예에서, 단백질로 번역되는 RNA 서열을 포함한다. 핵산 서열은 전장 핵산 서열 뿐만 아니라 전장 단백질로부터 유래한 비-전장 서열을 모두 포함한다. 서열은 또한 자연 서열 또는 특이적 림프구에서 코돈 선호를 제공하도록 도입될 수 있는 서열의 변질된 코돈을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 유전자 서열은 일반이 이용가능한 데이터베이스 및 간행물에서 입수가능하다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "인코딩"은 핵산, 가령 플라스미드, 유전자, cDNA, mRNA의 서열이 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질의 합성을 위해 주형으로 기능하는 특성을 가리킨다.

[0078] 유전자 편집 물질. 본 명세서에서 사용된, 유전자 편집 물질은 선택된 세포의 내생적 유전체의 특정 서열을 변형 또는 영향을 주는 본 명세서에 기술된 바와 같은 일시적인 핵산 발현의 발현 산물을 포함한다. 특정한 구체예에서, 변형은 내생적 유전자의 제거 또는 파괴를 포함하여 내생적 유전자의 인코딩되는 단백질이 더 이상 발현되지 않도록, 감소된 정도로 발현되도록, 불완전 단백질, 불안정한 단백질, 부정확하게 접힌 단백질 및/또는 기능 없는 단백질로 발현되게 한다. 특정한 구체예에서, 효과는 간섭 RNA-유형 메커니즘을 통한 단백질의 발현 감소이다. 따라서, 유전자 편집 물질은 유전체 편집, 예를 들면 유전자 파괴, 상동성 재조합에 의한 유전자 편집, 및 인간 유전체를 가진 적절한 염색체 표적 부위에 치료적 유전자를 삽입하는 유전자 요법을 위해 유용하다.

[0079] 특정한 구체예는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)를 유전자 편집 물질로서 이용한다. TALEN은 전사 활성화제-유사 이펙터 (TALE) DNA 결합 단백질 및 DNA 절단 도메인을 포함하는 융합 단백질을 가리킨다. TALEN은 사용되면 세포 내 수선 메커니즘을 유도하는 이중 가닥 단절 (DSB)을 DNA에 포함시켜 유전자 및 유전체를 편집한다. 일반적으로, 이량체화 및 DSB를 유도하려면 두 개의 TALEN이 결합하여 DNA 절단 도메인을 위한 표적 DNA 부위의 각각의 측면에 붙어야 한다. DSB는 비-상동성 말단-연결 (NHEJ) 또는 외생적 이중-가닥 공여체 DNA 단편을 이용한 상동성 재조합 (HR)에 의해 세포에서 수선된다.

[0080] 언급한 바와 같이, TALEN은 예를 들면, 내생적 유전체의 표적 서열에 결합하도록 조작되어 있고, 표적 서열의 위치에서 DNA를 절단한다. TALEN의 TALE은 산토모나스속(*Xanthomonas*) 박테리아에 의해 분비된 DNA 결합 단백질이다. TALE의 DNA 결합 도메인은 각각의 반복체의 12 및 13번째 위치에 다양한 잔기를 가지는, 고도로 보존된 33 또는 34 아미노산 반복체를 포함한다. 반복 가변 이중잔기 (RVD)로 지칭되는 이들 두 위치는 특이적 뉴클레오티드 인식과 강한 상관관계를 나타낸다. 따라서, 표적화 특이성은 RVD 내 아미노산을 변화시키고 통상적이지 않은 RVD 아미노산을 도입시킴으로써 향상될 수 있다.

[0081] TALEN 융합에 사용될 수 있는 DNA 절단 도메인의 예시는 야생형 및 변이체 FokI 엔도뉴클레아제이다. FokI 도메인은 표적 서열 상의 부위에 대한 고유한 DNA 결합 도메인을 가지는 두 개의 구조체를 필요로하는 이량체로서 기능한다. FokI 절단 도메인은 두 개의 반전된 반쪽-부위를 나누는 다섯 개 또는 여섯 개 염기 쌍 스페이서 서열을 절단한다.

[0082] 특정한 구체예는 메가TAL을 유전자 편집 물질로서 이용한다. 메가TAL은 단일 사슬 희소-절단 뉴클레아제 구조를 가지며 여기서 TALE은 메가뉴클레아제의 DNA 절단 도메인과 융합된다. 호밍 엔도뉴클레아제로도 공지인 메가뉴클레아제는 동일한 도메인 내에 DNA 인식 및 뉴클레아제 기능을 둘다 가지는 단일 펩티드 사슬이다. TALEN과 대조적으로, 메가TAL은 기능적 활성을 위해 단일 펩티드 사슬의 송달만을 필요로 한다. TCRα에 특이적인 예시적인 메가TAL 단백질은 도 11에 서열 번호: 1로서 제공된다.

[0083] 특정한 구체예는 아연 집게 뉴클레아제 (ZFN)를 유전자 편집 물질로서 사용한다. ZFN는 특정 위치에서 DNA에 결합하고 절단하도록 조작된 부위-특이적 뉴클레아제 종류이다. ZFN는 사용되면 DNA 서열 내 특정 부위에 DSB를 도입하고 이는 ZFN이 여러 상이한 세포 내 유전체 내부의 고유한 서열을 표적화 할 수 있게 한다. 게다가, 이중-가닥 단절 후에, DSB를 수선하기 위해 상동성 재조합 또는 비-상동성 말단 접합이 일어나고, 따라서 유전체 편집이 가능해진다.

[0084] ZFN는 아연 집게 DNA-결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시켜 합성된다. DNA-결합 도메인은 전사 인자인 세 개 내지 여섯 개의 아연 집게 단백질을 포함한다. DNA 절단 도메인은 예를 들면, FokI 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인을 포함한다.

[0085] 가이드 RNA가 예를 들면, 유전자-편집 물질 가령 CRISPR-Cas 시스템과 함께 사용될 수 있다. CRISPR-Cas 시스템은 CRISPR 반복 및 CRISPR-연관 유전자 (Cas)의 집합을 포함한다.

[0086] CRISPR 반복 (일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복)은 반복서열과 유사한 크기의 짧은 가변 서열의 스페이서에 의해 분리된 짧은 순행 반복서열의 집합을 포함한다. 반복서열은 24 내지 48 염기 쌍 크기 범위이고 비록 반복서열이 완벽하게 회문성이진 않지만 헤어핀과 같은 이차 구조의 형성을 암시하는 몇몇 이분자 대칭을 가진다. 반복서열을 분리하는 스페이서는 원핵세포 바이러스, 플라스미드, 및 전이인자로부터의 서열과 정확히 매칭된다. Cas 유전자는 DNA를 풀고 절단하는 뉴클레아제, 헬리카제, RNA-결합 단백질, 및 중합효소를 인코딩한다. Cas1, Cas2, 및 Cas9는 Cas 유전자의 예시들이다.

[0087] CRISPR 스페이서의 유래는 CRISPR-Cas 시스템이 박테리아 내 후천성 면역에 중요한 역할을 수행한다는 것을 알려준다. 적어도 세 유형의 CRISPR-Cas 면역 시스템 반응이 존재하며, Cas1 및 Cas2 유전자는 세 가지 모두에서 스페이서 획득에 관여한다. CRISPR 좌위로의 침입성 바이러스 DNA의 포획 및 삽입에 관여하는 스페이서 획득은 후천성 면역의 첫 번째 단계에서 일어난다. 더 상세하게는, 스페이서 획득은 침입하는 DNA를 인식하고 선도 서열에 인접한 순행 반복서열에 결찰되는 프로토스페이서를 절단하는 Cas1 및 Cas2로 시작한다 나중에, 단일 가닥 연장 수선이 일어나고 순행 반복서열이 이중복된다.

[0088] CRISPR-연관 후천성 면역의 다음 단계는 각각의 유형의 CRISPR-Cas 시스템에서 서로 다르게 일어나는 CRISPR RNA (crRNA) 생합성을 포함한다. 일반적으로, 이러한 단계 도중, CRISPR 전사물은 Cas 유전자에 의해 절단되어 crRNA를 생성한다. 유형 I 시스템에서, Cas6e/Cas6f가 전사물을 절단한다. 유형 II 시스템은 전사촉진 (tracr) RNA를 활용하여 dsRNA를 형성하고, 이것은 Cas9 및 리보뉴클레아제 III에 의해 절단된다. 유형 III 시스템은 절단을 위해 Cas6 동족체를 사용한다.

[0089] CRISPR-연관 후천성 면역의 최종 단계에서, 처리된 crRNA는 Cas 단백질과 연합하여 간섭 복합체를 형성한다. 유형 I 및 유형 II 시스템에서, Cas 단백질은 침입하는 DNA의 분해를 위한 짧은 3-5 bp DNA 서열인 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)와 상호작용하는 반면, 유형 III 시스템은 분해를 위한 PAM과의 상호작용을 필요로 하지 않는다. 유형 III-B 시스템에서, crRNA은 분해를 위해 표적화 DNA 대신에 mRNA와 염기쌍을 형성한다.

[0090] CRISPR-Cas 시스템은 따라서 원핵 세포 내 RNAi-유사 면역 시스템처럼 기능한다. CRISPR-Cas 기술은 인간 세포주 및 세포에서 유전자를 비활성화하기 위해 사용된 바 있다. 예시로서, 유형 II 시스템을 기반으로 하는 CRISPR-Cas9 시스템은 유전체 편집을 위한 물질로서 사용되어 왔다.

[0091] 유형 II 시스템은 세 가지 성분을 필요로 한다: Cas9, crRNA, 및 tracrRNA. 상기 시스템은 tracrRNA 및 crRNA를 단일 합성 단일 가이드 RNA (sgRNA)로 조합함으로써 단순화될 수 있다.

[0092] 적어도 세 가지의 상이한 Cas9 뉴클레아제가 유전체 편집을 위해 개발된 바 있다. 첫 번째는 DSB를 특정한 DNA 부위에 도입하여, DSB 수선 기작을 활성화시키는 야생형 Cas9이다. DSB는 NHEJ 경로 또는 상동성-지정 수선 (HDR) 경로에 의해 수선될 수 있다. 두 번째는 유일하게 틈내기효소 활성을 가지는 Cas9D10A로도 공지인 돌연변이 Cas9이며, 이는 이것이 하나의 DNA 가닥만 절단하며 NHEJ를 활성화시키지 않음을 의미한다. 따라서, DNA 수선은 HDR 경로를 통해서만 진행된다.세 번째는 절단 활성을 가지지 않지만 DNA에 결합할 수 있는 뉴클레아제-결핍 Cas9 (dCas9)이다. 그러므로, dCas9는 절단 없이 유전체의 특정한 서열을 표적화 할 수 있다. dCas9를 다양한 이펙터 도메인과 융합시킴으로써, dCas9는 유전자 침묵화 또는 활성화 도구로서 사용될 수 있다.

[0093] 수많은 유전자가 본 명세서에 개시된 나노수송체에 의해 선별적으로 송달되는 유전자 편집 물질을 위해 표적화될 수 있다. 특정한 예시는 표적화 Shp1 포스파타제 유전자 (예컨대, 서열 번호: 2), PD1 수용체 유전자 (예컨대, 서열 번호: 3), TCRα 유전자 (예컨대, 서열 번호: 4); CCR5 유전자 (예컨대, 서열 번호: 5) 및/또는 CXCR4 유전자 (예컨대, 서열 번호: 6)를 포함한다.

[0094] Shp-1 (src 상동성 영역 2 도메인-함유 포스파타제-1; 티로신-단백질 포스파타제 비-수용체 유형 6 (PTPN6)로도 공지)은 인간에서 *PTPN6* 유전자에 의해 인코딩된다. Shp-1의 N-말단 부분은 두 개의 Src 동족체 (SH2) 도메인을 보유하며, 이들은 다른 세포 성분과 상호작용하는 단백질 포스포-티로신 결합 도메인으로서 기능하여 기질과 이의 상호작용을 조율할 수 있다. Shp-1은 조혈에 관여하는 다중 신호전달 경로의 조절인자로서 핵심 역할을 수행하며, 조혈 세포 신호전달에 관여하는 다양한 포스포-단백질과 상호작용한다. Shp-1은 단백질-티로신 인산화를 통해 성장 인자 수용체, 가령 EPO, IL-3, GM-CSF, 및 M-CSF에 대한 수용체, 및 다른 신호전달 단백질을 연결한다. Shp-1은 또한 면역글로불린 γFc 도메인 (Fc VRIIB1), NK 세포 저해 수용체, T 세포 수용체 (TCR), B 세포 수용체 (BCR), CD22, 및 CD72에 의해 촉발되는 저해 신호를 매개한다. *PTPN6* 유전자의 대안적으로 스플라이싱된

변이체가 존재하여, 구별되는 이소형을 인코딩한다. 포유류 Shp-1을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: NM_080549, NM_053908.1, 및 NM_013545에서 찾을 수 있다.

[0095] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 T 세포 신호전달을 개조하는 Shp1 포스파타제 유전자 표적화를 포함한다. Shp1 포스파타제 활성은 높은 친화성 T 세포 수용체의 기능적 활성을 제한하여, 희소 또는 낮은 친화성 종양 항원을 표적으로 하는 이들 수용체의 치료적 용도를 약화시킨다. (Hebeisen M, 등 SHP-1 phosphatase activity counteracts increased T cell receptor affinity. *JCI*. 2013). 또한, Shp1 활성은 충실성 종양에서 T 세포 치료적 산물의 손상된 항-종양 활성과 연관된다. (Moon EK, 등. Multifactorial T-cell Hypofunction That Is Reversible Can Limit the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor-Transduced Human T cells in Solid Tumors, *Clinical Cancer Research*, 2014) 이러한 이유로, Shp1의 하향-조절은 T 세포 및 치료적 T 세포 산물의 특이적 인식 및 기능적 활성을 향상시킬 수 있다.

[0096] PD1 (프로그램화 세포사 단백질 1; 분화 집단 279 (CD279)로도 공지)은 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 세포 표면 수용체이다. 이것은 활성화 T 세포, B 세포, 및 대식 세포의 표면 상에 발현되며 인간에서 *PDCD* 유전자에 의해 인코딩된다. 구조적으로, PD-1은 세포외 IgV 도메인, 막관통 영역, 및 세포내 꼬리를 포함한다. 세포내 꼬리는 면역수용체-티로신-기반 저해제 모티프 및 면역수용체 티로신 기반 전환 모티프에 위치한 두 개의 인산화 부위를 포함하여, PD-1가 TCR 신호를 부정적으로 조절하는데 관여함을 시사한다. PD-1은 면역 관문이다. 이것은 T 세포의 활성화를 방지하여 면역 시스템을 부정적으로 조절하며, 이는 자가면역성을 낮추고 자기-관용을 높인다. PD-1은 림프절 내 항원 특이적 T 세포에서 아폽토시스를 촉진하는 동시에 조절 T 세포 (억제 T 세포)에서 아폽토시스를 감소시킴으로써 이의 기능을 달성한다. PD-1은 리간드 PD-L1 및 PD-L2에 결합한다. 포유류 PD-1을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: AY238517, NM_001106927, 및 KJ865858에서 찾을 수 있다.

[0097] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 PD1 수용체 유전자 표적화를 포함한다. PD1 항체 차단은 강하게 입증된 치료적 효율을 가지지만, 잠재적으로 위장, 간, 및 내분비 시스템 뿐만 아니라 다른 장기에 영향을 주는 면역 관련 부작용을 일으킬 수 있다. (Postow MA, Managing Immune Checkpoint-Blocking Antibody Side Effects, ASCO, 2015). 유전자 편집을 통해 융합된 치료적 T 세포 산물에 대한 PD1 수용체 발현을 선별적으로 제거 또는 감소시킴으로써, 표적이탈 염증 부작용은 최소화될 수 있는 반면 융합된 T 세포의 강화된 생체 내 활성은 유지할 수 있다.

[0098] 앞서 언급한 바와 같이, T 세포 수용체 (TCR)는 펩티드가 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합될 때 항원의 단편을 인식하는데 중요한 역할을 수행하는 T 림프구의 표면 상에 발현된다. TCRα 사슬 유전자는 유전자은행 접근 번호: X04954, X72904.1, 및 L21699.1에서 찾을 수 있다.

[0099] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 TCRα 사슬 유전자 표적화를 포함한다. 내생적 TCR의 발현은 조작된 T 세포 수용체의 발현에 간섭할 수 있고, 자가면역 또는 동종이계반응성 반응을 매개한다. 표적화 TCRα 사슬 유전자는 조작된 T 세포 수용체의 발현을 향상시킬 수 있고, T 세포 산물 제조에서 부분 공여체 의존성을 제공한다.

[0100] CCR5 (케모카인 수용체 유형 5; CD195로도 공지)는 T 세포, 대식 세포, 수지상 세포, 호산구, 및 미소아교세포의 표면에 발현된다. 이것은 인간에서 CCR5 유전자에 의해 인코딩된다. CCR5는 내재 단백질의 베타 케모카인 수용체 패밀리에 속하는 G 단백질-커플링된 수용체이다.

[0101] 많은 형태의 바이러스, 가령 HIV가 CCR5를 숙주 세포에 침입하기 위한 보조-수용체로 사용한다. CCR5는 보조-수용체로서 지정되는데 왜냐하면 HIV 침입이 이의 당단백질 (gp120)이 CD4 및 숙주 세포 내 침입을 위한 보조-수용체 (CCR5) 둘다에 결합하는 것을 요구하기 때문이다.

[0102] 따라서 바이러스 감염을 방해하는 한 가지 방법은 CCR5의 발현을 차단 또는 감소시키는 것이다. CCR5 및 HIV의 껍질 당단백질 gp120 사이의 상호작용을 방해하기 위해 몇몇 CCR5 수용체 길항제가 개발되었다. 그러한 길항제의 예시는 PRO140 (Progenics), Vicriviroc (Schering Plough), Aplaviroc (GlaxoSmithKline), 및 Maraviroc (Pfizer)를 포함한다. CCR5에 대한 리간드의 예시는 RANTES, MIP-1β 및 MIP-1α를 포함한다. 이들 리간드는 시험관 내 HIV-1 감염을 억제할 수 있다. 포유류 CCR5를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: U66285, FJ573195, 및 AF022990에서 찾을 수 있다.

[0103] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 세포로의 HIV 침입과 같은 바이러스 침입을 감소시키기 위한 CCR5 유전자 표적화를 포함한다.

[0104] CXCR4 (CXC 케모카인 수용체 유형 4; CD184로도 공지)은 인간에서 CXCR4 유전자에 의해 인코딩된다. CCR5와 같

이, CXCR4는 세포로의 바이러스 침입, 가령 세포로의 HIV 침입을 위한 보조-수용체이다. CXCR4는 또한 많은 유형의 암 세포에서 발현된다. CXCR4는 또한 림프구에 대한 화학주성 활성을 가지는 분자인 기질-유래-인자-1(SDF-1, 또는 CXCL12)에 특이적인 알파-케모카인 수용체이다. SDF-1은 T-향성 HIV-1 단리물의 복제를 억제한다. 포유류 CCR4를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: NM_001008540, NM_022205, 및 NM_009911에서 찾을 수 있다.

[0105] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 세포로의 HIV 침입과 같은 바이러스 침입을 감소시키기 위한 CXCR4 유전자 표적화를 포함한다.

[0106] 언급한 바와 같이, 본 명세서에 개시된 특정 구체예는 표현형-개조 단백질의 발현에 의존적이다. 표현형-개조 단백질은 예를 들면, 세포 분화, 생존능 또는 이동을 조절할 수 있다. 표현형-개조 단백질의 예시는, 예를 들면, FOXO1, LKB1, TERT, CCR2b 및 CCR4를 포함한다.

[0107] FOXO1 (포크헤드 박스 단백질 O1 또는 횡문근육종 내 포크헤드)는 인간에서 FOXO1 유전자(예컨대, 서열 번호: 7)에 의해 인코딩되는 전사 인자다. FOXO1는 감염에 대한 기억 CD8+ T 세포 반응을 조절하는 유전 프로그램에 선별적으로 포함된다 (Kim 등, Immunity, 2013, 39(2): 286-97). Kim 등은 활성화 CD8+ T 세포에서 FOXO1가 결여된 마우스가 리스테리아 모노사이토제네스(Listeria monocytogenes) 감염에 대해 일차는 아니지만 이차적 반응 결핍을 가짐을 나타내었다. 상기와 동일. 기억-전구체 T 세포는 단기 이펙터 T 세포에 비해 더 많은 양의 FOXO1를 발현하였고, 이는 기억-전구체 T 세포의 생성 및 유지를 촉진하였다. 상기와 동일. 또한 전사 인자 Tcf7 및 케모카인 수용체 CCR7이 FOXO1과 상호작용함이 나타났다. 상기와 동일.

[0108] FOXO1은 또한 기억 CD4 및 CD8 T 세포의 이펙터-내지-기억 전이 및 기능적 성숙을 촉진하는 역할을 수행한다 (Tejara 등 J. of Immunology, 2013, 191(1):187-199). FOXO1가 이펙터 세포의 분화에 필요하지 않음에도, 기억 CD8 T 세포는 FOXO1의 부재에서 노화의 징후를 나타냈고, 이는 손상된 상기 반응 및 불량한 보호 면역을 야기한다. 상기와 동일. 포유류 FOXO1를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: BC021981, NM_001191846, 및 NM_019739에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 FOXO1의 발현을 포함한다.

[0109] LKB1 (간 키나아제 B1; 신장 암종 항원 NY-REN-19 또는 세린/트레오닌 키나아제 11 (STK11)로도 공지)은 인간에서 STK11 유전자에 의해 인코딩되는 세린/트레오닌 단백질 키나아제이다. LKB1은 T 세포 발달, 생존능, 활성화, 및 대사에 중요한 조절인자이다 (MacIver, J. Immunol. 2011, 187(8): 4187-4198). LKB1-결핍 T 세포는 세포 증식 및 생존능에 결함을 나타내고, 변형된 당분해 및 지질 대사를 나타낸다. 상기와 동일. LKB1은 또한 에너지 영양분이 부족한 경우 성장 및 증식을 억제하는 AMPK 및 AMPK 연관 키나아제를 비롯한 일군의 키나아제를 활성화한다. AMPK, AMPK-연관 키나아제, 및 LKB1은 세포 극성을 유지하는데 중요한 역할을 수행하며 이를 통해 종양 세포의 성장을 저해한다. 포유류 LKB1을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: NM_000455, NM_001108069, 및 AB015801에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 LKB1의 발현을 포함한다. 예시적인 LKB1 서열은 서열 번호: 8이다.

[0110] T 세포 특이적인 전사 인자 7 (TCF7)은 림프구 분화에 중요한 역할을 수행하는 전사 활성화인자이다. 이러한 유전자는 대부분 T-세포에서 발현된다. 인코딩된 단백질은 인핸서 요소를 결합하고 CD3E 유전자를 활성화할 수 있고, 이는 또한 피드백 메커니즘을 통해 CTNNB1 및 TCF7L2 유전자를 억제할 수 있다. 인간 TCF7를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 NCBI 참조 번호: NC_000005.10에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 TCF7의 발현을 포함한다.

[0111] 에오메소더민 (EOMES)은 척추동물에서 중배엽 및 중추신경계의 배아 발달에 결정적인 전사 인자다. 이것은 또한 이펙터 CD8+ T 세포의 분화에 관여한다. 인간 EOMES를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 NCBI 참조 번호: NC_000003.12 및 서열 번호: 9에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 EOMES의 발현을 포함한다.

[0112] DNA 결합 2의 저해제인, HLH 단백질 (ID2)은 나선-루프-나선 (HLH) 도메인을 보유하지만 염기성 도메인은 보유하지 않는 전사 조절인자다. DNA 결합 패밀리의 저해인자의 구성원은 HLH 도메인을 통해 이들의 이종이합체화 상대를 억제함으로써 우성-음성 방식으로 염기성 나선-루프-나선 전사 인자의 기능을 저해한다. ID2는 세포 분화를 부정적으로 조절하는 역할을 수행한다. 인간 ID2를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 NCBI 참조 번호: NC_000002.12 및 서열 번호: 10에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 ID2의 발현을 포함한다.

[0113] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 특정 세포 표현형 가령 치료 효율을 위해 필요한 TEM, TCM., 또는 TREG 세

포를 생산하기 위해 전사 인자 및 신호전달 분자 가령 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, 및/또는 ID2의 발현을 통해 T 세포의 분화를 개조하는 것을 포함한다. TCM., 및 TEM 세포는 항-종양 모델에서 강화된 치료 효율이 입증된 바 있다.

[0114] 텔로머라제는 DNA 가닥에서 텔로미어를 길게 하는 RNA-의존성 중합효소로, 이를 통해 노화 세포가 유사분열 후기 및 아폽토시스로 들어가는 대신 잠재적 불멸화되는 것을 허용한다. 인간 텔로머라제 복합체는 인간 텔로머라제 역전사효소 (TERT), 텔로머라제 RNA (TR 또는 TERC), 및 디스카린 (DKC1) 중 두 가지 분자를 포함한다. TERT는, TERC와 함께, TTAGGG 서열 내 뉴클레오티드를 텔로미어의 말단에 부가하는 것을 촉매한다. 반복적 DNA 서열의 부가는 유사분열을 통한 세포 분열 후 염색체 말단의 분해를 방지한다. 따라서, 텔로머라제는 텔로미어를 수선하고 연장하여 노화 세포가 분열하고 50-70회 세포 분열의 헤이플릭 한계(Hayflick limit)를 초과할 수 있게 한다. 포유류 TERT을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: NM_198253, NM_053423, NM_009354; 및 서열 번호: 11에서 찾을 수 있다.

[0115] 정상 체세포는 검출가능한 텔로머라제 활성을 가지지 않는다. 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 TERT의 발현을 포함한다. 연구는 입양 전달된 T 세포의 생체 내 지속성 및 항종양 효능이 TERT mRNA의 송달을 통해 강화될 수 있음을 나타낸 바 있다 (전기천공을 이용, Cell Discovery (2015) 1, 15040).

[0116] 악성 종양 세포는, 그러나, 증가된 텔로머라제 활성을 가지는 것으로 발견되었다. 따라서, 상기 기술된 바와 같은 유전자-편집 도구가 악성 암에서 TERT를 표적으로 하기 위해 사용될 수 있었다.

[0117] CCR2b (C-C 케모카인 수용체 유형 2 또는 CD192 (분화 집단 192)) 는 G-단백질 커플링된 수용체이다. 인간에서, CCR2는 CCR2 유전자에 의해 인코딩된다. 이러한 유전자는 단일 유전자의 대안적인 스플라이싱에 의해 수용체의 두 가지 이소형, CCR2a 및 CCR2b를 인코딩한다.

[0118] CCR2b는 MIP-1 (RANTES 수용체)에 연관되며 단핵백혈구 화학주성을 매개하는 케모카인인 단핵백혈구 화학주성인자 단백질-1 (MCP-1)을 위한 수용체이다. CCR2은 또한 MCP-2, MCP-3, 및 MCP-4에 낮은 친화성이긴 하지만 결합한다. CCR2a 및 CCR2b는 이들의 C-말단 꼬리에서 차이를 갖는다. MCP-1은 C-C 케모카인 패밀리에 속하는 소형 케모카인이다. MCP-1은 단핵백혈구, 기억 T 세포, 및 수지상 세포를 조직 상해 또는 감염에 의해 발생한 염증 부위로 끌어오는데 관여한다. MCP-1은 염증 질환 가령 건선, 류마티스 관절염, 죽상동맥경화증, 뿐만 아니라 종양에 대한 염증 반응에서 단핵백혈구 침투에 관여한다. 포유류 CCR2b을 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: NM_001123396 및 NM_009915; 및 서열 번호: 12에서 찾을 수 있다.

[0119] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 치료적 T 세포의 종양 이동을 강화하기 위한 CCR2b의 발현을 포함한다(J. Immunother. 2010 Oct;33(8):780-8).

[0120] CCR4 (C-C 케모카인 수용체 4 또는 CD194 (분화 집단 194))는 G-단백질 커플링 된 수용체이다. 인간에서 이것은 CCR4 유전자에 의해 인코딩된다. CCR4는 CC 케모카인인 MCP-1, MIP-1, RANTES, TARC, 및 대식 세포-유래 케모카인을 위한 수용체이다. CC 케모카인은 단핵백혈구 뿐만 아니라 다른 세포 가령 NK 세포 및 수지상 세포의 이동을 유발시킨다. 한 예시로, MCP-1은 단핵백혈구가 혈류를 떠나게 하고 주변 조직에 들어가 조직 대식 세포가 되게 만든다. RANTES는 T 세포, 호산구, 및 호염기구를 끌어모은다. 따라서, CCR4 및 이의 리간드, CC 케모카인은 다양한 유형의 백혈구의 세포 이동을 조절한다. 포유류 CCR4를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열은 유전자은행 접근 번호: NM_005508, NM_133532, 및 NM_009916.2; 및 서열 번호: 13에서 찾을 수 있다.

[0121] 본 명세서에 개시된 특정한 구체예는 종양 호밍 및 치료적 T 세포의 항-종양 활성을 향상하기 위한 CCR4의 발현을 포함한다 (Blood. 2009 Jun 18;113(25):6392-402).

[0122] 특정한 구체예는 본 명세서에 개시된 나노수송체를 이용하여 선택된 세포에 의해 발현될 핵산을 수송하며 여기서 한 용도는 히트 앤드 런 효과와 독립적이거나 부가적이다.특정한 구체예에서, 그러한 구체예는 선택된 세포의 성장, 생존, 면역 기능 및/또는 종양 세포 표적화를 향상시킬 수 있다. 유전자 변형의 예시는 키메라 항원 수용체 (CAR), αβ T-세포 수용체 (또는 이의 변형), 및/또는 염증-촉진 사이토킨의 발현을 허용하는 것들을 포함한다. CAR 변형 및/또는 αβ T-세포 수용체 변형은 변형된 림프구가 세포 유형을 특이적으로 표적화 하도록 허용한다.

[0123] 한 양태에서, 유전적으로-변형된 림프구는 종양 인식을 향상시켜, 증가된 자연적인 T-세포 증식 및/또는 사이토킨 생산을 촉발시킬 수 있다.

[0124] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"는 적어도 하나의 결합 도메인 및 하나의 이펙터 도메인 및 임의로 스페이서

도메인 및/또는 막관통 도메인을 포함하는 합성적으로 설계된 수용체를 가리킨다.

[0125] 결합 도메인은 특히 표적화 세포 상의 마커에 특이적으로 결합하는 임의의 펩티드를 포함할 수 있다. 결합 도메인의 공급원은 다양한 종으로부터의 항체 가변 영역을 포함한다 (이는 항체, sFv, scFv, Fab, scFv-기반 그라바바디(grababody), 또는 가용성 VH 도메인 또는 도메인 항체의 형태일 수 있다). 이들 항체는 단 하나의 중사슬 가변 영역을 이용하여 항원-결합 영역을 형성할 수 있고, 즉, 이들 기능적 항체는 중사슬 만의 동종이합체이다 ("중사슬 항체"로 지칭됨) (Jespers 등, *Nat. Biotechnol. 22*:1161, 2004; Cortez-Retamozo 등, *Cancer Res. 64*:2853, 2004; Baral 등, *Nature Med. 12*:580, 2006; 및 Barthelemy 등, *J. Biol. Chem. 283*:3639, 2008).

[0126] 결합 도메인의 대안적인 공급원은 무작위 펩티드 라이브러리를 인코딩하는 서열 또는 대안적인 비-항체 스캐폴드의 루프 영역에 조작된 다양한 아미노산을 인코딩하는 서열, 가령 scTCR (*예컨대*, Lake 등, *Int. Immunol*.11:745, 1999; Maynard 등, *J. Immunol. Methods 306*:51, 2005; 미국 특허 제8,361,794호를 참조), 피브리노겐 도메인(*예컨대*, Weisel 등, *Science 230*:1388, 1985를 참조), Kunitz 도메인(*예컨대*, 미국 특허 제6,423,498호를 참조), 설계된 안키린 반복 단백질 (DARPins) (Binz 등, *J. Mol. Biol. 332*:489, 2003 및 Binz 등, *Nat. Biotechnol. 22*:575, 2004), 피브로넥틴 결합 도메인 (애드넥틴 또는 모노바디) (Richards 등, *J. Mol. Biol. 326*:1475, 2003; Parker 등, *Protein Eng. Des. Selec. 18*:435, 2005 및 Hackel 등 (2008) *J. Mol. Biol. 381*:1238-1252), 시스테인-노트 미니단백질(Vita 등 (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 92*:6404-6408; Martin 등 (2002) *Nat. Biotechnol. 21*:71, 2002 및 Huang 등 (2005) *Structure 13*:755, 2005), 테트라트리코펩티드 반복 도메인 (Main 등, *Structure11*:497, 2003 및 Cortajarena 등, *ACS Chem. Biol. 3*:161, 2008), 류신-농축 반복 도메인 (Stumpp 등, *J. Mol. Biol. 332*:471, 2003), 리포칼린 도메인 (*예컨대*, WO 2006/095164, Beste 등, *Proc. Nat´ Acad. Sci. (USA) 96*:1898, 1999 및 Schoenfeld 등, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 106*:8198, 2009을 참조), V-유사 도메인 (*예컨대*, 미국 특허 출원 공개 제2007/0065431호를 참조), C-유형 렉틴 도메인 (Zelensky 및 Gready, *FEBS J. 272*:6179, 2005; Beavil 등, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 89*:753, 1992 및 Sato 등, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 100*:7779, 2003), $mAb^2$ 또는 Fcab™(*예컨대*, PCT 특허 출원 공개 제WO 2007/098934; WO 2006/072620호를 참조), 아마딜로 반복 단백질(*예컨대*, Madhurantakam 등, *Protein Sci. 21*: 1015, 2012; PCT 특허 출원 공개 제WO 2009/040338호를 참조), 아필린(Ebersbach 등, *J. Mol. Biol. 372*: 172, 2007), 아피바디, 아비머, 노틴스, 파이노머, 아트리머, 세포독성 T-림프구 연관 단백질-4 (Weidle 등, *Cancer Gen. Proteo. 10*:155, 2013) 등을 포함한다 (Nord 등, *Protein Eng. 8*:601, 1995; Nord 등, *Nat. Biotechnol. 15*:772, 1997; Nord 등, *Euro. J. Biochem. 268*:4269, 2001; Binz 등, *Nat. Biotechnol. 23*:1257, 2005; Boersma 및 Plueckthun, *Curr. Opin. Biotechnol. 22*:849, 2011).

[0127] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 $V_{\alpha/\beta}$ 및 $C_{\alpha/\beta}$ 사슬 (*예컨대*, $V_\alpha$-$C_\alpha$, $V_\beta$-$C_\beta$, $V_\alpha$-$V_\beta$) 또는 관심의 표적 (*예컨대*, 펩티드-MHC 복합체)에 대해 특이적인 $V_\alpha$-$C_\alpha$, $V_\beta$-$C_\beta$, $V_\alpha$-$V_\beta$ 쌍을 비롯한 단일 사슬 T 세포 수용체 (scTCR)이다.

[0128] 예시적인 CAR은 예를 들면, 메소텔린, Her2, WT-1 및/또는 EGRF를 표적으로 하는 리간드 결합 도메인을 발현한다. 예시적인 T-세포 수용체 변형은 흑색종-연관 항원 (MAGE) A3 TCR을 표적화 한다.

[0129] 특정한 하기의 암이 TCR 또는 CAR의 세포외 성분 내에 연관된 세포 마커(들)을 결합하는 결합 도메인을 포함시켜 표적화될 수 있다:

| 표적화 암 | 세포 마커(들) |
|---|---|
| 전립선암 | PSMA, WT1, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), SV40 T |
| 유방암 | HER2, ERBB2, ROR1 |
| 줄기세포 암 | CD133 |
| 난소암 | L1-CAM, MUC16의 세포외 도메인 (MUC-CD), 폴레이트 결합 단백질 (폴레이트 수용체), Lewis Y, ROR1, 메소텔린, WT-1 |
| 중피종 | 메소텔린 |
| 신장 세포 암종 | 카르복시-탈수효소-IX (CAIX); |
| 흑색종 | GD2 |
| 췌장암 | 메소텔린, CEA, CD24, ROR1 |
| 폐암 | ROR1 |

[0130]

[0131] 전술된 내용을 제한함 없이, 세포 마커는 또한 A33; BAGE; Bcl-2; β-카테닌; B7H4; BTLA; CA125; CA19-9; CD3, CD5; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD30; CD33; CD37; CD40; CD52; CD44v6; CD45; CD56; CD79b; CD80; CD81; CD86; CD123; CD134; CD137; CD151; CD171; CD276; CEA; CEACAM6; c-Met; CS-1; CTLA-4; 사이클린 B1; DAGE; EBNA; EGFR; EGFRvIII, 에프린B2; ErbB2; ErbB3; ErbB4; EphA2; 에스트로겐 수용체; FAP; 페리틴; α-태아단백질 (AFP); FLT1; FLT4; 폴레이트-결합 단백질; 프리즐드(Frizzled); GAGE; G250; GD-2; GHRHR; GHR; GITR; GM2; gp75; gp100 (Pmel 17); gp130; HLA; HER-2/neu; HPV E6; HPV E7; hTERT; HVEM; IGF1R; IL6R; KDR; Ki-67; Lewis A; Lewis Y; LIFRβ; LRP; LRP5; LTβR; MAGE; MART; 메소텔린; MUC; MUC1; MUM-1-B; myc; NYESO-1; O-아세틸 GD-2; O-아세틸 GD3; OSMRβ; p53; PD1; PD-L1; PD-L2; PRAME; 프로게스테론 수용체; PSA; PSMA; PTCH1; RANK; ras; Robo1; ROR1; 서비빈; TCRα; TCRβ; 테나신; TGFBR1; TGFBR2; TLR7; TLR9; TNFR1; TNFR2; TNFRSF4; TWEAK-R; TSTA 티로시나제; VEGF; 및 WT1을 포함한다.

[0132] 특정한 암 세포 세포 마커는 다음을 포함한다:

| 암 항원 | 서열 |
|---|---|
| PSMA | MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLD ELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPN YISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLE RDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGG VQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPP DSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHR DSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRL LQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYD PMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFD SLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYA PSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA (서열 번호: 14) |
| PSCA | MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVIS KGCSLNCVDDSQDYYVGKKNITCCDTDLCNASGAHALQPAAAILALLPALGLLLWGPGQL (서열 번호: 15) |

[0133]

| | |
|---|---|
| 메소텔린 | MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSP RQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFL NPDAFSGPQACTHFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEADVRALGGLA CDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPSTWSVSTMDALRGLL PVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESL IFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLK MSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYL CSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAP TEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQR QDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSVQEALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA (서열 번호: 16) |
| CD19 | MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLK LSLGLPGLGIHMRPLASWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNV SDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCVPPRDSLNQSLSQDLT MAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRAT AQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQR ALVLRRKRKRMTDPTRRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSY GNPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEGEGYEEPDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSGYEN PEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLGSQSYEDMR GILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGTWSTR (서열 번호: 17) |

[0134]

| | |
|---|---|
| CD20 | MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKTLGAVQIMNGLFH IALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLWGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFA AISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQSL FLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTET SSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP (서열 번호: 18) |
| ROR1 | MHRPRRRGTRPPLLALLAALLLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDEP MNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDT GYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYM ESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRDEC EILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYN STGVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLD ENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALLFFFICVCRNNQKSSSAPVQR QPKHVRGQNVEMSMLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVA IKTLKDYNNPQQWTEFQQEASLMAELHHPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQGDLHEFLIMR SPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSSHFFVHKDLAARNILIGEQLHVK ISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLLPIRWMPPEAIMYGKFSSDSDIWSFGVVLWEIFSFGLQPY YGFSNQEVIEMVRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRRPRFKDIHVRLRSWEGLSSHT SSTTPSGGNATTQTTSLSASPVSNLSNPRYPNYMFPSQGITPQGQIAGFIGPPIPQNQRFIPI NGYPIPPGYAAFPAAHYQPTGPPRVIQHCPPPKSRSPSSASGSTSTGHVTSLPSSGSNQEANI PLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQASLLGDANIHGHTESMISAEL (서열 번호: 19) |

[0135]

| | |
|---|---|
| WT1 | MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMRRVPGVAPTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQ<br>MHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFFRSDQLKRHQRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRT<br>HTGEKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKLQLAL (서열 번호: 20) |
| CD33 | DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQ<br>EVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTH<br>RPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDH<br>GTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGAIGGAGVTA<br>LLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKKSKLHGPTETSSCSGAAPTV<br>EMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (서열 번호: 21) |

[0136]

[0137] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 PSMA를 결합할 수 있다. PSMA에 대해 특이적인 수많은 항체가 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있고 서열, 에피토프 결합, 및 친화성에 대해 쉽게 특징분석될 수 있다. 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 항-메소텔린 리간드 (난소암, 췌장암, 및 중피종의 치료와 연관); 항-WT-1 (백혈병 및 난소암의 치료와 연관); 항-HIV-gag (HIV 감염의 치료와 연관); 또는 항-거대세포바이러스 (CMV 질환 가령 헤르페스바이러스의 치료와 연관)를 포함할 수 있다.

[0138] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 CD19를 결합할 수 있다. 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 CD19에 특이적인 VH 및 VL 영역을 포함하는 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)이다. 특정한 구체예에서, $V_H$ 및 $V_L$ 영역은 인간이다. 예시적인 $V_H$ 및 $V_L$ 영역은 항-CD19 특이적 단클론 항체 FMC63의 분절을 포함한다. 특정한 구체예에서, scFV는 RASQDISKYLN의 CDRL1 서열 (서열 번호: 22), SRLHSGV의 CDRL2 서열 (서열 번호: 23), 및 GNTLPYTFG의 CDRL3 서열 (서열 번호: 24)을 비롯한 가변 경사슬을 포함하는 인간 또는 인간화된 scFV이다. 특정한 구체예에서, scFV는 DYGVS의 CDRHI 서열 (서열 번호: 25), VTWGSETTYYNSALKS의 CDRH2 서열 (서열 번호: 26), 및 YAMDYWG의 CDRH3 서열 (서열 번호: 27)을 비롯한 가변 중사슬을 포함하는 인간 또는 인간화된 scFv이다. 다른 CD19-표적화 항체 가령 SJ25C1 및 HD37가 공지되어 있다. (SJ25C1: Bejcek 등 Cancer Res 2005, PMID 7538901; HD37: Pezutto 등 JI 1987, PMID 2437199). 서열 번호: 28은 항-CD19 scFv (VH-VL) FMC63 DNA 서열을 제공하고 서열 번호: 29는 항-CD19 scFv (VH-VL) FMC63 아미노산 서열을 제공한다.

[0139] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 RORI를 결합할 수 있다. 특정한 구체예에서, scFV는 ASGFDFSAYYM의 CDRL1 서열 (서열 번호: 30), TIYPSSG의 CDRL2 서열 (서열 번호: 31), 및 ADRATYFCA의 CDRL3 서열 (서열 번호: 32)을 비롯한 가변 경사슬을 포함하는 인간 또는 인간화된 scFv이다. 특정한 구체예에서, scFV는 DTIDWY의 CDRH1 서열 (서열 번호: 33), VQSDGSYTKRPGVPDR의 CDRH2 서열 (서열 번호: 34), 및 YIGGYVFG의 CDRH3 서열 (서열 번호: 35)을 비롯한 가변 중사슬을 포함하는 인간 또는 인간화된 scFv이다. RORI에 대해 특이적인 수많은 항체가 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있고 서열, 에피토프 결합, 및 친화성에 대해 쉽게 특징분석될 수 있다.

[0140] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 TCR Vα, Vβ, Cα, 또는 Cβ의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열을 포함하고, 여기서 각각의 CDR은 관심의 표적에 특이적으로 결합하는 TCR 또는 단편 또는 이의 유도체로부터 변화가 없거나 최대 하나, 둘, 또는 세 가지 변화를 포함한다.

[0141] 특정한 구체예에서, 결합 도메인 Vα, Vβ, Cα, 또는 Cβ영역은 공지의 TCR (예컨대, 높은-친화성 TCR)의 Vα, Vβ, Cα, 또는 Cβ로부터 유래하거나 이를 기반으로 할 수 있고, 공지의 TCR의 Vα, Vβ, Cα, 또는 Cβ와 비교할 때, 하나 이상의 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 삽입, 하나 이상의 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 결실, 하나 이상의 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 아미노산 치환 (예컨대, 보존적 아미노산 치환 또는 비-보존적 아미노산 치환), 또는 상기-언급된 변화의 조합을 내포한다. 삽입, 결실 또는 치환은 Vα, Vβ, Cα, 또는 Cβ영역에서, 아미노- 또는 카르복시-말단 또는 이들 영역의 양쪽 말단을 비롯한 어느 곳에서나 일어날 수 있고, 단서로서 각각의 CDR은 변화를 포함하지 않거나 최대 하나, 둘, 또는 세 가지 변화를 포함해야 하고 단서로서 변형된 Vα, Vβ, Cα, 또는 Cβ영역을 내포하는 결합 도메인은 여전히 야생형과 유사한 친화성

을 가지고 이의 표적에 특이적으로 결합할 수 있어야 한다.

[0142] 특정한 구체예에서, 본 개시의 결합 도메인 VH 영역은 공지의 단클론 항체의 VH로부터 유래하거나 이를 기반으로 할 수 있고, 공지의 단클론 항체의 $V_H$와 비교할 때, 하나 이상의 (*예컨대*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 삽입, 하나 이상의 (*예컨대*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 결실, 하나 이상의 (*예컨대*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 아미노산 치환 (*예컨대*, 보존적 아미노산 치환 또는 비-보존적 아미노산 치환), 또는 상기-언급된 변화의 조합을 내포할 수 있다. 삽입, 결실 또는 치환은 $V_H$에서, 아미노- 또는 카르복시-말단 또는 이들 영역의 양쪽 말단을 비롯한 어느 곳에서나 일어날 수 있고, 단서로서 각각의 CDR은 변화를 포함하지 않거나 최대 하나, 둘, 또는 세 가지 변화를 포함해야 하고 단서로서 변형된 $V_H$ 영역을 내포하는 결합 도메인은 여전히 야생형 결합 도메인과 유사한 친화성을 가지고 이의 표적에 특이적으로 결합할 수 있어야 한다.

[0143] 특정한 구체예에서, 본 개시의 결합 도메인 VL 영역은 공지의 단클론 항체의 VL로부터 유래하거나 이를 기반으로 하며, 공지의 단클론 항체의 VL과 비교할 때, 하나 이상의 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 삽입, 하나 이상의 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 결실, 하나 이상의 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) 아미노산 치환 (예컨대, 보존적 아미노산 치환), 또는 상기-언급된 변화의 조합을 내포한다. 삽입, 결실 또는 치환은 VL에서, 아미노- 또는 카르복시-말단 또는 이들 영역의 양쪽 말단을 비롯한 어느 곳에서나 일어날 수 있고, 단서로서 각각의 CDR은 변화를 포함하지 않거나 최대 하나, 둘, 또는 세 가지 변화를 포함해야 하고 단서로서 변형된 VL 영역을 내포하는 결합 도메인은 여전히 야생형 결합 도메인과 유사한 친화성을 가지고 이의 표적에 특이적으로 결합할 수 있어야 한다.

[0144] 특정한 구체예에서, 결합 도메인은 경사슬 가변 영역 (VL) 또는 중사슬 가변 영역 (VH), 또는 둘다의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일한 서열이거나 이를 포함하며, 여기서 각각의 CDR은 관심의 표적에 특이적으로 결합하는 단클론 항체 또는 단편 또는 이의 유도체로부터 변화가 없거나 최대 하나, 둘, 또는 세 가지 변화를 포함한다.

[0145] 이펙터 도메인은 세포에 기능적 신호를 전달할 수 있다. 특정한 구체예에서, 이펙터 도메인은 세포 반응을 직접 촉진하는 하나 이상의 다른 단백질과 연합함으로써 세포 반응을 직접 또는 간접적으로 촉진할 것이다. 이펙터 도메인은 표적화 세포 상에 발현된 마커에 결합시 CAR을 발현하는 형질도입된 림프구의 적어도 하나의 기능의 활성화를 제공할 수 있다. 림프구의 활성화는 하나 이상의 증식, 분화, 활성화 또는 다른 이펙터 기능을 포함할 수 있다. 특정한 구체예에서, 송달된 폴리뉴클레오티드는 이펙터 도메인에 대해 인코딩한다.

[0146] 이펙터 도메인은 하나, 둘, 셋 이상의 수용체 신호전달 도메인, 세포내 신호전달 도메인, 보조 자극 도메인, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 다양한 신호전달 분자 (예컨대, 신호 전달 수용체) 중 어느 하나로부터의 임의의 세포내 이펙터 도메인, 보조자극 도메인 또는 둘 모두가 본 개시의 CAR에서 사용될 수 있다.

[0147] 예시적인 이펙터 도메인은 4-1BB, CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD27, CD28 (예컨대, 서열 번호: 36), CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NOTCH1, Wnt, NKG2D, OX40, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTα, TCRα, TCRβ, TRIM, Zap70, PTCH2, 또는 이중의 임의의 조합으로부터 온 것들을 포함한다.

[0148] T 세포 활성화는 두 가지 구별된 종류의 세포질 신호전달 서열에 의해 매개된다고 말할 수 있다: 항원-의존성 일차 활성화를 개시하고 T 세포 수용체 유사 신호를 제공하는 종류 (일차 세포질 신호전달 서열) 및 항원 독립적인 방식으로 작용하여 이차 또는 보조-자극 신호를 제공하는 종류 (이차 세포질 신호전달 서열). 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열은 수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 iTAM으로 공지된 신호전달 모티프를 내포할 수 있다. 일차 세포질 신호전달 서열을 내포하는 iTAM의 예시는 CD3 제타, FeR 감마, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래한 것들을 포함한다.

[0149] 특정한 구체예에서, 이펙터 도메인은 세포질 신호전달 단백질과 연합하는 세포질 부분, 여기서 세포질 신호전달 단백질은 림프구 수용체 또는 이의 신호전달 도메인임, 다수의 ITAM을 비롯한 단백질, 보조자극 인자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0150] 세포내 신호전달 도메인의 예시는 CD3 제타 사슬의 세포질 서열, 및/또는 함께 작용하여 CAR 연합 후 신호 전달을 개시하는 보조- 수용체, 뿐만 아니라 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 가진 임의의 합성 서열을 포함한다. 특정한 구체예에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 임의의 다른 요망되는 세포

질 도메인(들)과 조합된 세포내 신호전달 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들면, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 도메인 및 보조자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 보조자극 신호전달 영역은 보조자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부분을 가리킨다. 보조자극 분자는 마커에 대한 림프구의 반응을 위해 필요한 발현된 마커 리간드가 아닌 세포 표면 분자이다. 그러한 분자의 예시는 CD27, CD28, 4-1BB (CD 137), OX40, CD30, CD40, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0151] 스페이서 영역은 표적 인식을 최적화하기 위해 표적 상의 개별적인 마커에 대해 맞춤 제작될 수 있다. 특정한 구체예에서, 스페이서 길이는 마커 에피토프의 위치, 에피토프에 대한 항체의 친화성, 및/또는 마커 인식에 대응하여 시험관 내 및/또는 생체 내에서 CAR을 발현하는 림프구가 증식하는 능력을 기초로 선택될 수 있다.

[0152] 전형적으로 스페이서 영역은 CAR의 결합 도메인 및 막관통 도메인 사이에서 발견된다. 스페이서 영역은 결합 도메인의 유연성을 제공할 수 있고 변형된 세포에서 높은 발현 수준을 허용한다. 특정한 구체예에서, 스페이서 영역은 적어도 10 내지 250 아미노산, 적어도 10 내지 200 아미노산, 적어도 10 내지 150 아미노산, 적어도 10 내지 100 아미노산, 적어도 10 내지 50 아미노산 또는 적어도 10 내지 25 아미노산을 가질 수 있고 임의의 상기 나열된 범위의 종말점 사이의 임의의 정수를 포함한다. 특정 구체예, 스페이서 영역은 250 이하 아미노산; 200 이하 아미노산, 150 이하 아미노산; 100 이하 아미노산; 50 이하 아미노산; 40 이하 아미노산; 30 이하 아미노산; 20 이하 아미노산; 또는 10 이하 아미노산을 가진다.

[0153] 특정한 구체예에서, 스페이서 영역은 면역글로불린 유사 분자의 경첩 부위, 예를 들면 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4로부터의 경첩 부위의 전부 또는 일부로부터 유래할 수 있다. 경첩 부위는 이합체화와 같은 원치 않는 구조적 상호작용을 방지하도록 변형될 수 있다. 특정한 구체예에서, 경첩 부위의 전부 또는 일부는 면역글로불린 불변 영역의 하나 이상의 도메인과 조합될 수 있다. 예를 들면, 경첩 부위의 일부분은 CH2 또는 CH3 도메인 또는 이의 변이체의 전부 또는 일부와 조합될 수 있다.

[0154] 본 명세서에 개시된 CAR은 또한 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 특정한 구체예에서, CAR 폴리뉴클레오티드는 막관통 도메인을 인코딩한다. 막관통 도메인은 림프구 막 내에 CAR의 고정을 제공한다. 막관통 도메인은 자연적인 또는 합성 공급원으로부터 유래할 수 있다. 공급원이 자연적인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래할 수 있다. 막관통 영역은 적어도 T-세포 수용체, CD28, CD3, CD45, CD4, CDS, CD9, CDI6, CD22; CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CDI34, CDI37 및 CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬의) 막관통 영역(들)을 포함한다. 특정한 구체예에서, 합성 또는 변이체 막관통 도메인은 대부분 소수성인 잔기 가령 류신 및 발린을 포함한다.

[0155] 특정한 구체예에서, CAR은 CD28 및 CD3ζ 세포질 신호전달 도메인과 조합된 PSMA (J591)의 세포외 도메인에 특이적인 단일-사슬 항체 (scFv)로 이루어진 P28z 융합 수용체를 포함한다. 특정한 구체예에서, CAR은 서열 번호: 37의 P28z CAR를 포함한다. 서열 번호: 37은 쥐의 성분을 포함한다. 아미노산 위치 1-797은 항-PSMA scFv (J592)를 포함하는 반면 위치 797-1477은 쥐의 CD8 막관통 도메인, 쥐의 CD28 신호전달 도메인 및 쥐의 CD3제타 신호전달 도메인을 포함한다. 임의의 P28z 도메인이 개별적으로 최적화 도메인으로 대체될 수 있다. 특정한 구체예에서, 서열 번호: 37의 위치 797-1477 내부의 막관통 도메인 및 신호전달 도메인은 특히 인간 또는 다른 동물에서 사용하기에 최적화된 도메인으로 대체될 수 있다. 특정한 구체예에서, 결합 도메인의 임의의 전부 또는 일부, 이펙터 도메인의 임의의 전부 또는 일부, 스페이서 도메인의 임의의 전부 또는 일부 및/또는 막관통 도메인의 임의의 전부 또는 일부가 인간 또는 다른 동물에서 사용하기 위해 최적화될 수 있다.특정한 구체예에서, P28z CAR은 인간에서 사용하기 위해 최적화되었다. 인간에 대해 최적화되는 경우, P28z CAR은 인간에서 더 적은 면역원성을 가질 수 있고 인간이-아닌 항체에 비해 더 적은 수의 비-면역원성 에피토프를 가진다.

[0156] 특정한 구체예에서, ROR1-특이적 및 CD19-특이적 CAR은 2A2, R12, 및 R11 mAh (ROR1) 및 FMC63 mAb (CD19)의 VL 및 VH 사슬 분절을 이용하여 구성될 수 있다. R11 및 R12에 대한 가변 영역 서열은 Yang 등, Plos One 6(6):e21018, June 15, 2011에서 제공된다. 각각의 scFV은 $(Gly_4Ser)_3$ (서열 번호: 38) 단백질에 의해 '경첩-CH2-CH3' (229 AA, 서열 번호: 40), '경첩-CH3' (119 AA, 서열 번호: 41) 또는 '경첩' 단독 (12 AA, 서열 번호: 42) 서열을 비롯한 IgG4-Fc (UniProt 데이터베이스: P01861, 서열 번호: 39)로부터 유래한 스페이서 도메인에 연결될 수 있다. 모든 스페이서는 자연적인 IgG4-Fc 단백질의 위치 108에 위치한 '경첩' 도메인 내부의 S→P 치환을 내포할 수 있고, 인간 CD28의 27 AA 막관통 도메인 (서열 번호: 43, 예시적인 전장 CD28에 관해서는 UniProt: P10747를 참조) 및 각각 인간 CD3ζ의 이소형 3의 112 AA 세포질 도메인 (UniProt: P20963, 서열 번호: 46)에 연결될 수 있는 (i) 자연적인 CD28 단백질의 위치 186-187에 LL→GG 치환을 가지는 인간 CD28의 41

AA 세포질 도메인 (서열 번호: 44) 또는 (ii) 인간 4-1BB의 42 AA 세포질 도메인 (UniProt: Q07011, 서열 번호: 45) 중 어느 하나를 포함하는 이펙터 도메인 신호전달 모듈에 연결될 수 있다. 구조체는 T2A 리보솜 건너뛰기 요소 (서열 번호: 47) 및 키메라 수용체의 tEGFR 서열 (서열 번호: 48) 하류를 인코딩한다. tEGFR은 서열, 가령 STREP 태그 II® (서열 번호: 49), Myc 태그 (서열 번호: 50), V5 태그 (서열 번호: 51), FLAG® 태그 (서열 번호: 52), His 태그, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 펩티드 또는 분자를 결합하는 태그 카세트로 대체되거나 보충될 수 있다. 각각의 전이유전자를 인코딩하는 코돈-최적화 유전자 서열은 합성될 수 있고 (Life Technologies) NheI 및 NotI 제한 부위를 이용하여 epHIV7 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝될 수 있다. epHIV7 렌티바이러스 벡터는 pHIV7의 거대세포바이러스 프로모터를 EF-1 프로모터로 교체함으로써 pHIV7 벡터로부터 유래할 수 있다. ROR1-키메라 수용체, CD19-키메라 수용체, tEGFR, 또는 태그 카세트-인코딩 렌티바이러스는 포장 벡터 pCHGP-2, pCMV-Rev2 및 pCMV-G, 및 CALPHOS® 형질감염 시약 (Clontech)을 이용하여 293T 세포에서 생성될 수 있다.

[0157] HER2-특이적 키메라 수용체는 HER2의 막 근위 에피토프를 인식하는 HER2-특이적 mAb의 VL 및 VH 사슬 분절을 이용하여 구성될 수 있고, scFV는 IgG4 경첩/CH2/CH3, IgG4 경첩/CH3, 및 IgG4 경첩 단독 세포외 스페이서 도메인 및 CD28 막관통 도메인, 4-1BB 및 CD3ζ 신호전달 도메인에 연결될 수 있다.

[0158] CD19 키메라 수용체는 CD19-특이적 mAb FMC63 (scFv: VL-VH)의 서열에 상응하는 단일 사슬 가변 단편, '경첩-CH2-CH3' 도메인 (229 AA, 긴 스페이서) 또는 '경첩' 도메인 단독 (12 AA, 짧은 스페이서) 중 어느 하나를 포함하는 IgG4-Fc로부터 유래한 스페이서, 및 막 근위 CD28 또는 4-1BB 보조자극 도메인을, 단독으로 또는 직렬로 가지는 CD3ζ의 신호전달 모듈을 포함할 수 있다. 전이유전자 카세트는 키메라 수용체 유전자로부터의 말단이 잘린 EGFR (tEGFR) 하류를 포함할 수 있고 절단가능한 T2A 요소에 의해 분리되어, 키메라 수용체-변형된 세포에 대한 형질도입, 선별 및 *생체 내* 추적을 위한 태그 서열로 기능할 수 있다. tEGFR은 ExoCBM, 가령 STREP 태그 II® (서열 번호: 49), Myc 태그 (서열 번호: 50), V5 태그 (서열 번호: 51), FLAG® 태그 (서열 번호: 52), His 태그, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 다른 펩티드 또는 분자를 결합하는 태그 카세트로 대체되거나 보충될 수 있다.

[0159] 상이한 리간드 결합 도메인, 상이한 스페이서 영역 길이, 상이한 세포내 결합 도메인 및/또는 상이한 막관통 도메인을 인코딩하는 상이한 잠재적 CAR 핵산 구조체는 비-유전적으로 변형된 림프구 및/또는 다른 CAR보다 향상된 기능을 갖는 CAR을 규명하기 위해 생체 내 (동물 모델 내) 및/또는 시험관 내에서 시험될 수 있다. 특정한 구체예에서 CAR은 본 명세서에 기술된 히트 앤드 런 효과과 독립적으로 또는 부가적으로 발현된다.

[0160] 본 명세서에 개시된 나노수송체의 크기는 광범위하게 달라질 수 있고 상이한 방식으로 측정될 수 있다. 예를 들면, 본 개시의 나노수송체는 100 nm의 최소 크기를 가질 수 있다. 본 개시의 나노수송체는 또한 500 nm과 동일하거나 그 미만, 150 nm 미만, 100 nm 미만, 90 nm 미만, 80 nm 미만, 70 nm 미만, 60 nm 미만,50 nm 미만, 40 nm 미만, 30 nm 미만, 20 nm 미만, 또는 10 nm 미만의 최소 크기를 가질 수 있다. 특정한 구체예에서, 나노수송체는 5 nm 내지 500 nm, 10 nm 내지 100 nm, 20 nm 내지 90 nm, 30 nm 내지 80 nm, 40 nm 내지 70 nm, 및 40 nm 내지 60 nm의 최소 크기를 가질 수 있다. 특정한 구체예에서, 크기는 나노입자 또는 코팅된 나노입자의 직경이다. 특정한 구체예에서, 본 개시의 나노수송체 집단은 500 nm과 동일하거나 그 미만, 100 nm 미만, 90 nm 미만, 80 nm 미만, 70 nm 미만, 60 nm 미만,50 nm 미만, 40 nm 미만, 30 nm 미만, 20 nm 미만, 또는 10 nm 미만의 중간 최소 크기를 가질 수 있다. 특정한 구체예에서, 본 개시의 조성물 내 나노수송체 집단은 5 nm 내지 500 nm, 10 nm 내지 100 nm, 20 nm 내지 90 nm, 30 nm 내지 80 nm, 40 nm 내지 70 nm, 및 40 nm 내지 60 nm의 중간 직경을 가질 수 있다. 나노수송체의 크기는 예컨대, 통상적인 기술, 가령 동적 광산란 및/또는 전자 현미경을 이용하여 측정될 수 있다.

[0161] 생체외 사용 방법. 본 명세서에 개시된 나노수송체는 생체외 세포 제조에서 사용될 수 있다 (예컨대, 도 1A 및 4C를 참조). 예를 들면, 상기 방법은 개체로부터 림프구를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 림프구는, 예컨대, 일반적으로 당해 분야에 공지된 임의의 절차를 이용하여 개체로부터 수득될 수 있다.

[0162] 림프구의 공급원은 제대 혈액, 태반 혈액, 및 말초 혈액을 포함한다. 혈액 샘플의 수집, 항-응고 및 처리, 등과 관련된 방법은 공지이다. 예를 들면, Alsever 등, 1941, N.Y. St. J. Med. 41:126; De Gowin, 등, 1940, J. Am. Med. Ass. 114:850; Smith, 등, 1959, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 38:573; Rous 및 Turner, 1916, J. Exp. Med. 23:219; 및 Hum, 1968, Storage of Blood, Academic Press, New York, pp. 26-160를 참조하라. 림프구의 공급원은 또한 연령-적절한 공여체로부터의 골수 (Kodo 등, 1984, J. Clin Invest. 73:1377-1384를 참

조), 배아 세포, 대동맥-생식샘-중신 유래 세포, 림프, 간, 흉선, 및 비장을 포함한다. 림프구의 모든 수집된 샘플은 원치 않는 성분에 대해 선별되고 해당 시점에 허용되는 최신 표준에 따라 폐기, 처리, 또는 사용될 수 있다.

[0163] 특정한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 나노수송체에 림프구를 노출하기 전에 추가적인 림프구 수집 또는 단리가 필요하지 않으며 이는 나노수송체가 이종 세포 집단 내에서 선택된 세포 유형을 선별적으로 표적화 하기 때문이다.

[0164] 특정한 구체예에서, 본 명세서에 개시된 나노수송체에 노출하기 전에 일부 추가적인 세포 수집 및 단리를 진행하는 것이 유익할 수 있다. 림프구는 임의의 적절한 기술을 이용하여 샘플로부터 수집 및 단리될 수 있다. 적절한 수집 및 단리 절차는 자성 분리; 형광 활성화 세포 분류 (FACS; Williams 등, 1985, J. Immunol. 135:1004; Lu 등, 1986, Blood 68(1):126-133); 친화성 크로마토그래피; 단클론 항체에 연결되거나 단클론 항체와 함께 사용되는 물질; 고체 기질에 부착된 항체를 이용한 "팬닝" (Broxmeyer 등, 1984, J. Clin. Invest. 73:939-953); 렉틴 가령 대두를 이용한 선택적 응집 (Reisner 등, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:1164); 등을 포함한다. 특정한 구체예는 제한된 단리를 이용할 수 있다. 제한된 단리는 예를 들면, 적혈구 및/또는 부착 식세포의 제거에 의한 미정제 세포 농축을 가리킨다.

[0165] 특정한 구체예에서, 개체 샘플 (예컨대, 혈액 샘플)은 자성 세포 분리기, 예를 들면, CliniMACS®세포 분리 시스템 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)와 관련하여 자성 입자에 직접 또는 간접적으로 공액결합된 항-CD8 또는 항-CD34 항체를 이용하여 CD8+ T 세포 또는 CD34+ HSPC에 대해 선별/농축되도록 처리될 수 있다. 유사하게, 상기 기술된 임의의 마커를 발현하는 림프구(예컨대, T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD40; CD39; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 트랜스페린 수용체)는 이들 마커에 대한 항체 또는 다른 결합 도메인을 이용하여 단리 및 농축될 수 있다.

[0166] 특정한 구체예에서, 나노수송체는 증식 절차 전 또는 초기 단계에서 림프구와 조합될 것이다. 이러한 접근법은 더 적은 수의 세포의 변형을 허용할 것이고, 이러한 변형은 이것이 증식하면서 세포 집단 전체에 걸쳐 퍼지게 된다. 특정한 구체예에서, 일시적인 발현을 바탕으로 히트-앤드-런 효과를 제공하는 본 명세서에 개시된 나노수송체에 노출된 후에 변형된 림프구의 증식이 일어날 수 있다.

[0167] 증식은 하나 이상의 성장 인자, 가령: 앤지오포이에틴-유사 단백질 (Angptl, 예컨대, Angptl2, Angptl3, Angptl7, Angptl5, 및 Mfap4); 에리트로포이에틴; 섬유아세포 성장 인자-1 (FGF-1); Flt-3 리간드 (Flt-3L); 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF); 과립구-대식 세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF); 인슐린 성장 인자-2 (IFG-2); 인터류킨-3 (IL-3); 인터류킨-6 (IL-6); 인터류킨-7 (IL-7); 인터류킨-11 (IL-11); 줄기 세포 인자 (SCF; c-키트 리간드 또는 비만세포 성장 인자로도 공지임); 트롬보포이에틴 (TPO); 및 이들의 유사체(여기서 유사체는 자연발생적 성장 인자의 생물학적 활성을 가지는 성장 인자의 임의의 구조적 변이체를 포함한다; 예컨대, WO 2007/1145227 및 미국 특허 공개 제2010/0183564호를 참조하라)의 존재에서 일어날 수 있다.

[0168] 특정한 구체예에서, 림프구의 증식을 위해 적절한 성장 인자의 양 또는 농도는 증식을 촉진하기에 효과적인 양 또는 농도이다. 림프구 집단은 바람직하게는 인간 개체에게 적어도 하나의 융합을 제공할만큼 충분한 수, 전형적으로 약 $10^4$ 세포/kg 내지 $10^9$ 세포/kg의 세포가 수득될 때까지 증식된다.

[0169] 림프구 증식에 적절한 성장 인자의 양 또는 농도는 성장 인자 제조의 활성, 및 성장 인자 및 림프구 사이의 종 관련성, 등에 의존적이다. 일반적으로, 성장 인자(들) 및 림프구가 동일한 종인 경우, 배양 배지 내 성장 인자의 총 양은 1 ng/ml 내지 5 μg/ml, 5 ng/ml 내지 1 μg/ml, 또는 5 ng/ml 내지 250 ng/ml 범위이다. 특정한 구체예에서, 성장 인자의 양은 5-1000 또는 50-100 ng/ml의 범위일 수 있다.

[0170] 특정한 구체예에서, 성장 인자는 다음 농도의 증식 배양 조건에 존재한다: 25-300 ng/ml SCF, 25-300 ng/ml Flt-3L, 25-100 ng/ml TPO, 25-100 ng/ml IL-6 및 10 ng/ml IL-3. 특정한 구체예에서, 50, 100, 또는 200 ng/ml SCF; 50, 100, 또는 200 ng/ml의 Flt-3L; 50 또는 100 ng/ml TPO; 50 또는 100 ng/ml IL-6; 및 10 ng/ml IL-3이 사용될 수 있다.

[0171] 림프구는 세포외 기질 단백질 가령 피브로넥틴 (FN), 또는 이의 단편 (예컨대, CH-296 (Dao 등, 1998, Blood 92(12):4612-21)) 또는 RetroNectin®(재조합 인간 피브로넥틴 단편; (Clontech Laboratories, Inc., Madison,

WI)이 고정된 조직 배양 접시에서 증식될 수 있다.

[0172] Notch 작용제가 HSC 증식에 특히 유용할 수 있다. 특정한 구체예에서, HSC는 HSC를 고정된 Notch 작용제, 및 50 ng/ml 또는 100 ng/ml SCF; 고정된 Notch 작용제, 및 각각 50 ng/ml 또는 100 ng/ml의 Flt-3L, IL-6, TPO, 및 SCF; 또는 고정된 Notch 작용제, 및 각각 50 ng/ml 또는 100 ng/ml의 Flt-3L, IL-6, TPO, 및 SCF, 및 10 ng/ml의 IL-11 또는 IL-3에 노출시킴으로써 증식될 수 있다.

[0173] 언급된 바와 같이, 림프구는 개체로부터 수득된다. 특정한 구체예에서, 히트-앤드-런 변형된 및 증식된 림프구는 치료적으로 효과적인 양의 본래의 샘플이 유래된 동일한 개체에 재-도입된다. 특정한 구체예에서, 히트-앤드-런 변형된 및 증식된 림프구는 치료적으로 효과적인 양으로 상이한 개체에게 투여된다. 치료적으로 효과적인 양은 본 명세서의 다른 곳에서 더 자세하게 기술된다.

[0174] 이들 구체예에서, 히트-앤드-런 변형된 및 확장된 림프구는 개체에게 투여하기 위한 세포-기반 조성물로 제형화될 수 있다. 세포-기반 조성물은 개체에게 투여하기 위해 약제학적으로 허용되는 수송체로 제조된 증식된 세포를 가리킨다. 특정한 구체예에서, 세포-기반 조성물은 증식의 완료 및 투여를 위한 제형화 후 합리적으로 가능한 한 빨리 이를 필요로 하는 개체에게 투여된다.

[0175] 특정한 구체예에서, 세포를 저온 보존하는 것이 필수이거나 유익할 수 있다. 용어 "동결/냉각" 및 "저온 보존/냉동 보존"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 냉각은 동결 건조를 포함한다.

[0176] 당해 분야의 숙련가에겐 이해될 바와 같이, 세포의 동결은 파괴적일 수 있으나 (Mazur, P., 1977, Cryobiology 14:251-272를 참조) 그러한 손상을 방지하기 위해 이용가능한 수많은 절차가 존재한다. 예를 들면, (a) 저온보호제의 사용, (b) 동결 속도의 조절, 및/또는 (c) 변성 반응을 최소화하기 위해 충분히 낮은 온도에 저장함으로써 손상이 방지될 수 있다. 예시적인 저온보호제는 디메틸 설폭사이드 (DMSO) (Lovelock 및 Bishop, 1959, Nature 183:1394-1395; Ashwood-Smith, 1961, Nature 190:1204-1205), 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈 (Rinfret, 1960, Ann. N.Y. Acad. Sci. 85:576), 폴리에틸렌 글리콜 (Sloviter 및 Ravdin, 1962, Nature 196:548), 알부민, 덱스트란, 수크로스, 에틸렌 글리콜, i-에리스리톨, D-리비톨, D-만니톨 (Rowe 등, 1962, Fed. Proc. 21:157), D-소르비톨, i-이노시톨, D-락토스, 콜린 클로라이드 (Bender 등, 1960, J. Appl. Physiol. 15:520), 아미노산 (Phan The Tran 및 Bender, 1960, Exp. Cell Res. 20:651), 메탄올, 아세트아미드, 글리세롤 모노아세테이트 (Lovelock, 1954, Biochem. J. 56:265), 및 무기염 (Phan The Tran 및 Bender, 1960, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104:388; Phan The Tran 및 Bender, 1961, Radiobiology 내, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, Ilbery 발행, Butterworth, London, p. 59)을 포함한다. 특정한 구체예에서, DMSO가 사용될 수 있다. 혈장의 부가 (예컨대, 20-25%의 농도까지)는 DMSO의 보호 효과를 증대시킬 수 있다. DMSO의 부가 후에, 세포는 동결될 때까지 0℃로 유지될 수 있으며, 이는 1%의 DMSO 농도가 4℃를 넘는 온도에서 독성일 수 있기 때문이다.

[0177] 세포의 냉동 보존에서, 천천히 조절되는 냉각 속도가 결정적일 수 있고 상이한 저온보호제 (Rapatz 등, 1968, Cryobiology 5(1): 18-25) 및 상이한 세포 유형은 상이한 최적 냉각 속도를 가진다 (냉각 속도가 줄기 세포의 생존 및 이의 이식 가능성에 미치는 효과에 대해서 예컨대, Rowe 및 Rinfret, 1962, Blood 20:636; Rowe, 1966, Cryobiology 3(1):12-18; Lewis, 등, 1967, Transfusion 7(1):17-32; 및 Mazur, 1970, Science 168:939- 949를 참조하라). 물이 얼음으로 바뀌는 융합 단계의 열은 최소화되어야 한다. 냉각 절차는 예컨대, 프로그램화 가능한 냉각 장치 또는 메탄올 욕(bath) 절차를 사용하여 수행될 수 있다. 프로그램화 가능한 냉각 장치는 최적 냉각 속도의 측정을 허용하며 일반적이고 재현가능한 냉각을 용이하게 한다.

[0178] 특정한 구체예에서, DMSO-처리된 세포는 얼음에서 선-냉각되고 차가운 메탄올을 담은 트레이로 옮겨지고 이 트레이는 다시 -80℃의 기계 냉장고 (예컨대, Harris 또는 Revco)에 배치될 수 있다. 1° 내지 3℃분의 냉각 속도를 나타내는 메탄올 욕 및 샘플의 열전대 측정이 선호될 수 있다. 적어도 두 시간 후에, 시료는 -80℃의 온도에 도달할 수 있고 액체 질소 (-196℃)에 즉시 배치될 수 있다.

[0179] 완전한 동결 후, 세포는 장기 극저온 저장 용기로 빠르게 옮겨질 수 있다. 특정한 구체예에서, 샘플은 액체 질소 (-196℃) 또는 증기 (-1℃) 속에서 극저온 저장될 수 있다. 그러한 저장은 고도로 효율적인 액체 질소 냉장고의 이용가능성으로 인해 용이해진다.

[0180] 세포의 조작, 냉동 보존, 및 장기 저장을 위한 추가적인 고려사항 및 절차는 다음의 예시적인 문헌에서 찾을 수 있다: 미국 특허 제4,199,022; 3,753,357; 및 4,559,298호; Gorin, 1986, Clinics In Haematology 15(1):19-48; Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, July 22-26,

1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107-186; Livesey 및 Linner, 1987, Nature 327:255; Linner 등, 1986, J. Histochem. Cytochem. 34(9):1123-1135; Simione, 1992, J. Parenter. Sci. Technol. 46(6):226-32).

[0181] 냉동 보존 후에, 냉동된 세포는 사용을 위해 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법에 따라 해동될 수 있다. 냉동 세포는 바람직하게는 빠르게 해동하고 해동시 즉시 차갑게 해야 한다. 특정한 구체예에서, 냉동 세포를 담은 바이알은 따듯한 물 욕조에 목까지 잠길 수 있고; 부드러운 회전은 해동하는 동안 세포 현탁액을 혼합하고 따뜻한 물로부터 내부의 언 내용물로의 열 전달을 확실히 증가시킬 것이다. 얼음이 완전히 녹는대로, 바이알은 즉시 얼음에 배치될 수 있다.

[0182] 특정한 구체예에서, 방법은 해동 도중 세포 응집을 방지하도록 사용될 수 있다. 예시적인 방법은: 동결 전 및/또는 후에 DNA 가수분해효소 (Spitzer 등, 1980, Cancer 45:3075-3085), 저 분자량 덱스트란 및 시트레이트, 하이드록시에틸 전분 (Stiff 등, 1983, Cryobiology 20:17-24), 등의 부가를 포함한다.

[0183] 당해 분야의 숙련가에게 이해되는 바와 같이, 인간에게 독성인 저온보호제가 사용되는 경우, 이것은 치료적 사용 전에 제거되어야 한다. DMSO는 심각한 독성을 가지지 않는다.

[0184] 예시적인 수송체 및 세포의 투여 방식은 미국 특허 공보 제2010/0183564호의 14-15쪽에 기술된다. 추가적인 약제학적 수송체는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21판, David B. Troy, 발행, Lippicott Williams & Wilkins (2005)에 기술된다.

[0185] 특정한 구체예에서, 세포는 배양 배지로부터 수확되고, 세척되고 수송체 내로 치료적-유효량으로 농축될 수 있다. 예시적인 수송체는 식염수, 완충 식염수, 생리학적 식염수, 물, Hanks 용액, Ringer 용액, Nonnosol-R (Abbott Labs), Plasma-Lyte A®(Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL), 글리세롤, 에탄올, 및 이들의 조합을 포함한다.

[0186] 특정한 구체예에서, 수송체는 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 다른 인간 혈청 성분 또는 소태아 혈청으로 보충될 수 있다. 특정한 구체예에서, 융합을 위한 수송체는 5% HAS 또는 덱스트로스를 갖는 완충 식염수를 포함한다. 추가적인 등장화제는 3가 또는 더 높은 당 알코올, 가령 글리세린, 에리스리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨, 또는 만니톨을 비롯한 다가 당 알코올을 포함한다.

[0187] 수송체는 완충제, 가령 시트레이트 완충액, 석시네이트 완충액, 타르트레이트 완충액, 퓨마레이트 완충액, 글루코네이트 완충액, 옥살레이트 완충액, 락테이트 완충액, 아세테이트 완충액, 포스페이트 완충액, 히스티딘 완충액, 및/또는 트리메틸아민 염을 포함할 수 있다.

[0188] 안정화제는 증량제부터 세포를 용기 벽에 붙지 않게 하는 첨가제까지 기능할 수 있는 광범위한 부형제 종류를 가리킨다. 전형적인 안정화제는 다가 당 알코올; 아미노산, 가령 아르기닌, 라이신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 및 트레오닌; 유기 당 또는 당 알코올, 가령 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 리비톨, 미오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤, 및 사이클리톨, 가령 이노시톨; PEG; 아미노산 중합체; 황-함유 환원제, 가령 우레아, 글루타티온, 티옥산, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, 알파-모노티오글리세롤, 및 티오황산나트륨; 저 분자량 폴리펩티드 (즉, <10 잔기); 단백질 가령 HSA, 소의 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 가령 폴리비닐피롤리돈; 단당류 가령 자일로스, 만노스, 프럭토스 및 글루코스; 이당류 가령 락토스, 말토오스 및 수크로스; 삼당류 가령 라피노스, 및 다당류 가령 덱스트란을 포함할 수 있다.

[0189] 필요하거나 유익한 경우, 세포-기반 조성물은 주사 부위의 통증을 완화해주는 국부 마취제 가령 리도카인을 포함할 수 있다.

[0190] 예시적인 보존제는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레솔, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤잘코늄 할라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 알킬 파라벤 가령 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 사이클로헥사놀, 및 3-펜타놀을 포함한다.

[0191] 세포-기반 조성물 내 세포의 치료적으로 효과적인 양은 $10^2$ 초과 세포, $10^3$ 초과 세포, $10^4$ 초과 세포, $10^5$ 초과 세포, $10^6$ 초과 세포, $10^7$ 초과 세포, $10^8$ 초과 세포, $10^9$ 초과 세포, $10^{10}$ 초과 세포, $10^{11}$ 초과 세포일 수 있다.

[0192] 본 명세서에 개시된 세포-기반 조성물에서, 세포는 일반적으로 일 리터 이하, 500 mL 이하, 250 mL 이하, 또는

100 mL 이하의 부피이다. 따라서 투여되는 세포의 밀도는 전형적으로 $10^4$, 세포/mL, $10^7$ 세포/mL, 또는 $10^8$ 세포/mL를 초과한다.

[0193] 본 명세서에 개시된 세포-기반 조성물은 예를 들면, 주사, 주입, 관류, 또는 세척에 의한 투여용으로 제조될 수 있다. 세포-기반 조성물은 추가로 골수, 정맥내, 피내, 동맥내, 결절내, 림프내, 복강내, 병변내, 전립선내, 질내, 직장내, 국소, 척추강내, 종양내, 근육내, 소포내, 및/또는 피하 주사를 위해 제형화될 수 있다.

[0194] 생체 내 사용 방법을 위한 조성물. 본 명세서에 개시된 나노수송체는 또한 개체에게 직접 투여하기 위해 제형화될 수 있고 여기서 선별적 표적화 및 히트-앤드-런 변형은 생체 내에서 일어난다 (당해 분야의 숙련가에게 이해되는 바와 같이, 본 명세서에 기술된 생체외 및 생체 내 접근법은 서로 배타적이지 않으며 조합되어 실시될 수 있다). 이들 조성물은 본 명세서에서 나노수송체-기반 조성물로 지칭된다.

[0195] 특정한 구체예에서, 나노수송체는 적어도 0.1% w/v 또는 w/w의 나노수송체; 적어도 1% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 10% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 20% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 30% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 40% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 50% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 60% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 70% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 80% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 90% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 적어도 95% w/v 또는 w/w/의 나노수송체; 또는 적어도 99% w/v 또는 w/w/의 나노수송체를 포함할 수 있는 나노수송체-기반 조성물의 일부로서 제공된다.

[0196] 본 명세서에 개시된 나노수송체-기반 조성물은 주사, 흡입, 주입, 관류, 세척 또는 섭취에 의한 투여용으로 제형화될 수 있다. 본 명세서에 개시된 나노수송체-기반 조성물은 추가로 정맥내, 피내, 동맥내, 결절내, 림프내, 복강내, 병변내, 전립선내, 질내, 직장내, 국소, 척추강내, 종양내, 근육내, 소포내, 경구 및/또는 피하 투여 및 더 상세하게는 정맥내, 피내, 동맥내, 결절내, 림프내, 복강내, 병변내, 전립선내, 질내, 직장내, 국소, 척추강내, 종양내, 근육내, 소포내, 경구 및/또는 피하 주사를 위해 제형화될 수 있다.

[0197] 주사를 위해, 나노수송체-기반 조성물은 가령 Hanks 용액, Ringer 용액, 또는 생리학적 식염수를 비롯한 완충액 내 수성 용액으로 제형화될 수 있다. 수성 용액은 제형화제 가령 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 제형은 사용 전에 적절한 비히클, 예컨대, 무균 무-발열원 물로 구성하기 위해 동결건조된 및/또는 분말 형태일 수 있다.

[0198] 경구 투여를 위해, 나노수송체-기반 조성물은 정제, 알약, 드라제, 캅셀, 액체, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제형화될 수 있다. 경구 고체 제형 가령, 예를 들면, 분말, 캅셀 및 정제를 위해, 적절한 부형제는 결합제 (트래거캔스검, 아카시아, 옥수수전분, 젤라틴), 충전제 가령 당, 예컨대 락토스, 수크로스, 만니톨 및 소르비톨; 이칼슘 포스페이트, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로오스, 마그네슘 카르보네이트; 셀룰로오스 제제 가령 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트래거캔스검, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스, 나트륨 카르복시- 메틸셀룰로오스, 및/또는 폴리비닐피롤리돈 (PVP); 과립화 물질; 및 결합 물질을 포함한다. 요망되는 경우, 붕해제, 가령 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 가교-연결된 폴리비닐피롤리돈, 아가, 또는 알긴산 또는 이들의 염 가령 나트륨 알지네이트가 부가될 수 있다. 요망되는 경우, 고체 제형은 표준 기술을 이용하여 당-코팅 또는 장-코팅될 수 있다. 착향제, 가령 페퍼민트, 윈터그린 오일, 체리향, 오렌지향, 등이 또한 사용될 수 있다.

[0199] 흡입에 의한 투여를 위해, 나노수송체-기반 조성물은 적절한 추진제, 예컨대, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 기체를 사용한, 기밀 팩 또는 네뷸라이저로부터의 에어로졸 분사제로서 제형화될 수 있다. 기밀 포장된 에어로졸의 경우에 투여 단위는 계측된 양을 송달하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 젤라틴 캅셀 및 카트리지는 치료제의 분말 혼합물 및 적절한 분말 베이스 가령 락토스 또는 전분을 함유하여 제형화될 수 있다.

[0200] 본 명세서에 개시된 임의의 나노수송체-기반 조성물 제형은 유리하게는 임의의 다른 약제학적으로 허용되는 수송체를 포함하며 이는 연구, 예방적 및/또는 치료적 처리용이든 관계 없이 투여의 이익을 넘어서는 중요한 부작용, 알러지 또는 다른 안 좋은 반응을 만들지 않는 것들을 포함한다. 예시적인 약제학적으로 허용되는 수송체 및 제형은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18판. Mack Printing Company, 1990에 개시된다. 게다가, 제형은 미국 FDA 생물학적 표준청 및/또는 다른 관련 외국 규제 기구에서 요구하는 무균성, 발열원성, 일반 안전성 및 순도 표준을 충족하도록 제조될 수 있다.

[0201] 예시적인 일반적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 수송체는 임의의 및 모든 증량제 또는 충전제, 용매 또는 보조-용매, 분산물 배지, 코팅제, 계면활성제, 항산화제 (예컨대, 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E), 보존제,

등장화제, 흡수 지연제, 염, 안정화제, 완충제, 킬레이트제 (예컨대, EDTA), 겔, 결합제, 붕해제, 및/또는 활택제를 포함한다.

[0202] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충액, 석시네이트 완충액, 타르트레이트 완충액, 퓨마레이트 완충액, 글루코네이트 완충액, 옥살레이트 완충액, 락테이트 완충액, 아세테이트 완충액, 포스페이트 완충액, 히스티딘 완충액, 및/또는 트리메틸아민 염을 포함한다.

[0203] 예시적인 보존제는 페놀, 벤질 알코올, 메타-크레솔, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤잘코늄 할라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 알킬 파라벤 가령 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 사이클로헥사놀, 및 3-펜타놀을 포함한다.

[0204] 예시적인 등장화제는 3가 또는 더 높은 당 알코올, 가령 글리세린, 에리스리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨, 또는 만니톨을 비롯한 다가 당 알코올을 포함한다.

[0205] 예시적인 안정화제는 유기 당, 다가 당 알코올, 폴리에틸렌 글리콜; 황-함유 환원제, 아미노산, 저 분자량 폴리펩티드, 단백질, 면역글로불린, 친수성 중합체 또는 다당류를 포함한다.

[0206] 나노수송체-기반 조성물은 또한 데포 제제로 제형화될 수 있다. 데포 제제는 적절한 중합체 또는 소수성 물질 (예를 들면 허용되는 오일 내 에멀젼으로) 또는 이온 교환 수지를 이용하여, 또는 드물게 가용성인 유도체, 예를 들면, 드물게 가용성인 염으로 제형화될 수 있다.

[0207] 추가적으로, 나노수송체-계 조성물은 적어도 하나의 활성 성분을 함유하는 고체 중합체의 반투성 기질을 이용하여 서-방출 시스템으로 제형화될 수 있다. 다양한 서-방출 물질이 확립되어 있고 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지이다. 서-방출 시스템은 이들의 화학적 성질에 따라, 투여 후 수 주 내지 최대 100 일에 걸쳐 활성 성분을 방출할 수 있다.

[0208] 사용 방법. 본 명세서에 개시된 방법은 본 명세서에 개시된 세포-기반 조성물 및 나노수송체-기반 조성물로 개체 (인간, 수의학적 동물, 가축 및 연구 동물)를 치료하는 것을 포함한다. 언급한 바와 같이 조성물은 암부터 감염성 질환에 이르는 수많은 상이한 용태를 치료할 수 있다. 조성물은 또한 백신 보강제로서 사용될 수 있다.

[0209] 개체의 치료는 치료적으로 효과적인 양의 송달을 포함한다. 치료적으로 효과적인 양은 유효량, 예방적 치료 및/또는 치료적 처리를 제공할 수 있다.

[0210] "유효량"은 개체에서 요망되는 생리학적 변화를 일으키기 위해 필요한 화합물의 양이다. 효과적인 양은 흔히 연구 목적을 위해 투여된다. 본 명세서에 개시된 유효량은 표현형-개조 단백질의 유전자-편집 또는 발현의 효과로서 세포의 표현형을 개조한다.

[0211] "예방적 치료"는 질환 또는 용태의 징후 또는 증상을 나타내지 않거나 질환 또는 용태의 초기 징후 또는 증상만을 나타내는 개체에의 투여를 포함하며 따라서 치료제는 질환 또는 조건이 추가로 발전할 위험을 약화, 방지, 또는 감소시킬 목적을 위해 투여된다. 따라서, 예방적 치료는 질환 또는 장애에 대한 방지적 처리로 기능한다. 백신은 예방적 치료의 한 예이다.

[0212] 특정한 구체예에서, 예방적 치료는 바이러스 감염, 가령 HIV를 치료하기 위해 투여된다. 예를 들면, 조성물은 바이러스 감염을 일으킬 위험이 있거나, 바이러스에 노출된 적이 있는 개체에게, 바이러스 감염 또는 질환의 발전을 방지, 감소, 또는 지연시키기 위해 예방적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 조성물은 바이러스 (예컨대, HIV)에 노출된 가능성이 있는 개체 또는 바이러스에게 노출될 높은 위험이 있는 개체에게 투여될 수 있다.

[0213] "치료적 처리"는 질환 또는 용태의 증상 또는 징후를 나타내는 개체에게 투여되는 처리를 포함하고 질환 또는 용태의 징후 또는 증상들을 약화 또는 제거할 목적을 위해 개체에게 투여된다.

[0214] 예방적 및 치료적 처리는 질환 또는 용태를 완전히 예방 또는 치료할 필요가 없지만 또한 부분적 이익을 제공한다.

[0215] 암의 맥락에서, 치료적으로 효과적인 양은 종양 세포의 수 감소, 전이의 수 감소, 종양 부피 감소, 기대 수명 증가, 암 세포의 아폽토시스 유도, 암 세포사 유도, 암 세포 내 화학- 또는 방사선감수성 유도, 암 세포 주변 혈관형성 저해, 암 세포 증식 저해, 종양 성장 저해, 전이 방지, 개체의 수명 연장, 암-연관 통증 감소, 전이 수 감소, 및/또는 치료 후 암의 재현 또는 재발 감소를 일으킬 수 있다.

[0216] 바이러스의 맥락에서, 치료적으로 효과적인 양은 바이러스-감염된 세포의 수 감소, 및 바이러스 감염과 연관된

하나 이상의 증상, 가령 발열, 오한, 구토, 관절 통증, 등의 감소를 일으킬 수 있다.

[0217] HIV의 맥락에서, 치료적으로 효과적인 양은 HIV-감염된 세포의 수 감소, 개체의 T 세포수 증가, 감염의 발병, 빈도, 또는 중증도 감소, 기대 수명 증가, 개체의 수명 연장, 및/또는 HIV-연관 통증 또는 인지 장애 감소를 일으킬 수 있다.

[0218] 백신 보강제의 맥락에서, 백신은 특정 질환에 대한 개체의 면역을 증가시키며, 백신 보강제는 이러한 증가를 강화 및/또는 연장시킨다. 당해 분야의 숙련가는 면역 시스템이 일반적으로 선천성 면역 반응 및 후천성 면역 반응을 일으킬 수 있음을 이해할 것이다. 선천성 면역 반응은 일반적으로 실질적으로 항원 특이적이지 않고 및/또는 면역 기억을 생성하지 않는 것을 특징으로 할 수 있다. 후천성 면역 반응은 실질적으로 항원 특이적이고, 시간에 걸쳐 성숙하고 (예컨대, 항원에 대한 친화성 및/또는 결합능 증가), 및 일반적으로 면역 기억을 생성할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 선천성 및 후천성 면역 사이의 이들 및 다른 기능적 차이가 분명하지 않을 수 있더라도, 당해 분야의 숙련가는 선천성 및 후천성 면역 시스템이 통합될 수 있고 그러므로 연합으로 작용할 수 있음을 이해할 것이다.

[0219] 투여에 있어서, 치료적으로 효과적인 양 (또한 본 명세서에서 투여량으로 지칭됨)은 처음에는 시험관 내 어세이 및/또는 동물 모델 연구 결과를 바탕으로 확립될 수 있다. 그러한 정보는 관심의 개체에서 유용한 투여량을 더욱 정확히 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0220] 특정 개체에게 투여되는 실제 투여량은 전문의, 수의사 또는 연구자에 의해 표적, 체중, 용태의 중증도, 질환 유형, 과거 또는 현재의 치료적 개입, 개체의 특발증 및 투여 경로를 비롯한 신체적 및 생리학적 요인과 같은 척도를 고려하여 결정될 수 있다.

[0221] 세포-기반 조성물의 유용한 투여량은 본 명세서의 다른 곳에서 제공된다. 나노수송체-기반 조성물의 유용한 투여량은 0.1 내지 5 μg/kg 또는 0.5 내지 1 μg /kg를 포함할 수 있다. 다른 예시에서, 나노수송체-기반 조성물 투여량은, 예를 들면, 1 μg /kg, 10 μg /kg, 20 μg /kg, 30 μg /kg, 40 μg/kg, 50 μg/kg, 60 μg/kg, 70 μg/kg, 80 μg/kg, 90 μg/kg, 100 μg/kg, 150 μg/kg, 200 μg/kg, 250 μg/kg, 350 μg/kg, 400 μg/kg, 450 μg/kg, 500 μg/kg, 550 μg/kg, 600 μg/kg, 650 μg/kg, 700 μg/kg, 750 μg/kg, 800 μg/kg, 850 μg/kg, 900 μg/kg, 950 μg/kg, 1000 μg/kg, 0.1 내지 5 mg/kg 또는 0.5 내지 1 mg/kg를 포함할 수 있다. 다른 비-제한적인 예시에서, 투여량은 1 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0222] 치료적으로 효과적인 양은 처리 계획 (예컨대, 매일, 격일, 매 3 일, 매 4 일, 매 5 일, 매 6 일, 매 주마다, 매 2 주, 매 3 주, 매 달마다, 매 2 달, 매 3 달, 매 4 달, 매 5 달, 매 6 달, 매 7 달, 매 8 달, 매 9 달, 매 10 달, 매 11 달 또는 매년의 경과 도중 단일 또는 다중 용량을 투여함으로써 달성될 수 있다.

[0223] 달리 지정되지 않는 한, 본 개시의 실시는 면역학, 분자생물학, 미생물학, 세포 생물학 및 재조합 DNA의 통상적인 기술을 활용할 수 있다. 이들 방법은 다음 간행물에 기술되어 있다. 예컨대, Sambrook, 등 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2판 (1989); F. M. Ausubel, 등 발행, Current Protocols in Molecular Biology, (1987); 시리즈물 Methods IN Enzymology (Academic Press, Inc.); M. MacPherson, 등, PCR: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1991); MacPherson 등, 발행 PCR 2: Practical Approach, (1995); Harlow 및 Lane, 발행 Antibodies, A Laboratory Manual, (1988); 및 R. I. Freshney, 발행 Animal Cell Culture (1987)을 참조하라.

[0224] 공공의 데이터베이스에 의해 제공되는 서열 정보는 표적으로 하는 유전자 서열 및 본 명세서에 개시된 바와 같은 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 규명하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 서열은 도 11에 제공된다.

[0225] 본 명세서에 개시되고 언급된 변이체가 또한 포함된다. 단백질의 변이체는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 가지는 것들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된, "보존적 치환"은 다음의 보존적 치환 기 중 하나에서 발견되는 치환을 포함한다: 그룹 1: 알라닌 (Ala), 글리신 (Gly), 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr); 그룹 2: 아스파르트산 (Asp), 글루탐산 (Glu); 그룹 3: 아스파라긴 (Asn), 글루타민 (Gln); 군 4: 아르기닌 (Arg), 라이신 (Lys), 히스티딘 (His); 그룹 5: 이소류신 (Ile), 류신 (Leu), 메티오닌 (Met), 발린 (Val); 및 군 6: 페닐알라닌 (Phe), 티로신 (Tyr), 트립토판 (Trp).

[0226] 추가적으로, 아미노산은 유사한 기능 또는 화학 구조 또는 조성 (예컨대, 산성, 염기성, 지방족, 방향족, 황-함유)에 의해 보존적 치환 기로 분류될 수 있다. 예를 들면, 지방족 분류는, 치환의 목적을 위해, Gly, Ala, Val, Leu, 및 Ile을 포함할 수 있다. 서로에 대한 보존적 치환으로 간주되는 아미노산을 내포하는 다른 군은 다음을 포함한다: 황-함유: Met 및 시스테인 (Cys); 산성: Asp, Glu, Asn, 및 Gln; 소형 지방족, 비극성 또는 약한 극성 잔기: Ala, Ser, Thr, Pro, 및 Gly; 극성, 음으로 하전된 잔기 및 이들의 아미드: Asp, Asn, Glu, 및 Gln; 극성, 양으로 하전된 잔기: His, Arg, 및 Lys; 대형 지방족, 비극성 잔기: Met, Leu, Ile, Val, 및 Cys; 및 대형 방향족 잔기: Phe, Tyr, 및 Trp. 추가적인 정보는 Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company에 있다.

[0227] 다른 곳에서 언급한 바와 같이, 유전자 서열의 변이체는 코돈 최적화 변이체, 서열 다형성, 스플라이스 변이체, 및/또는 인코딩된 산물의 기능에 통계학적으로-유의한 정도까지 영향을 주지 않는 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0228] 본 명세서에 개시된 단백질, 핵산, 및 유전자 서열의 변이체는 또한 본 명세서에 개시된 단백질, 핵산, 또는 유전자 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성, 80% 서열 동일성, 85% 서열, 90% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 또는 99% 서열 동일성을 가지는 서열을 포함한다.

[0229] "% 서열 동일성"은 서열을 비교하여 측정된 둘 이상의 서열 간의 관계를 가리킨다. 당해 기술에서, "동일성"은 또한 그러한 서열 가닥간 매칭에 의해 확인된 단백질, 핵산, 또는 유전자 서열간 서열 연관 정도를 가리킨다. "동일성" (흔히 "유사성"으로도 지칭됨)은 다음에 기술된 것들을 (이에 제한되지 않지만) 포함하는 공지의 방법에 의해 쉽게 산출될 수 있다: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., 발행) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., 발행) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., 및 Griffin, H. G., 발행) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., 발행) Academic Press (1987); 및 Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. 및 Devereux, J., 발행) Oxford University Press, NY (1992). 동일성을 확인하기에 바람직한 방법은 시험된 서열 사이에 최적 매칭을 제공하도록 설계된다. 동일성 및 유사성을 확인하는 방법은 대중에게 이용가능한 컴퓨터 프로그램으로 코딩된다. 서열 정렬 및 백분율 동일성 계산은 LASERGENE 생물정보학 컴퓨팅 스위트의 Megalign 프로그램 (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin)을 이용하여 수행될 수 있다. 서열의 다중 정렬은 또한 디폴트 척도 (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10)와 함께 Clustal 정렬 방법 (Higgins 및 Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989)을 이용하여 수행될 수 있다. 연관 프로그램은 또한 GCG 프로그램 스위트 (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul, 등, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); 및 Smith-Waterman 알고리즘을 도입한 FASTA 프로그램 (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. 발행인(들): Suhai, Sandor. 출판사: Plenum, New York, N.Y.를 포함한다. 본 개시의 맥락 내에서 서열 분석 소프트웨어가 분석을 위해 사용되는 경우, 분석 결과가 언급된 프로그램의 "디폴트 값"을 바탕으로 함이 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용된 "디폴트 값"은 처음 개시될 때 소프트웨어에 원래 저장된 수치 또는 척도의 임의의 집합을 의미할 것이다.

[0230] 예시적인 구체예.

[0231] 1. 개체에게 투여하기 위한 조혈 유래의 선택된 세포 집단을 제조하는 방법이되 상기 방법은:

[0232] 개체로부터 샘플을 수득하는 단계 여기서 샘플은 조혈 유래의 선택된 세포 집단을 포함하는 세포의 이종 혼합물을 포함함;

[0233] 다음을 포함하는 합성 나노수송체에 샘플을 노출시키는 단계를 포함하고

[0234] (i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

[0235] (ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

[0236] (iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

[0237] 여기서 노출시키는 단계는 선택된 세포 집단으로의 나노수송체의 선별적 송달을 야기하여 선택된 세포 집단 내에 세포 변형을 생성하고; 및 샘플 내에서 세포를 증식시키고;

[0238] 이를 통해 개체에게 투여하기 위한 선택된 세포 집단을 제조하는 방법.

[0239] 2. 구체예 1에 있어서 샘플 내 증식된 세포는 선택된 세포 집단의 변형된 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0240] 3. 구체예 1 또는 2에 있어서 제조된 선택된 세포 집단을 세포-기반 조성물로 제형화하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0241] 4. 구체예 3에 있어서 세포-기반 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0242] 5. 구체예 1-4 중 어느 하나에 있어서 노출시키기 전에 세포의 이종 혼합물에서 선택된 세포 집단의 백분율을 증가시키기 위한 단리 단계가 없거나 제한된 단리 단계만 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

[0243] 6. 구체예 1-5 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN); 메가TAL; 및/또는 아연 집게 뉴클레아제 중에서 선택된 유전자 편집 물질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0244] 7. 구체예 6에 있어서 합성 핵산은 서열 번호: 1의 메가TAL을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0245] 8. 구체예 1-7 중 어느 하나에 있어서 유전자 편집 물질은 Shp-1 포스파타제, PD1 수용체, T 세포 수용체 (TCR), CCR5 및/또는 CXCR4를 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0246] 9. 구체예 1-8 중 어느 하나에 있어서 유전자 편집 물질은 TCRα 사슬을 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0247] 10. 구체예 1-9 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 전사 인자, 키나아제, 및/또는 세포 표면 수용체 중에서 선택된 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0248] 11. 구체예 10에 있어서 표현형-개조 단백질은 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b, 및/또는 CCR4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[0249] 12. 구체예 1-11 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0250] 13. 구체예 12에 있어서 이종 세포 집단은 생체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 방법.

[0251] 14. 구체예 12에 있어서 이종 세포 집단은 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

[0252] 15. 구체예 1-14 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T 세포, NK 세포, 단핵백혈구, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈모세포, 또는 이들의 조합에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0253] 16. 구체예 1-15 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 수용체 리간드, 림프구 수용체 항체, 림프구 수용체 펩티드 압타머, 림프구 수용체 핵산 압타머, 림프구 수용체 거울상 압타머, 또는 이들의 조합 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0254] 17. 구체예 1-16 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 또는 트랜스페린 수용체에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0255] 18. 구체예 1-17 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD69; CD62L; CD80; CD95; CD127; CD137; CD209; 또는 DEC-205에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0256] 19. 구체예 1-18 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP

항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0257] 20. 구체예 1-19 중 어느 하나에 있어서 결합 도메인은 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체의 scFv 단편으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

[0258] 21. 구체예 1-20 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 합성 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

[0259] 22. 구체예 1-21 중 어느 하나에 있어서 수송체는 양으로 하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0260] 23. 구체예 22에 있어서 양으로 하전된 중합체는 폴리(β-아미노 에스테르, 폴리(L-라이신), 폴리(에틸렌 이민) (PEI), 폴리-(아미도아민) 덴드리머 (PAMAM), 폴리(아민-co-에스테르), 폴리(디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 키토산, 폴리-(L-락티드-co-L-라이신), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산] (PAGA), 또는 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) (PHP)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0261] 24. 구체예 1-23 중 어느 하나에 있어서 코팅은 중성 또는 음으로-하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0262] 25. 구체예 24에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 폴리글루탐산 (PGA), 폴리(아크릴산), 알긴 산, 또는 콜레스테릴 헤미석시네이트/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0263] 26. 구체예 24 또는 25에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 쌍이온성 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0264] 27. 구체예 24-26 중 어느 하나에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 리포좀을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0265] 28. 구체예 27에 있어서 리포좀은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디옥타데실-아미도글리실스페민 (DOGS), 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0266] 29. 구체예 1-28 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 및/또는 CD8에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0267] 30. 구체예 1-29 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0268] 31. 구체예 1-30 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체의 scFv 단편 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0269] 32. 구체예 1-31 중 어느 하나에 있어서 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0270] 33. 구체예 1-32 중 어느 하나에 있어서 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0271] 34. 구체예 1-33 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하고; 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하고; 및 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0272] 35. 개체를 치료하기 위한 세포를 제조하는 방법이되 상기 방법은:

[0273] 개체로부터 림프구를 수득하는 단계;

[0274] 다음을 포함하는 합성 나노수송체와 림프구를 조합하는 단계를 포함하고

[0275] (i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

[0276] (ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

[0277] (iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

[0278] 여기서 조합 후 나노수송체는 림프구에 선별적으로 도입되어 림프구가 핵산을 일시적으로 발현하게 하는 방법.

[0279] 36. 구체예 35에 있어서 림프구를 증식시키는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0280] 37. 구체예 35 또는 36에 있어서 림프구를 세포-기반 조성물로 제형화하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0281] 38. 구체예 35-37 중 어느 하나에 있어서 노출시키기 전에 세포의 이종 혼합물에서 선택된 세포 집단의 백분율을 증가시키기 위한 단리 단계가 없거나 제한된 단리 단계만 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

[0282] 39. 구체예 35-38 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN); 메가TAL; 및/또는 아연 집게 뉴클레아제 중에서 선택된 유전자 편집 물질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0283] 40. 구체예 35-39 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 서열 번호: 1의 메가TAL을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0284] 41. 구체예 35-40 중 어느 하나에 있어서 유전자 편집 물질은 Shp-1 포스파타제, PD1 수용체, T 세포 수용체 (TCR), CCR5 및/또는 CXCR4를 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0285] 42. 구체예 35-41 중 어느 하나에 있어서 유전자 편집 물질은 TCRα 사슬을 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0286] 43. 구체예 35-42 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 전사 인자, 키나아제, 및/또는 세포 표면 수용체 중에서 선택된 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0287] 44. 구체예 43에 있어서 표현형-개조 단백질은 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b, 및/또는 CCR4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[0288] 45. 구체예 35-44 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0289] 46. 구체예 45에 있어서 이종 세포 집단은 생체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 방법.

[0290] 47. 구체예 45에 있어서 이종 세포 집단은 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

[0291] 48. 구체예 35-47 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T 세포, NK 세포, 단핵백혈구, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈모세포, 또는 이들의 조합에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0292] 49. 구체예 35-48 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 수용체 리간드, 림프구 수용체 항체, 림프구 수용체 펩티드 압타머, 림프구 수용체 핵산 압타머, 림프구 수용체 거울상 압타머, 또는 이들의 조합 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0293] 50. 구체예 35-49 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 또는 트랜스페린 수용체에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0294] 51. 구체예 35-50 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD62L; CD69; CD80; CD95; CD127; CD137; CD209; 또는 DEC-205에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방

법.

[0295] 52. 구체예 35-51 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0296] 53. 구체예 35-52 중 어느 하나에 있어서 결합 도메인은 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ 사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체의 scFv 단편으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

[0297] 54. 구체예 35-53 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 합성 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

[0298] 55. 구체예 35-54 중 어느 하나에 있어서 수송체는 양으로 하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0299] 56. 구체예 55에 있어서 양으로 하전된 지질 또는 중합체는 폴리(β-아미노 에스테르, 폴리(L-라이신), 폴리(에틸렌 이민) (PEI), 폴리-(아미도아민) 덴드리머 (PAMAM), 폴리(아민-co-에스테르), 폴리(디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 키토산, 폴리-(L-락티드-co-L-라이신), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산] (PAGA), 또는 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) (PHP)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0300] 57. 구체예 35-56 중 어느 하나에 있어서 코팅은 중성 또는 음으로-하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0301] 58. 구체예 57에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 폴리글루탐산 (PGA), 폴리(아크릴산), 알긴 산, 또는 콜레스테릴 헤미석시네이트/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0302] 59. 구체예 57 또는 58에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 쌍이온성 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0303] 60. 구체예 57-59 중 어느 하나에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 리포좀을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0304] 61. 구체예 60에 있어서 리포좀은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디옥타데실-아미도글리실스페민 (DOGS), 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0305] 62. 구체예 35-61 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 및/또는 CD8에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0306] 63. 구체예 35-62 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0307] 64. 구체예 35-63 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체의 scFv 단편 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0308] 65. 구체예 35-64 중 어느 하나에 있어서 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0309] 66. 구체예 35-65 중 어느 하나에 있어서 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0310] 67. 구체예 35-66 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하고; 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하고; 및 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0311] 68. 다음을 포함하는 나노수송체에 의해 세포로 선별적으로 송달된 핵산의 일시적인 발현에 의해 변형된 세포의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 방법이되:

[0312] (i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

[0313] (ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

[0314] (iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

[0315] 여기서 조합 후 나노수송체는 림프구에 선별적으로 도입되어 림프구가 핵산을 일시적으로 발현하게 하고

[0316] 이를 통해 이를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법.

[0317] 69. 개체에게 투여하기 위한 선택된 세포 집단을 제조하는 방법이되 상기 방법은:

[0318] 개체로부터 샘플을 수득하는 단계 여기서 샘플은 선택된 세포 집단을 포함하는 세포의 이종 혼합물을 포함함;

[0319] 다음을 포함하는 합성 나노수송체에 샘플을 노출시키는 단계를 포함하고

[0320] (i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 합성 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

[0321] (ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

[0322] (iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

[0323] 여기서 노출시키는 단계는 선택 세포 집단으로의 나노수송체의 선별적 송달을 야기하여 선택된 세포 집단 내에 세포 변형을 생성하고; 및

[0324] 샘플 내에서 세포를 증식시키고;

[0325] 이를 통해 개체에게 투여하기 위한 선택된 세포 집단을 제조하는 방법.

[0326] 70. 다음을 포함하는 합성 나노수송체

[0327] (i) 양으로-하전된 수송체 내에 봉입된 합성 핵산 여기서 핵산은 유전자 편집 물질 또는 표현형-개조 단백질을 인코딩함;

[0328] (ii) 수송체 외부 표면의 중성 또는 음으로-하전된 코팅; 및

[0329] (iii) 코팅의 표면에서부터 증식하는 선택 세포 표적화 리간드;

[0330] 71. 구체예 70에 있어서 합성 핵산은 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN); 메가TAL; 및/또는 아연 집게 뉴클레아제 중에서 선택된 유전자 편집 물질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0331] 72. 구체예 70 또는 71에 있어서 합성 핵산은 서열 번호: 1의 메가TAL을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0332] 73. 구체예 70-72 중 어느 하나에 있어서 유전자 편집 물질은 Shp-1 포스파타제, PD1 수용체, T 세포 수용체 (TCR), CCR5 및/또는 CXCR4를 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0333] 74. 구체예 70-73 중 어느 하나에 있어서 유전자 편집 물질은 TCRα 사슬을 인코딩하는 내생적 유전자를 방해하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0334] 75. 구체예 70-74 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 전사 인자, 키나아제, 및/또는 세포 표면 수용체 중에서

선택된 표현형-개조 단백질을 인코딩하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0335] 76. 구체예 75에 있어서 표현형-개조 단백질은 FOXO1, LKB1, TCF7, EOMES, ID2, TERT, CCR2b, 및/또는 CCR4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0336] 77. 구체예 70-76 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 이종 세포 집단 내에서 림프구에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0337] 78. 구체예 77에 있어서 이종 세포 집단은 생체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0338] 79. 구체예 77에 있어서 이종 세포 집단은 생체 내에 있는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0339] 80. 구체예 70-79 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T 세포, NK 세포, 단핵백혈구, 대식 세포, 수지상 세포, B 세포, 조혈모세포, 또는 이들의 조합에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0340] 81. 구체예 70-80 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 림프구 수용체 리간드, 림프구 수용체 항체, 림프구 수용체 펩티드 압타머, 림프구 수용체 핵산 압타머, 림프구 수용체 거울상 압타머, 또는 이들의 조합 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0341] 82. 구체예 70-81 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 수용체 모티프; T-세포 α 사슬; T-세포 β사슬; T-세포 γ사슬; T-세포 δ사슬; CCR7; CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CD3; CD4; CD5; CD7; CD8; CD11b; CD11c; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD34; CD35; CD39; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46, CD52; CD56; CD62L; CD68; CD69; CD80; CD86; CD95; CD101; CD117; CD127; CD133; CD137 (4-1BB); CD148; CD163; CD209; DEC-205; F4/80; IL-4Rα; Sca-1; CTLA-4; GITR; GARP; LAP; 그랜자임 B; LFA-1; 또는 트랜스페린 수용체에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0342] 83. 구체예 70-82 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD1a; CD1b; CD1c; CD1d; CCR7; CD3; CD4; CD5; CD8; CD16; CD19; CD20; CD21; CD22; CD25; CD28; CD35; CD40; CD45RA; CD45RO; CD46; CD52; CD62L; CD69; CD80; CD95; CD127; CD137, CD209 또는 DEC-205에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0343] 84. 구체예 70-83 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0344] 85. 구체예 70-84 중 어느 하나에 있어서 결합 도메인은 T-세포 α 사슬 항체; T-세포 β사슬 항체; T-세포 γ사슬 항체; T-세포 δ사슬 항체; CCR7 항체; CD1a 항체; CD1b 항체; CD1c 항체; CD1d 항체; CD3 항체; CD4 항체; CD5 항체; CD7 항체; CD8 항체; CD11b 항체; CD11c 항체; CD16 항체; CD19 항체; CD20 항체; CD21 항체; CD22 항체; CD25 항체; CD28 항체; CD34 항체; CD35 항체; CD39 항체; CD40 항체; CD45RA 항체; CD45RO 항체; CD46 항체; CD52 항체; CD56 항체; CD62L 항체; CD68 항체; CD69 항체; CD80 항체; CD86 항체 CD95 항체; CD101 항체; CD117 항체; CD127 항체; CD133 항체; CD137 (4-1BB) 항체; CD148 항체; CD163 항체; CD209 항체; DEC-205 항체; F4/80 항체; IL-4Rα 항체; Sca-1 항체; CTLA-4 항체; GITR 항체; GARP 항체; LAP 항체; 그랜자임 B 항체; LFA-1 항체; 또는 트랜스페린 수용체 항체의 scFv 단편으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0345] 86. 구체예 70-85 중 어느 하나에 있어서 합성 핵산은 합성 mRNA인 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0346] 87. 구체예 70-86 중 어느 하나에 있어서 수송체는 양으로 하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0347] 88. 구체예 87에 있어서 양으로 하전된 지질 또는 중합체는 폴리(β-아미노 에스테르, 폴리(L-라이신), 폴리(에

틸렌 이민) (PEI), 폴리-(아미도아민) 덴드리머 (PAMAM), 폴리(아민-co-에스테르), 폴리(디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (PDMAEMA), 키토산, 폴리-(L-락티드-co-L-라이신), 폴리[α-(4-아미노부틸)-L-글리콜산] (PAGA), 또는 폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스테르) (PHP)를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0348] 89. 구체예 70-88 중 어느 하나에 있어서 코팅은 중성 또는 음으로-하전된 지질 또는 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0349] 90. 구체예 89에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 폴리글루탐산 (PGA), 폴리(아크릴산), 알긴 산, 또는 콜레스테릴 헤미석시네이트/1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0350] 91. 구체예 89 또는 90에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 쌍이온성 중합체를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0351] 92. 구체예 89-91 중 어느 하나에 있어서 중성 또는 음으로-하전된 코팅은 리포좀을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0352] 93. 구체예 92에 있어서 리포좀은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판 (DOTAP), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판 (DOTMA), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol), 디옥타데실-아미도글리실스페민 (DOGS), 콜레스테롤, 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DOPE), 또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC)을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0353] 94. 구체예 70-93 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 및/또는 CD8에 선별적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0354] 95. 구체예 70-94 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0355] 96. 구체예 70-95 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체의 scFv 단편 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0356] 97. 구체예 70-96 중 어느 하나에 있어서 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0357] 98. 구체예 70-97 중 어느 하나에 있어서 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0358] 99. 구체예 70-98 중 어느 하나에 있어서 선택 세포 표적화 리간드는 CD4 항체 및/또는 CD8 항체 중에서 선택된 결합 도메인을 포함하고; 수송체는 폴리(β-아미노 에스테르)를 포함하고; 및 코팅은 폴리글루탐산 (PGA)을 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 나노수송체.

[0359] 100. 구체예 70-99 중 어느 하나의 합성 나노수송체를 포함하는 조성물.

[0360] 101. 이를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법이되 구체예 70-99 중 어느 하나의 나노수송체 또는 구체예 100의 조성물의 치료적으로 효과적인 양을 투여하는 단계를 포함하고 이를 통해 이를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법.

[0361] 102. CAR 또는 TCR을 인코딩하는 핵산을 선택된 세포 유형으로 선별적으로 송달하는 본 명세서에 개시된 나노수송체의 용도.

[0362] 실시예 1. 서론 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하도록 T 세포를 유전적으로 조작함으로써 암에 대한 면역 반응을 일으키는 것은 유의한 결과를 얻기 시작한 요법이며, 중요한 임상적 시도가 진행중이다. T 세포를 수를 증가시키고, 종양 세포를 크게 파괴하고, 궁극적으로 장기 기억 T 세포로 분화시킬 수 있는 '살아있는 약물'로 유전조작하는 과정은 수용체 전이유전자를 림프구의 유전체 내로 안정하게 통합시키는 것을 필요로 한다. 이들의 생산을 위해 필요한 시간 및 비용, 뿐만 아니라 이들이 포장할 수 있는 유전자의 크기 및 수 제한에도 불구하고, 바이러스 벡터는 현재 적용을 위해 이들 세포에 종양-인식 능력을 프로그램화하는 가장 효과적인 수단이다 (Zhang 등, *Nat Commun* 6, 7639 (2015); Cribbs 등, *BMC Biotechnol* 13, 98 (2013)).

[0363] 이들 만성 유전자 발현 시스템과 달리, 또한 '히트-앤드-런' 메커니즘을 표적으로 하는 거대 분자의 일시적인 발현을 통해 표현형 변화를 유도하는 것이 가능하다. 대부분의 이들 일시적인 적용에서, 치료적 전이유전자의

영구적 발현은 요망되지 않으며 잠재적으로 위험하다(Wurm 등, *Exp Hematol* 42, 114-125 e114 (2014)); 예시는 세포 분화를 제어하는 전사 인자의 사용 (Themeli 등, *Nat Biotechnol* 31, 928-933 (2013); Costa 등, *Development* 142, 1948-1959 (2015)), 및 유전체를 조작하는 서열-특이적 뉴클레아제의 발현 (Cox 등, *Nat Med* 21, 121-131 (2015))을 포함한다.

[0364] 비록 일시적인 유전자 요법이 조작된 T 세포의 치유 능력을 실질적으로 향상할 수 있다는 증가하는 수의 적용이 존재하지만, 현재 이용가능한 방법 (이는 상기 기술된 만성 발현 방법과 유사하게, 대부분 바이러스 벡터를 기반으로 함)은 형질도입을 수행하기 위해 요구되는 상세한 프로토콜의 비용으로 인해 복잡하다(Nightingale 등, *Mol Ther* 13, 1121-1132 (2006)). 대안적인 형질감염 방법으로 전기천공이 개발되었으나, 혈장 막의 기계적인 투과화는 T 세포의 생존능을 타협하며, 이는 이들 접근법이 대규모 적용에 적합하지 않음을 의미한다. 더욱이, 바이러스-기반 방법처럼, 전기천공은 이종 풀 중에서 특정한 세포 유형을 선별적으로 형질감염시키지 못하며, 따라서 세포 정제 과정이 선행되어야 한다.

[0365] 본 실시예는 배양된 T 세포에서 일시적인 유전자 발현을 일으키고, 그것도 프로토콜이나 복잡한 보조 장비에 얽매이지 않고 그렇게 하는 나노시약을 기술한다. 적절히 설계된 mRNA 나노수송체는 시험관 내에서 시약을 세포와 단순히 혼합함으로써 림프구로의 기능적 거대분자의 용량-제어된 송달을 달성할 수 있다(도 1A).

[0366] 이들 나노입자 (NP)는 표적화 세포 아형에 결합할 수 있고 수용체-매개 엔도사이토시스를 촉진하며, 이는 이들이 수송하는 합성 mRNA의 침입을 제공하고 림프구로 하여금 인코딩된 분자를 발현하게 만든다. 핵 수송 및 전이 유전자의 전사가 요구되지 않으므로, 이러한 과정은 빠르고 효율적이다. 이러한 신규 플랫폼이 임상 사용을 위한 우월한 CAR-T 세포 산물을 제조하기 위해 어떻게 적용될 수 있는지가 적어도 두 실시예에 예시된다. 첫 번째 적용에서, 표적화 mRNA 나노수송체는 T 세포에 대한 유전체-편집 도구로서 사용되었다. 희소-절단 메가TAL 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA의 송달 (Boissel 등, *Methods Mol Biol* 1239, 171-196 (2015))은 림프구에 의한 T 세포 수용체 발현을 효율적으로 방해할 수 있다. 두 번째 적용에서, 이펙터 세포를 기능적 능력을 갖는 기억 세포로 분화하도록 재프로그램하는 핵심 조절인자인 Foxo1 (Tejera, 등, *J Immunol* 191, 187-199 (2013); Kim 등, *Immunity* 39, 286-297 (2013))이 일시적으로 발현되었다. 결과는 조작된 나노입자에 대한 노출이 T 세포를 중앙 기억 표현형으로 편향되게 함을 입증한다.

[0367] 본 시스템의 가장 중요한 이익은 임상적 등급으로 치료적 세포의 유전자 변형을 얻는데 있어서의 단순함이다: 요구되는 것은 오로지 적절한 나노입자 시약을 림프구와 혼합하는 것 뿐이다. 이 접근법은 분명 유전 물질을 일시적으로 송달하기 위해 현재 사용되는 것들과 대조적이며, 이들은 덜 효과적이며 많은 특화된, 고비용의, 그리고 유용성을 제한하는 독점적 절차를 동반한다. T 세포 요법을 넘어서, 일시적인 유전자 송달 플랫폼은 다른 치료적 세포 유형(예컨대 자연 살해 세포, 수지상 세포, 조혈모세포, 또는 간엽 줄기 세포)을 위한 기존 제조 과정에 쉽게 통합되어 취급 시간, 위험, 또는 복잡함을 증가시키지 않고도 실질적으로 이들의 치유 능력을 향상시킬 수 있다.

[0368] 재료 및 방법. 연구 설계. 본 프로젝트의 목적은 표적화 mRNA를 시험관 내 원발성 T 세포에 송달하기 위한 나노물질을 개발하는 것이었다. 파일럿 실험을 수행하여 개별적인 공여체로부터 수득된 세포를 이용하는 특정 적용을 위해 나노수송체- 매개 송달을 최적화하고, 이후 다중 공여체로부터의 샘플을 이용한 최적화 프로토콜을 재생산하였다.

[0369] PBAE 447 합성. 본 중합체는 Mangraviti 등에 의해 기술된 것 (Mangraviti 등, ACS Nano 9, 1236-1249 (2015))과 유사한 방법을 이용하여 합성하였다. 1,4-부탄디올 디아크릴레이트를 4-아미노-1-부탄올과 아민 단량체에 대한 디아크릴레이트의 1.1:1 몰비로 조합하였다. 혼합물을 교반하면서 24 h 동안 90℃로 가열하여 아크릴레이트-말단 폴리(4-아미노-1-부탄올-co-1,4-부탄디올 디아크릴레이트)를 생성하였다. 2.3 g의 본 중합체를 2 ml 테트라하이드로푸란 (THF)에 용해시켰다. 피페라진-캡핑된 447 중합체를 형성하기 위해, 13 ml THF에 용해된 786 mg의 1-(3-아미노프로필)-4-메틸피페라진을 중합체/THF 용액에 부가하였다. 생성된 혼합물을 RT에서 2 h 동안 교반하고, 이후 캡핑된 중합체를 5 부피의 디에틸 에테르로 침전시켰다. 용매를 따라낸 후, 중합체를 2 부피의 신선한 에테르로 세척하고, 이후 잔사를 사용하기 전에 진공 하에 2 일 동안 건조시켜 DMSO 내 100 mg/ml 스톡을 형성하고, 이를 -20℃에 저장하였다.

[0370] PGA-항체 접합. 15 kD 폴리-글루탐산 (공급원은 Alamanda Polymers)을 물에 용해시켜 20 mg/ml을 형성하고 10분간 초음파분해하였다. 동일한 부피의 물 내 4 mg/ml 1-에틸-3-(3- 디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 염화수소산염 (Thermo Fisher)을 부가하고, 용액을 5분간 RT에서 혼합하였다. 생성된 활성화 PGA를 이후 항체와 포스페이트 완충 식염수 (PBS) 내에서 4:1 몰비로 조합하고 6 h 동안 RT에서 혼합하였다. 미연결 PGA를 제거하기

위해, 용액을 50,000 NMWCO 막 (Millipore)을 거쳐 PBS에 대해 3차례 교환하였다. NanoDrop 2000 분광광도계 (Thermo Scientific)를 이용하여 항체 농도를 측정하였다. T 세포 실험을 위해 사용된 항체는 항-CD3 (클론 OKT3), 항-CD4 (클론 OKT4), 항-CD8 (클론 OKT8), 및 항-CD28 (클론 9.3, 모두 공급원은 BioXCell)이었다. 클론 C1.18.4를 대조 항체로서 사용하였다. HSC 형질도입을 위해, 다클론 염소 항-마우스 IgG 및 다클론 염소 항-마우스 CD105 항체 (Fisher)를 사용하였다.

[0371] mRNA 합성. 변형된 리보뉴클레오티드 유사우리딘 (Ψ) 및 5-메틸시티딘 (m5C)으로 완전히 치환되고 ARCA로 캡핑된 eGFP, Foxo1, Trex2, 및 TRAC-메가TAL에 대해 코돈-최적화된 mRNA를 TriLink Biotechnologies에 의해 생산하였다. 우리는 Ψ 및 m5C- 변형된 eGFP mRNA를 cy5 (또한 공급원은 TriLink)와 접합시키고 이들 전사물의 송달을 추적하기 위해 접합시켰다.

[0372] 나노입자 제조. mRNA 스톡을 무균, 무-뉴클레아제 25 mM 나트륨 아세테이트 완충액, pH 5.2 (NaOAc) 내에 100 μg/ml로 희석하였다 DMSO 내 PBAE-447 중합체를 NaOAc 내에 6 mg/ml로 희석시키고, mRNA에 60:1 (w:w) 비율로 부가하였다. 생성된 혼합물을 15 초간 중간 속도로 볼텍싱한 후, 5분간 실온에서 배양하여 NP가 형성될 수 있게 하였다. 표적화 요소를 나노입자에 부가하기 위해, PGA-연결된 항체를 NaOAc 내에 250 μg/ml로 희석하고 2.5:1 (w:w) 비율로 mRNA에 부가하였다. 생성된 혼합물을 15 초간 중간 속도로 볼텍싱하고, 이후 5분간 실온에서 배양하여 PGA-Ab가 NP에 결합될 수 있게 하였다.

[0373] 나노입자를 동결보호제로서 60 mg/ml D-수크로스와 함께 혼합하여 동결건조시키고, 이를 FreeZone 2.5 L Freeze Dry System (Labconco)에서 처리하기 전에 액체 질소에서 급속-냉각시켰다. 동결건조된 NP를 사용할 때까지 -80 ℃에 저장하였다. 적용을 위해, 동결건조된 NP를 본래 농도로 회복하기 위해 일 부피의 무균수 내에 재-현탁시켰다.

[0374] 나노입자 특징분석. 생성된 입자의 수화 반경을 Nanosite (Malvern)로 측정하고, 이들의 제타 전위를 Zetapals 장비 (Brookhaven Instrument Corporation)으로 검출하는 동적 광산란을 이용하여 측정하였다. 입자를 크기 측정을 위해 PBS (pH 7.4) 내에 1:400 (v/v)로, 및 제타 전위 정량화를 위해 1:40으로 희석하였다. 투과 전자 현미경을 위해, 나노입자의 25-μl 샘플을 각각 글로우 방전-활성화 200 메쉬 탄소/포름바르-코팅된 구리 격자에 도포하였다. 30초 후에, 격자에 순서대로 한 방울의 ½ Karnovsky 고정액, 한 방울의 0.1 M 카코딜레이트 완충액, 8 방울의 dH2O, 및 이후 한 방울의 1% (w/v) 여과된 우라닐 아세테이트를 접촉시켰다. 이들 샘플을 JEOL JEM-1400 투과 전자 현미경 (JEOL USA)을 이용하여 검사하였다.

[0375] 세포주 및 배양 배지. K562-CD19 및 대조 K562 세포를 Dr. Stanley Riddell (Fred Hutchinson Cancer Research Center)에 의해 제공받았다. TM-LCL은 T 세포 증식을 위한 공급세포로서 사용하도록 최적화된 CD19+ EBV- 형질전환된 림프아구성 세포주이다 (36). Jurkat-E6 T 세포주는 American Type Culture Collection으로부터 수득하였다. 이들 세포주를 T 세포 배지 (TCM): 10% 소태아 혈청, 0.8 mM l-글루타민, 25 mM HEPES 완충액, 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640에서 배양하였다.

[0376] 원발성 인간 말초혈 단핵세포 (PBMC) 및 T 세포를 50 IU IL-2/ml (Preprotech)로 보충된 TCM, 또는 언급된 것처럼 ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium (XFSFM) (Stemcell)에서 배양하였다.

[0377] T 세포의 mRNA 형질감염. 정상 공여체로부터의 저온 보존된 PBMC를 따듯한 TCM을 점적 부가하여 해동시키고, 이후 원심분리하였다. 언급하는 경우, CD8 T 세포는 음성 선별 (Stemcell)에 의해 단리하였다. 세포를 TCM + IL-2 내에 $10^6$ 세포/ml로 배양하고 1:1 비드:세포 비율로 CD3/CD28 비드 (Dynabeads, Life Technologies)로 촉진하였다. □CD3-표적화 나노입자 형질도입을 포함하는 실험에 있어서, 이들 비드는 NP를 부가하기 24 h 전에 제거되었다.

[0378] NP-매개 형질감염에 있어서, T 세포를 XFSFM 내에 $2x10^6$/ml의 농도로 재현탁시켰다. 2.5 μg의 mRNA/$10^6$ 세포를 내포하는 항체-표적화 NP를 상기 현탁액에 부가하여 2 h 동안 37℃에서 노출시키고, 이후 세포를 3 부피의 TCM+IL-2로 세척하였다. 대조 NP는 eGFP mRNA를 내포하였다. TCRα 유전자 편집 NP는 TRAC-메가TAL, Trex2, 및 eGFP mRNA를 42:42:16 w:w:w 비율로 내포하였다. $Foxo1_{3A}$ NP는 $Foxo1_{3A}$ 및 eGFP mRNA를 84:16 w:w 비율로 내포하였다.

[0379] 전기천공에 있어서, $2x10^6$ T 세포를 0.5% 소의 혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS로 두 차례 세척하고, 3 μg의 eGFP mRNA를 함유하는 100 μl의 T 세포 전기천공 배지 (Lonza)에 재현탁시키고, 전기천공 큐벳에 옮기고, 및 Nucleofector (Lonza) 장비에서 프로그램 T-20을 이용하여 처리하였다. 천공된 세포를 항생제가 없이 2 ml TCM

+ IL-2를 담은 플레이트로 옮겼다.

[0380] CD34+ 세포의 NP 형질도입. 정상 공여체로부터 사전 입수된 PBSC로부터 정제된 CD34+ 세포를 Fred Hutchinson Cancer Research Center의 Hematopoietic Cell Processing and Repository Core로부터 수득하였다. 해동 후, 세포를 계수하고 이후 $10^6$/ml의 농도로 밤새 HSC 배지: 50 ng/ml 인간 Stem Cell Factor (Scf), 50 ng/ml 쥐의 Flt3/Flk-2 리간드, 및 25 ng/ml 인간 트롬보포이에틴 (Stemcell Technologies)]로 보충된 StemSpan SFEMII 무-혈청 배지에서 배양하였다. 다음날 세포를 수확하고, 계수하고, 96-웰 조직 배양 플레이트 (Costar)에 사이토킨이 없는 100 μl HSC 내에 $2.5x10^4$ 세포/웰로 재현탁시켰다. 세포를 처리하지 않고 두거나, 웰당 1 μg eGFP mRNA를 내포하는 CD105-표적화 또는 대조 항-마우스-표적화 NP로 처리하였다. 세포를 NP로 1 h 동안 처리하고, 이후 사이토킨이 없는 1 ml HSC 배지로 두 차례 세척하였다. 세척된 세포를 이후 24-웰 조직 배양 플레이트 내 500 μl 완전 HSC 배지로 옮기고; 48 h 후, 세포를 유세포 분석기에 의한 분석을 위해 CD34 및 CD105 (BioLegend)로 표지하였다.

[0381] TCRα에 대한 삽입-결실의 PCR 증폭 및 검출. 삽입-결실 검출은 Geneart Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 수행하였다. 간단하게, T 세포를 용해하고, TCRα 메가TAL 표적 부위 옆에 붙은 유전체 DNA를 다음 프라이머를 이용하는 PCR에 의해 증폭시켰다: TRAC-순방향 CCCGTGTCATTCTCTGGACT (서열 번호: 53), 및 TRAC-역방향 ATCACGAGCAGCTGGTTTCT (서열 번호: 54). PCR 산물을 변성시키고, 재-어닐링하고, 검출 효소로 처리하여 삽입-결실 형성이 생식계열 vs 특이적으로 절단된 밴드에 대한 젤 밴드 밀도를 비교함으로써 평가될 수 있게 하였다.

[0382] 19-41BBζ CAR을 이용한 T 세포의 렌티바이러스 형질도입 및 증식. 41BB 및 CD3ζ신호전달 도메인 (19- 41BB□)을 내포하는 인간 항-CD19 CAR 구조체를 (Liu 등., *Nat Biotechnol* 34, 430-434 (2016))에 기술된 바와 같은 단일 StrepTag로 수식하고 epHIV7 렌티바이러스 벡터로 옮겼다. VSVG 위형 렌티바이러스를 epHIV7 렌티바이러스 벡터 및 바이러스 포장 플라스미드 pCMVdR8.91 및 pMD2.G를 이용한 Lenti-X 293T 세포 (Clontech)의 인산칼슘 형질감염 (Invitrogen)을 통해 제작하였다. 렌티바이러스 형질도입을 위해, T 세포를 8 μg/ml 폴리브렌 및 19-41BBζ-CAR 인코딩 렌티바이러스가 5:1의 MOI로 담긴 레트로넥틴-코팅된 플레이트 (Takara)로 옮기고, 이후 34 ℃에서 1 h 동안 800 x g로 회전 감염시켰다. 19-41BBζ-형질도입된 세포의 선별적 증식을 위해, 림프구를 TCM + IL-2 내 1:7 비율의 방사선 조사된 (7000 래드) CD19+ TM-LCL 세포로 촉진하였다.

[0383] 세포 분류 및 유세포 분석. 데이터를 FACSDIVA 소프트웨어를 가동하는 BD LSRFortessa 또는 FacsCanto II 세포 분석장치를 이용하여 얻었고, BD FACS ARIA-II 상에서 분류하고, FlowJo v10.1로 분석하였다. 유세포 분석에 사용된 항체는 도 2에 열거된다.

[0384] 세포내 사이토킨 염색. 세포를 3 μg/ml 브레펠딘 A +/- 20 ng/ml PMA 및 1 μg/ml 이오노마이신 (Sigma-Aldrich)을 갖는 TCM에서 6 h 동안 배양하였다. 고정 전에, TCR+ CD8+ 및 TCR- CD8+ 세포 하위집합을 확인하기 위해 항-CD8 및 항-CD3 염색을 사용하였다. 세포를 이후 Fix and Perm 키트 (BD Biosciences)로 처리한 후 항-IFN- 및 IL-2 mAb (BioLegend)로 표지하였다.

[0385] Foxo1에 대한 세포내 염색. $10^6$ Jurkat T 세포를 3 μg eGFP mRNA, 또는 2.5 μg Foxo13A 및 0.5 μg eGFP mRNA를 내포하는 항-CD3 표적화 NP로 형질감염시켰다. 24 h 후, 세포를 PBS 내 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 한 차례 세척하고, 30 분간 90%의 아주-차가운 메탄올로 투과화시켰다. 이들 샘플을 실온에서 PBS 내 0.5% BSA로 차단하고, 이후 토끼 항-Foxo1 (클론 C29H4) 또는 이소형 (클론 DAE1)으로, 이어서 항-토끼 IgG F(aB')2 Alexa-647 (세포 신호전달)로 염색하였다.

[0386] CAR T 세포 살해 분석 CAR 표적 세포의 특이적 세포용해를 유세포 분석기로 분석하였다. 표적 K562- CD19 세포를 저 (0.4 μM), 및 고 (4.0 μM) 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르 (CFSE)를 갖는 대조 K562로 15 분간 37℃에서 표지하였다. 양 샘플을 혈청을 함유하는 완전 배지에 세척하고, 1:1 비율로 혼합하고, 이후 19-41BBζ와 함께 언급된 이펙터:표적 비율로 동시-배양하였다. 특이적 세포용해를 평가하기 위해, 각각의 조건을 항-CD8 mAb (BioLegend)로 염색하여 T 세포를 확인하고 7AAD로 염색하여 죽은 세포를 배제하고, 유세포 분석기로 분석하였다. 특이적 세포 살해를 가변 CD19+ 표적 세포 (저 CFSE) 대 대조 CD19- K562 세포 (고 CFSE)의 비율을 측정하여 평가하였다.

[0387] 현미경 분석. 400 μl의 XFSFM 내 $10^6$ T 세포를 3 μg cy5-표지된 eGFP mRNA를 내포하는 항-CD3 표적화 NP로 표면 결합을 위해 1 h 동안 4 oC에서 처리하고, 이후 내재화를 위해 37℃에서 2-h 배양하였다. 이들 처리 후, 세

포를 차가운 PBS로 3 차례 세척하고, 폴리-l-라이신 (Sigma)-코팅된 슬라이드 상에 30분간 4 oC에서 로딩하였다. 샘플을 2% 파라포름알데히드로 고정하고, ProLong Gold 항탈색 시약 (Invitrogen) 내에 담그고, Zeiss LSM 780 NLO 레이저 주사 공초점 현미경으로 촬영하였다.

[0388] RNA 정제, RT-PCR, 서열분석, 및 생물정보학적 분석. T 세포를 Trizol 시약 (Ambion)으로 용해한 후, 총 RNA를 컬럼상 DNA 분해를 가지는 DirectZol 키트 (Zymo)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 단리하였다. 실시간 정량적 PCR (qPCR)을 위해, cDNA를 고성능 cDNA 키트 (Applied Biosystems)를 이용하여 제작하였다. 항존유전자 B2M에 대비한 내생적 FOXO1 및 코돈-최적화 FOXO13A의 발현 수준을 PrimeTime qPCR 어세이 (Integrated DNA technology) 및 QuantStudio5 장치 (Applied Biosystems)을 이용하여 측정하였다. 코돈-최적화 Foxo13A를 검출하기 위해 사용된 프라이머는 내생적 Foxo1 mRNA의 교차-검출을 방지하도록 선택되었다:

[0389] Foxo13A 순방향: GGACAGCCTAGAAAGAGCAG (서열 번호: 55)

[0390] Foxo13A 탐침: AGGTCGGCGTAGCTCAGATTGC (서열 번호: 56)

[0391] Foxo13A 역방향: CTCTTGACCATCCACTCGTAG (서열 번호: 57)

[0392] RNAseq 분석을 위해, RNA 샘플을 3 및 8 일 후 시험관 내 배양된 대조 NP- 및 Foxo13A NP-처리된 CD8+ 세포로부터 단리하고, 두 가지 독립적인 공여체-매칭된 저온 보존 PBMC 샘플로부터의 분류된 참조 미경험 (CD8+ CD45RA+ CD62L+ CCR7+) 및 TCM ( CD8+ CD45RA- CD62L+ CCR7+) 세포와 비교하였다. RNASeq 라이브러리를 TruSeq 샘플 제조 키트 (Illumina)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 제작하였다. 라이브러리를 HiSeq 플랫폼 (Illumina)으로 50 주기 (쌍형성 말단)에 대해 서열분석하였다. TopHat v2.1.0을 이용하여 인간 hg38 유전체에 대한 Illumina의 기본 세포 및 품질 필터를 통과한 결과를 배열하였다. "교차-엄격" 중첩 모드를 적용한 htseq-계수 (v0.6.1p1)를 이용하여 각각의 유전자에 대한 계수를 생성하였다. 데이터 표준화 및 차등한 발현 분석을 위해 edgeR 내 GLM 방법을 사용하였다. TCM 시그니처 유전자 집합은 제8일에 CD8+ TCM 대 공여체-매칭된 대조 NP-처리된 CD8+ T 세포에서 더 높은 (TCM 상단) 또는 더 낮은 (TCM 하단) 발현을 가지는 통계적 유의성에 의해 상위 500 유전자로 꼽힌 것들로 정의된다. 유전자 집합 농축을 접힘 변화 x 1/(p 수치)의 신호에 의해 뽑힌 유전자 목록을 이용하여 GSEAPreranked 소프트웨어로 분석하였다 (37). RNAseq 분석으로부터의 미처리 및 처리 데이터는 NCBI의 Gene Expression Omnibus, GEO 시리즈 접근 번호 GSE89134에 제출된 바 있다. (38)

[0393] 통계적인 분석. 달리 언급되지 않는 경우, 그래프는 중간값 ± 중간값의 표준 오차를 나타낸다. Prism 소프트웨어 (Graphpad)를 이용하여 통계적인 분석을 수행하였다.

[0394] 결과. T 세포에서 강한 전이유전자 발현을 나타내도록 하는 mRNA 나노수송체 설계. 원발성 T 림프구 (이것은 비-바이러스 형질감염 방법에 불응성인 것으로 악명높다)를 유전적으로 변형시킬 수 있는 시약을 만들기 위해, 네 가지 기능적 성분을 포함하는 중합체 나노입자 (도 1B)를 유전자 조작하였다: (i) 나노입자를 T 세포에 선별적으로 결합시키고 빠른 수용체-유도 엔도사이토시스를 개시하여 이들을 내재화하는 표면-고정된 표적화 리간드. 실험에서 항-CD3 및 항-CD8 항체를 사용하였다; (ii) 나노입자의 표면 전하의 환원에 의한 표적-이탈 결합을 최소화하도록 나노입자를 보호하는 음으로-하전된 코팅. 이것이 약물 송달 플랫폼에서 이미 널리 사용되기 때문에, 이를 달성하기 위해 폴리글루탐산 (PGA)을 선택하였다; (iii) 입자가 엔도좀 내부에 존재하는 동안 핵산을 응축하고 효소의 분해로부터 보호하지만, 세포질로 수송되는 경우 이들을 방출하여, 이를 통해 인코딩된 단백질의 전사를 가능하게 하는 수송체 기질. 이를 위해, 수성 조건에서 1 내지 7 시간의 반-감기를 가지는, 생분해가능한 폴리(β-아미노 에스테르) (PBAE) 중합체 제형을 사용하였다; 및 (iv) 수송체 내에 봉입되고 및 유전자 편집 또는 T 세포 표현형을 영구적으로 개조할 수 있는 단백질의 일시적인 발현으로 생성된 핵산. mRNA는 일시적인 치료적 단백질 발현에 이상적인 플랫폼이며, 왜냐하면 유전체 통합 가능성이 없고 발현을 위해 핵에 내부화될 필요가 없기 때문이다. 그러나, 변형되지 않은 mRNA는 단백질 발현을 제한하고 독성을 유발하는 세포내 톨(toll)-유사 수용체를 활성화시킬 수 있다 (Kariko 등, *Immunity* 23, 165-175 (2005)). 송달된 mRNA의 안정성을 향상하고 면역원성 가능성을 낮추기 위해, 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 합성 버전을 사용하였다. 예를 들면, 우리딘 및 시티딘의 조작된 염기 유사우리딘 및 5-메틸-시티딘으로의 치환은 선천성 패턴 인식 수용체에 의한 인식을 상승적으로 차단하고 mRNA 번역을 증가시킨다.

[0395] 두-단계, 전하-유도 자가-조립 과정을 이용하여 NP를 제조하였다. 먼저, 합성 mRNA를 양으로-하전된 PBAE 중합체와 조합하였고, 이는 mRNA를 나노-크기 복합체로 응축한다 (도 3A, 3B). 이러한 단계는 항체-기능적 PGA의 부가로 이어지며, 이는 PBAE-mRNA 입자의 양전하를 보호가며 림프구-표적화를 제공한다. 생성된 mRNA 나노수송체는 109.6 ± 26.6 nm 크기 및 거의 중성인 표면 전하 (1.1 ± 5.3 mV 제타 전위, 도 3C)를 가졌다.

[0396] mRNA 나노수송체는 전기천공과 유사한 T 세포 형질감염 효율을 달성하나, 생존능을 감소시키지 않는다. 목표는 세포-기반 요법제의 제조를 간소화하는 것이며, 따라서 표적화 mRNA 나노수송체를 단순히 인간 림프구의 확립된 배양물에 부가하는 것이 이들의 강한 형질감염을 나타내기에 충분한지에 관해 먼저 시험하였다. 리포터 (강화된 녹색 형광 단백질, eGFP)를 인코딩하는 mRNA를 수송하는 CD3- 표적화 NP가 이들 세포와 함께 배양되는 경우, 이들은 이들에 결합할 뿐 아니라 또한 수용체-매개 엔도사이토시스를 촉진하여, 입자가 수송하는 유전자의 침입을 제공한다 (도 4A). 단일 NP 적용 (NP:T 세포 비율 = $2\times10^4$:1) 후에 이들 원발성 T 세포의 85% (도 4B)가 형질감염-후 5시간이 지나자마자 전이유전자 발현으로 일상적으로 형질감염된 것이 관찰되었다(도 5A). 따라서, 이러한 과정은 빠르고 효율적이다. 중요하게는, 각각의 적용을 위해 mRNA NP를 신선하게 제조할 필요가 없었고, 오히려 사용 전에 특성 또는 효율의 변화 없이 동결건조하는 것이 가능하였다 (도 5B).

[0397] 다음으로 T 세포 증식에 대한 표적화 mRNA-수송 NP의 영향을 평가하였다. 악성종양은 대개 빠르게 발전하기 때문에, 조작된 T 세포가 임상적 연관 규모로 빠르게 증식될 수 있는 것이 중요하다. 임상 실험실에서 다클론 림프구를 증폭하기 위해 널리 사용되는 한 접근법은 이들을 TCR/CD3에 대한 항체 및 보조-자극 CD28 수용체로 코팅된 비드와 함께 배양하는 것이다. CD3-표적화 NP로의 반복된 형질감염(NP:T-세포 비율: $2x10^4$:1)도 이들 코팅된 비드에 의해 촉진된 T 세포의 증식을 방해하지 않았다 (도 4C). 이러한 결과는 나란히 시험한 T 세포 전기천공과 아주 대조적이다. 전기천공은 복잡한 세포 취급 단계 (가령 배지 교환 및 원심분리 주기, 도 4D)를 부가했을 뿐 아니라, 이러한 방법은 림프구의 생존능을 타협했고 (도 6), 이는 T 세포의 수율을 60-배 낮추었다(도 4D, 우측 패널).

[0398] 나노입자 형질감염은 CAR-T 세포 제조 과정에 매끄럽게 포함되어 효율적인 유전체 편집을 달성하였다. NP-매개 mRNA 형질감염을 백혈병-특이적 19-41BBζ CAR T 세포의 제조에 도입함으로써 본 접근법을 임상적으로-관련된 적용에서 시험하였다 (도 7A). CD19-표적화 수용체는 오늘날 가장 잘 조사된 CAR-T 세포 산물로, 세계적으로 거의 30개의 임상 시험이 진행 중이다 (Sadelain 등, *J Clin Invest* 125, 3392-3400 (2015)). 현재 유전체 조작을 수행하는 능력은 CAR-T 세포의 안전성 및 효능을 향상시킬 가능성을 제공한다. 예를 들면, 내생적 TCR의 발현이 제거되어 이식편-대-숙주 질환을 예방할 수 있다. 추가로, 면역 관문 유전자는 선별적으로 결실되어 억제적 종양 환경에서 이들의 활성을 강화할 수 있다 (Menger 등, *Cancer Res* 76, 2087-2093 (2016); Torikai 등, *Blood* 119, 5697-5705 (2012)). 그러나, 유전체-편집 물질을 세포로 송달하기 위한 전기천공의 사용은 대규모 T 세포 생산에 있어서 상당한 장벽을 보인다. 따라서, 유전자-편집 물질을 송달하는 NP의 능력을 TCR 알파 유전자의 불변 영역 (TRAC)을 표적으로 하는 메가TAL 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA를 수송하는 입자를 제조함으로써 측정하였다. NP 제형화 방법에 의해 제공되는 유연성을 장점으로 고려하여, 녹아웃 효율을 높이기 위해 DNA 수선 엔도뉴클레아제 TREX2를 인코딩하는 mRNA를 포함시키고, 형질감염을 추적하기 위해 eGFP mRNA를 포함시켰다. 대조 입자는 eGFP mRNA만 로딩하였다. eGFP-형질감염과 대조적으로 (TCR 발현에 영향을 주지 않음; 도 7B, 상단 열), T 세포 배양물에의 TCRα-메가TAL 입자의 부가는 제5일에 TCR 발현을 효율적으로 교란시켰고, 이 효과는 mRNA 손실 후 제12일에도 유지되었다 (도 7B, 하단 열). 평균 TCR 수준은 대조(±17.7%; 도 73C)에 비해 60.8%였고, 이는 Surveyor 어세이를 이용하여 측정된 삽입-결실 빈도 (표적화 효율의 척도)의 백분율과 상응한다 (도 7D). 중요하게는, mRNA-수송 나노입자의 존재가 종양-특이적 CAR의 바이러스-매개 유전자 전이에 영향을 미치지 않은 동시에, 19-41BBζ CAR을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터와 동일한 형질도입 효율을 NP-형질감염된 및 비-형질감염된 T 세포에서 성취하였다 (도 7E). NP-매개 유전체 편집 및 렌티바이러스 형질도입 후에, CAR-프로그램화 T 세포는 증식하고, 사이토킨을 분비하고, 백혈병 표적 세포를 죽이는 이들의 성능을 온전히 유지하였다 (도 7F-7H). 요약하면, 이들 발견은 림프구-표적화 mRNA 나노수송체가 이들의 기능을 타협하지 않고도 CAR-T 세포의 효율적인 유전체 편집을 매개할 수 있음을 확증한다.

[0399] 전사 인자 Foxo1를 인코딩하는 NP-송달된 mRNA는 기억 CAR- T 세포를 각인시킨다. 다음으로는 림프구-표적화 mRNA NP가 유리한 표현형 쪽으로 이들을 프로그램화하는 mRNA를 송달함으로써 CAR-T 세포의 치료 활성을 향상할 수 있는지 검사하였다. 임상적 발견은 CD62L+ 중앙 기억 T 세포 (TCM)로부터 유래한 T 세포 산물이 동물 모델에서 향상된 접목 및 기능을 나타내며, 융합된 산물 내 CD62L+ TCM 표현형 세포의 분획이 성공적인 CAR 요법으로 이어짐을 이미 확립하였다 (Louis 등, *Blood* 118, 6050-6056 (2011); Sommermeyer 등, *Leukemia* 30, 492- 500 (2016)). 그러나, 치료적으로 연관된 림프구 수를 얻기 위해, 이들 세포는 수 차례의 시험관 내 자극/증식을 거쳐야 하며 - 이는 세포를 TCM 계통에서 벗어나 말단 분화 및 노화로 이끄는 과정이다 (Wang 등, *Journal of immunotherapy* 35, 689-701 (2012)). 이러한 문제를 언급하기 위해, CD8 T 세포에서 이펙터-대-기억 전이를 제어하는 포크헤드 패밀리 전사 인자 Foxo1(Tejera, 등, *J Immunol* 191, 187-199 (2013); Kim 등, *Immunity* 39, 286-297 (2013)를 인코딩하는 mRNA로 로딩된 T 세포-표적화 NP를 제작하였다. 시험관 내 자극/증식 도중, TCR

및 사이토킨 신호전달은 AKT 키나아제를 활성화시킨다. 이러한 효소는 Foxo1를 인산화하고, 이는 이의 세포질 분리 및 전사 활성 차단을 야기한다. 배양된 T 세포에서 Foxo1을 유지하기 위해, 상기 인자의 AKT-비민감성 변이체를 사용하였고 여기서 세 가지 핵심 인산화 잔기가 알라닌으로 변이되었다 (Foxo13A). 생체외 증식 도중 T 세포 배양 배지에의 Foxo13A-함유 NP의 부가가 향상된 치료적 잠재성을 가지는 CD62L+ TCM 세포의 발달을 촉진할 것이라 가정하였다. 재프로그램화에 전사 인자가 가지는 효과는 이들의 발현의 규모 및 지속에 민감하다. Foxo13A-NP 부가 후 이들 수치를 측정하기 위해, 나노입자-처리된 세포에서 Foxo1 단백질 및 mRNA 발현을 측정하였다. Jurkat T 세포주에서, Foxo1의 내생적 발현은 낮았고 Foxo13A NP 처리는 세포내 표지에 의해 측정했을 때, 전사 인자의 총 발현의 커다란 증가를 야기하였다(도 8A, 왼쪽 패널). 원발성 T 세포에서, Foxo1 단백질의 발현 수준은 이미 높으며, Foxo13A-NP는 단지 약한 증가를 야기하였다. 이는 NP 처리가 활성 Foxo13A 전사 인자의 근-생리학적 수준을 유도할 수 있음을 나타낸다 (도 8A, 우측 패널). NP 형질감염 후 활성화된, 증식하는 T 세포의 mRNA 역학을 확인하기 위해, Foxo13A의 발현을 조작된 mRNA에 특이적인 실시간 정량적 PCR을 이용하여 측정하였다. mRNA 발현은 제1일에 최대였고, 형질감염-후 8일에 기초선에 가까웠다 (도 8B). 시험관 내 T 세포 프라이밍 후 Foxo13A NP로의 처리는 TCM을 이펙터 및 이펙터 기억 집단과 구분하는 일차 표면 마커인 CD62L의 발현을 빠르게 증가시켰다 (도 8C) (Sallusto 등, *Nature* 401, 708-712 (1999)). Foxo13A의 일시적인 발현이 CD8+ T 세포 분화에서 지속적인 개조를 유발할 수 있는지 확인하기 위해, 3가지 독립적인 공여체로부터의 세포를 CD8-표적화 Foxo13A-eGFP NP로 처리하고, eGFP 발현을 기준으로 분류하고, 시험관 내 유지하였다. 형질감염하고 24시간 후에 CD62L+ 세포의 증가된 빈도가 관찰되었고, 이는 NP 부가 후 8 및 20 일에도 유지되었다 (도 8D).

[0400] Foxo13A에 의해 유도된 유전적 조절 네트워크 및 TCM 계통으로의 이의 연관성을 이해하기 위해, RNASeq를 Foxo13A-인코딩 NP 또는 대조 입자로 처리된 생체외 단리된 미경험 CD8, TCM CD8, 및 시험관 내-배양된 CD8 T 세포에 수행하였다. TCM vs. 평균 CD8 T 세포에서 더 높거나 더 낮은 발현을 가지는 (도 8E 및 도 9A) 상위 500 유전자로 이루어진 TCM 시그니처를 확인하였다. 미경험 CD8 T 세포에서 이들 유전자는 대부분 대등하게 조절되며, 이는 미경험 및 TCM 사이의 밀접한 전사 연관성과 일치한다 (Kaech & Cui, Immunol 12, 749-761 (2012)). Foxo13A-인코딩 NP 처리는 많은 수의 유전자의 차등한 발현을 야기하였다. 예상한 대로, 이들은 핵신 기억 전사 이펙터 KLF2, 및 표면 분자 SELL (CD62L), CD28, 및 S1PR1을 인코딩하는 종류를 포함하였고, 이들은 모두 CD8 TCM 이동 및 기능의 결정적인 매개인자다 (도 8F) (Skon 등, *Nature immunology* 14, 1285-1293 (2013); Boesteanu 등, *Seminars in immunology* 21, 69-77 (2009)). TCM 유전자 시그니처를 Foxo13A 볼케이노 플롯에 겹쳐본 것은 전사물의 강한 일치를 나타낸다: TCM 시그니처 유전자는 Foxo13A-프로그램화 CD8 세포에서 상향-조절되었다. 유전자 집합 농축 분석은 Foxo13A-조절된 전사물 및 TCM- 연관 유전자 발현 사이에 강한 연관성을 확인하였다 (도 9B). 요약하면, 이들 결과는 Foxo13A-인코딩 NP가 표면 마커의 영구적인 개조, 및 TCM-유사 표현형을 향한 전사적 프로그램화를 유발함을 나타낸다.

[0401] 논의. 이러한 실시예는 적절히 설계된 mRNA 나노수송체가 원발성 림프구에서 유전자 발현을 일시적으로 프로그램화할 수 있음을 증명한다. 예시로서, 기억 표현형 유도 및 치료적 유전체 편집이 나타나고, 이는 T 세포의 배양물에 유전조작된 나노입자의 단순 부가를 통해 어떻게 세포 기능 및/또는 분화가 영구히 재프로그램화될 수 있는지 보여준다. 이러한 나노기술 플랫폼은 특별한 세포 처리를 필요로 하지 않으며, 따라서 치료적 T 세포의 제조를 위한 확립된 프로토콜에 작업과정, 또는 과정에 사용되는 장비를 바꾸지 않고도 쉽게 통합될 수 있다. 현재 T 세포에서 히트-앤드-런 유전자 요법을 위해 선택하는 방법인 RNA 전기천공과 비교할 때 이는 제조에 있어 상당한 장점일 수 있다(Schumann 등, Proc Natl Acad Sci U S A 112, 10437-10442 (2015); Wang 등, Nucleic Acids Res 44, e30 (2016); Bai 등, Cell Discovery, (2015)). 도 2에 도시된 바와 같이, 투입되는 비싼 장비 외에도, 전기천공은 많은 배양 배지 교환, 원심분리 단계, 및 세척 주기를 필요로 한다. 이들 단계는 각각 오차를 일으킬 수 있고, 오염의 위험을 증가시키고 질환과-싸우는 림프구의 산출량을 타협한다. 최신의 유동 전기천공 장치도 T 세포 생존능, 및 따라서 산물 수율 및 품질을 감소시킨다 (Koh 등, Mol Ther Nucleic Acids 2, e114 (2013); Liu 등, Cancer Res 75, 3596-3607 (2015)). 본 접근법은 전이유전자를 송달하기 위한 세포막의 기계적인 투과화에 의존하지 않는다. 그 대신, 조작된 나노입자는 T 세포에 결합하고 수용체-매개 엔도사이토시스를 촉진한다 - 이는 세포 생존능을 타협하지 않고 이들이 수송하는 RNA가 침입할 수 있게 하는 생리학적 과정이다 (도 4C).

[0402] 다양한 분자 화물의 세포 흡수를 촉진시키는 소형 단백질인 세포-침투성 펩티드 (CPP)가 또한 치료제를 원발성 T 세포에 송달하기 위해 사용된 바 있다 (Copolovici, *ACS Nano* 8, 1972-1994 (2014)). CPP 도메인을 품은 거대한 단백질이라도 본 접근법을 이용하여 세포질로 도입될 수 있다. 그러나, 선택된 세포 유형의 특이적 표적화는 CPP로는 불가능하며, 단백질 전이는 비교적 비효율적이다 (Liu 등, *PLoS One* 9, e85755 (2014); Liu 등,

*Mol Ther Nucleic Acids* 4, e232 (2015)). 치료적 효과의 지속 또한 전이 단백질의 반-감기에 강하게 의존적이다. 대조적으로, 합성 mRNA로 로딩된 나노수송체는 특정 세포를 표적화하고, 모든 송달된 RNA 분자는 다중 단백질 복제물의 번역을 위한 주형으로서 기능한다.

[0403] 이들 실험에서 표적화된 CD3 및 CD8 분자는 림프구로 mRNA를 선별적으로 이동시키기 위해 사용될 수 있는 수많은 항원 중 단 두 가지이다. 특정한 T 세포 하위 집합, 가령 항원-경험 림프구만을 선별적으로 변형시키기 위해, 활성화 마커 (예컨대, CD25, 4-1BB, OX40, 또는 CD40L)가 표적화될 수 있다. 또한, 중심 중합체 및 음으로-하전된 코팅 물질에 대한 선택은 유연하고, 임상적 환경에서 생산이 시작되기 전에 최적화될 수 있을 것 같다. 전자의 관점에서, 과분지화 STAR 중합체, 폴리에틸렌 글리콜-이식된 폴리에틸렌이민, 및 메조다공성 실리카 나노입자를 비롯한 양이온성 중합체의 패널을 시험하였고 원발성 T 세포에서 이의 우월한 형질감염 효능 및 낮은 생체물질-매개 세포독성을 바탕으로 PBAE 447를 선택하였다. 후자는 수성 조건에서 1 내지 7 시간인 반-감기를 갖는 이러한 제형의 높은 생체분해성의 결과이다 (Mangraviti 등, *ACS Nano* 9, 1236-1249 (2015)). 이러한 시간 프레임은 유전자 요법을 위해 이상적인데, 왜냐하면 엔도좀에서 봉입되어 있을 때는 중합체가 mRNA를 응축하고 분해에 대해 효과적으로 보호하지만, 세포질로의 전이 후에는 빠르게 방출하여, 인코딩된 단백질의 전사를 가능하게 하기 때문이다. 중요하게는, 시험된 모든 나노입자 설계에서, RNA/PBAE 폴리머접합체의 양전하를 보호하고 표적-이탈 결합을 막기 위해 음으로 하전된 나노입자 코팅이 필요하였다.

[0404] T 세포 요법 외에도, 기술된 접근법의 사용은 mRNA 나노수송체 표적화 CD105를 이용한, 더 효과적인 조혈모세포 (HSC) 산물의 제조를 위해 연구되어 왔다 (도 10). 특히, HSC의 자기-재생 특성을 개선 또는 이들의 운명 결정 조절을 위한 전략은 상당한 임상적 매력을 지니고 있다 ((Galeev 등, *Cell Rep* 14, 2988-3000 (2016); Rentas 등, *Nature* 532, 508-511 (2016)). 더 높은 지속성 및/또는 생체 내 효능을 갖는 림프구를 제작하기 위한 보충물로서 약리학적 화합물이 시험되는 입양 T 세포 요법 분야와 유사하게, 라이브러리의 높은- 처리율 선별은 줄기 세포 증식을 변형할 수 있는 소형 분자를 규명한 바 있다 (Nikiforow & Ritz, *Cell Stem Cell*18, 10-12 (2016). 그러나, 많은 화학적 화합물은 단백질 기능을 저해할 수 있을 뿐이고, 요망되는 표적에 대한 이들의 특이성은 대개 논쟁의 대상이다 (Schenone 등, Nat Chem Biol 9, 232-240 (2013). 또한, 다양한 유형의 단백질이 소형 분자를 이용하여 제어될 수 없다. 대조적으로, 표적화 mRNA 나노수송체는 사실상 어떠한 공지 단백질 (또는 단백질의 조합)의 발현도 선별적으로 유도할 수 있다. 게다가, 이들이 수송하는 뉴클레오티드는 공개된 서열을 바탕으로 쉽게 제작할 수 있다.

[0405] 요약하면, 실시예 1은 백혈구 배양물에 부가된 단일 나노입자 시약이 '히트-앤드-런' 유전자 변형을 이용하여 치료적 목적을 위한 T 세포를 효율적으로 재프로그램화할 수 있음을 증명한다. 이러한 플랫폼은 특별한 장비나 훈련을 필요로 하지 않으므로 제조과정에 복잡성을 부가하지 않는다. 따라서, 임상적 등급의 유전자 세포-기반 요법의 제조를 실질적으로 단순화시킬 수 있고, 이는 유전적으로 조작된 T 세포를 이용한 환자의 치료가 비용면으로 저렴해지고 더 널리 적용가능해질 수 있음을 의미한다.

[0406] 당해 분야의 숙련가에게 이해될 바와 같이, 본 명세서에 개시된 각각의 구체예는 특정한 언급된 요소, 단계, 성분 또는 구성물질을 포함하거나, 본질적으로 이들로 구성되거나, 이들로 이루어질 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 변하는 용어 "포함하는" 또는 "포함하다"는 포함하지만 이에 제한되지 않음을 의미하며, 미특정된 요소, 단계, 성분, 또는 구성물질의 개재를, 대부분의 양일 경우에도 허용한다. 변하는 문구 "로 이루어진"은 명시되지 않은 임의의 원소, 단계, 성분 또는 구성물질을 배제한다. 변하는 문구 "로 본질적으로 이루어진"은 명시된 요소, 단계, 성분 또는 구성물질에 구체예의 범위를 제한하며 구체예에 실질적으로 영향을 주지 않는 것들에 제한한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 재료 효과는 선택된 세포 유형을 나노수송체에 48 시간 동안 노출시킨 후 선택된 세포 유형의 표현형을 변화시키는 본 명세서에 개시된 나노수송체의 능력에 통계학적으로-유의한 감소를 야기할 수 있다.

[0407] 달리 지정되지 않는 한, 명세서 및 청구범위에서 사용된 성분의 양, 가령 분자량, 반응 조건, 등의 특성을 표현하는 모든 수는 모든 경우에 용어 "약"이 수식된 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 언급되지 않는 한, 명세서 및 첨부된 청구범위에 제시된 수적인 척도는 본 발명에 의해 수득되야 할 것으로 요망되는 특성에 따라 달라질 수 있는 추정치이다. 적어도, 그리고 청구 범위에 대한 균등 원칙의 적용을 제한하려는 시도가 아니지만, 각각의 수적인 척도는 최소한 보고된 유효 자릿수의 수에 비추어 그리고 일반적인 반올림 기술을 적용하여 간주되어야 한다. 추가의 명확성이 요구되는 경우, 용어 "약"은 언급된 숫자적 수치 또는 범위와 함께 사용되는 경우 당해 분야의 숙련가에 의해 합리적으로 이해되는 의미를 가지며, 즉 언급된 수치 또는 범위보다 약간 많거나 약간 적은, 언급된 수치의 ±20%; 언급된 수치의 ±19%; 언급된 수치의 ±18%; 언급된 수치의 ±17%; 언급된 수치의 ±16%; 언급된 수치의 ±15%; 언급된 수치의 ±14%; 언급된 수치의 ±13%; 언급된 수치의

±12%; 언급된 수치의 ±11%; 언급된 수치의 ±10%; 언급된 수치의 ±9%; 언급된 수치의 ±8%; 언급된 수치의 ±7%; 언급된 수치의 ±6%; 언급된 수치의 ±5%; 언급된 수치의 ±4%; 언급된 수치의 ±3%; 언급된 수치의 ±2% 또는 언급된 수치의 ±1% 이내를 의미한다.

[0408] 본 발명의 넓은 범위를 제시하는 수치 범위 및 척도가 추정치임에도 불구하고, 특정한 실시예에 제시된 숫자적 수치는 가능하면 정확하게 기록하였다. 임의의 숫자적 수치는, 그러나, 내재적으로 각각의 시험 측정에서 발견되는 표준 편차로부터 필연적으로 생기는 특정한 오차를 내포한다.

[0409] 본 발명을 기술하는 맥락에서 (특히 하기 청구범위의 맥락에서) 사용된 용어 "a", "an", "the" 및 유사한 관사는 본 명세서에 달리 지시되거나 문맥상 분명히 상반되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 본 명세서에서 수치 범위의 언급은 단지 범위 내에 속하는 각각의 개별 수치를 개별적으로 언급하는 약식 방법으로서 기능하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 달리 지시되지 않는 한, 각각의 개별적인 수치는 본 명세서에 개별적으로 언급된 것처럼 명세서 내에 포함된다. 본 명세서에 기술된 모든 방법은 본 명세서에 달리 지시되거나 문맥상 분명히 상반되지 않는 한, 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 임의의 및 모든 예시, 또는 예시적 언어(예컨대, "가령")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 예시하기 위한 것으로 의도되며 달리 청구된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 본 명세서의 어떠한 언어도 본 발명의 실시에 필수적인 비-청구된 임의의 요소를 가리키는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0410] 본 명세서에 개시된 발명의 대안적인 요소 또는 구체예의 그룹화는 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 각각의 그룹 구성원은 개별적으로 또는 그룹의 다른 구성원 또는 본 명세서에서 발견되는 다른 요소와 함께 조합되어 지칭되고 청구될 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원이 편의성 및/또는 특허성을 이유로 그룹에 포함되거나 삭제될 수 있음이 고려된다. 임의의 그러한 포함 또는 삭제가 발생한 경우, 본 명세서는 변경된 그룹을 포함하는 것으로 간주되며 따라서 첨부된 청구범위에서 사용된 모든 마쿠쉬(Markush) 그룹의 문자적 설명을 충족한다.

[0411] 본 발명을 수행하기 위해 발명자에게 공지된 최적 방식을 비롯한 본 발명의 특정한 구체예가 본 명세서에 기술된다. 물론, 전술된 설명의 독해를 바탕으로 하는 이들 기술된 구체예에 대한 변형이 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 본 발명자는 숙련된 기술자가 그러한 변형을 적절하게 사용할 것으로 예상하며, 본 발명자는 본 발명이 본 명세서에 구체적으로 기술된 것 이외에도 실시될 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 대로 본 명세서에 첨부된 청구범위에 언급된 주요 내용의 모든 변형 및 균등물을 포함한다. 또한, 본 명세서에 달리 지시되거나 문맥상 분명히 상반되지 않는 한 모든 가능한 변형에서 상기-기술된 요소의 임의의 조합이 본 발명에 포함된다.

[0412] 게다가, 본 명세서 전반에 걸쳐 특허 및 인쇄된 간행물에 대한 수많은 참조가 이루어졌다. 각각의 상기-언급된 참고문헌 및 인쇄된 간행물은 이들의 특정하게 언급된 교시에 대해 개별적으로 본 명세서에 참고로서 포함된다.

[0413] 마지막으로, 본 명세서에 개시된 본 발명의 구체예는 본 발명의 원리를 설명하는 것으로 이해되어야 한다. 사용될 수 있는 다른 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 따라서, 예시의 방식으로, 그러나 제한함 없이, 본 발명의 대안적인 구성이 본 명세서의 교시에 따라 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 나타나고 기술된 바와 똑같은 것에 제한되지 않는다.

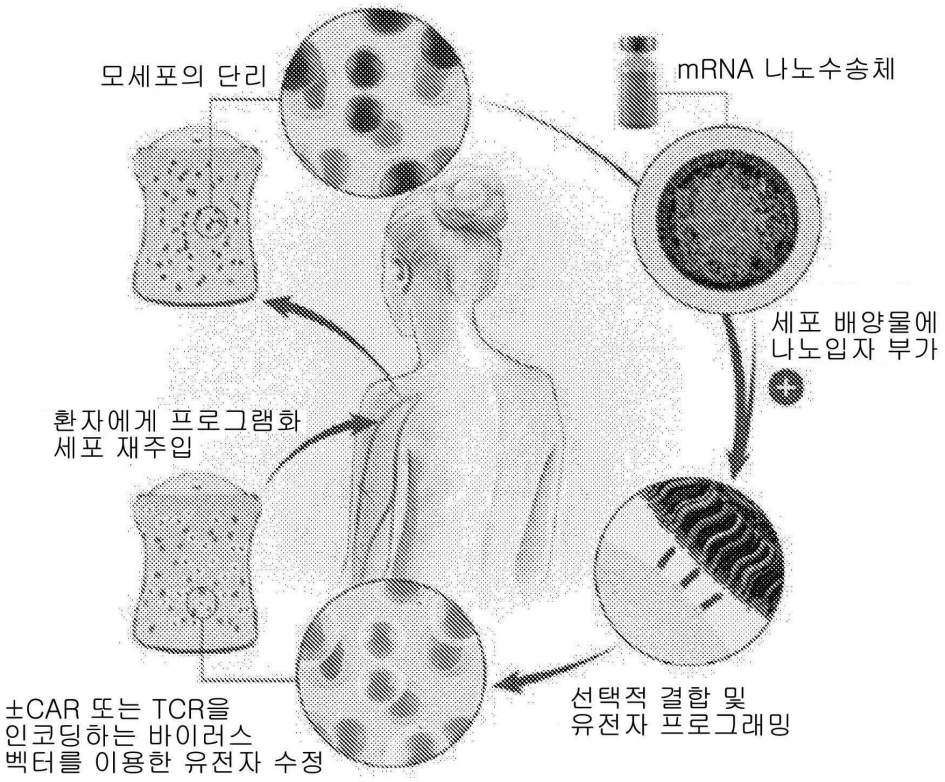
[0414] 본 명세서에 나타난 세부사항은 단시 예시의 방식이고 본 발명의 바람직한 구체예의 예시적 논의의 목적을 위함이며 본 발명의 다양한 구체예의 가장 유용하고 쉽게 이해될 수 있는 원리 및 개념적 측면의 설명을 제공하기 위해 제시된다. 이와 관련하여, 본 발명의 기본적인 이해를 위해 필요한 것 이상으로 자세한 본 발명의 구조적 설명을 나타내려는 시도는 하지 않았고, 도면 및/또는 실시예에 대한 설명은 당해 분야의 숙련가에게 본 발명의 몇몇 형태가 어떻게 실제로 구현될 수 있는지 분명하게 보여준다.

[0415] 본 개시에서 사용된 정의 및 설명은 하기의 실시예에서 분명하고 명백히 변형되지 않는한 또는 의미의 적용이 무의미한 또는 본질적으로 무의미한 임의의 구성을 제공하는 경우 임의의 장래의 구성을 제어하는 것을 의미하고 그렇게 의도된다. 용어의 구성이 용어를 무의미하거나 본질적으로 무의미하게 만드는 경우, Webster's Dictionary, 3판 또는 당해 분야의 숙련가에게 공지인 사전, 가령 Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (발행 Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)에서 정의를 택해야 한다.

도면

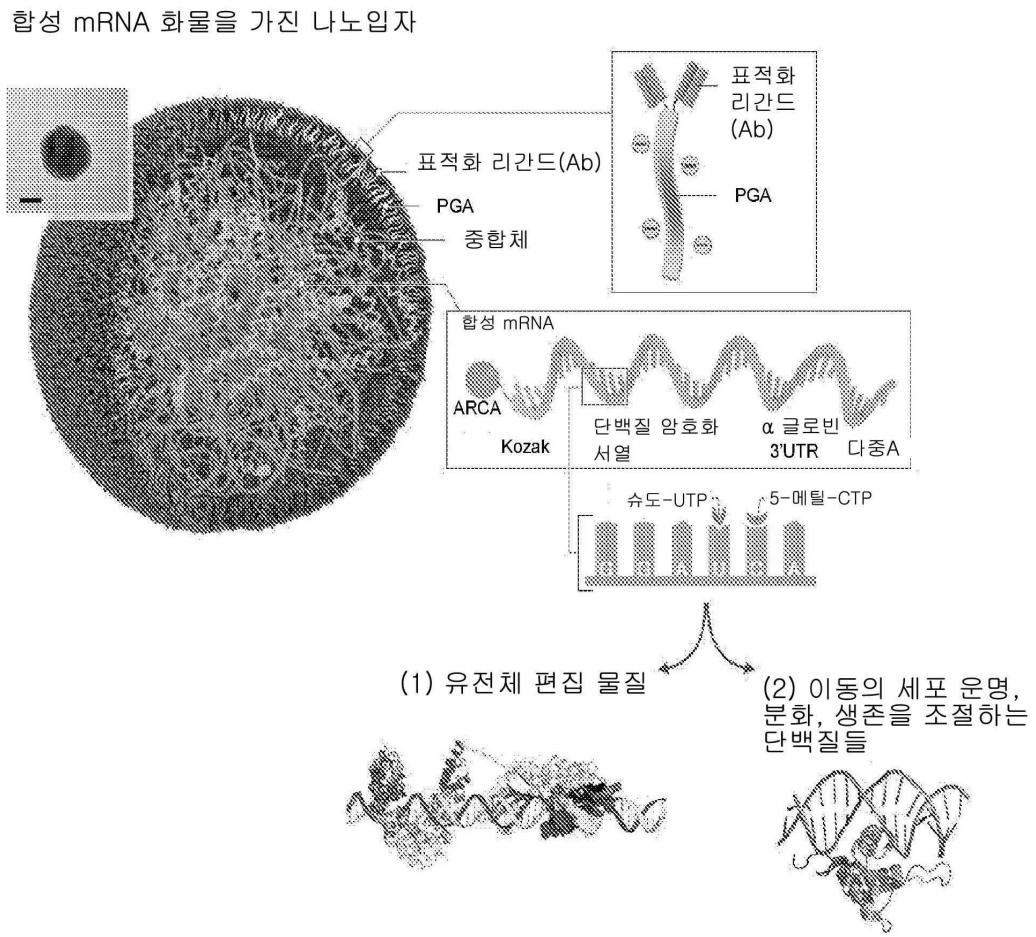
도면1a

도 1A


모세포의 단리
mRNA 나노수송체
세포 배양물에
나노입자 부가
환자에게 프로그램화
세포 재주입
±CAR 또는 TCR을
인코딩하는 바이러스
벡터를 이용한 유전자 수정
선택적 결합 및
유전자 프로그래밍

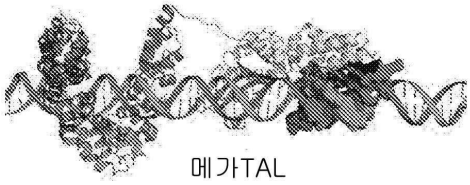
도면1b

도 1B


합성 mRNA 화물을 가진 나노입자
표적화 리간드(Ab)
PGA
중합체
표적화 리간드 (Ab)
PGA
합성 mRNA
ARCA
Kozak
단백질 암호화 서열
α 글로빈 3'UTR
다중A
슈도-UTP
5-메틸-CTP
(1) 유전체 편집 물질
(2) 이동의 세포 운명, 분화, 생존을 조절하는 단백질들

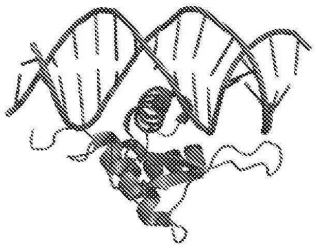
도면1c

도 1C



메가TAL

| 치료 영역 | 표적 유전자 |
|---|---|
| T 세포 신호전달 | Shp1 포스파타제 |
| 면역 관문 | PD1 수용체 |
| 안전성 | 내생적 TCRa |
| HIV 내성 | CCR5 및또는 CXCR4 |



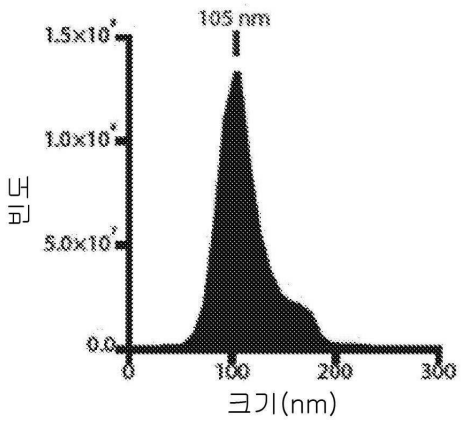
| 치료 영역 | 표적 유전자 |
|---|---|
| T 세포 기억 | **FOXO1, LKB1** |
| 세포 노화 | **TERT** (텔로미어 단축을 차단) |
| 세포 이동 | 케모카인 수용체 CCR2b 또는 CCR4 |

도면2

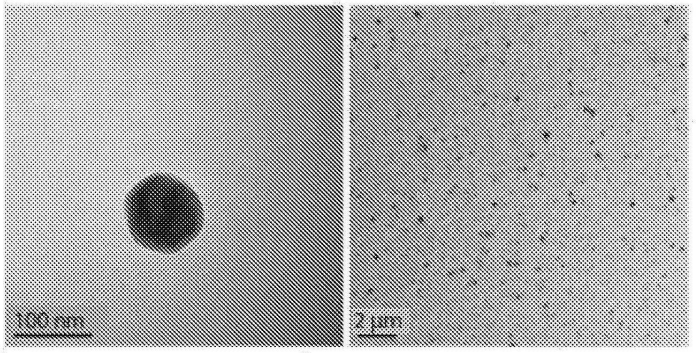
| 항체 특이성 | 염료 | 클론 | 공급업체 |
|---|---|---|---|
| CD34 | BV421 | 561 | Biolegend |
| CD90 | APC | 5E10 | Biolegend |
| CD105 | PE-Cy7 | 43A3 | Biolegend |
| CD49F | PE | GOH3 | Biolegend |
| CD28 | BV 510 | CD28-2 | Biolegend |
| CD62L | APC-CY7 | DERG56 | Biolegend |
| CD62L | PE-CY5 | DERG56 | Biolegend |
| CD45RA | ALEXA 700 | HI1000 | Biolegend |
| CCR7 | PE | G043H7 | Biolegend |
| CD3 | APC | HIT3A | Biolegend |
| CD3 | BV421 | HIT3A | Biolegend |
| CD45R0 | PERCP-CY5.5 | UCHL1 | Biolegend |
| CD8 | BV421 | SK1 | Biolegend |
| IL2 | BV421 | MQ1-17H12 | Biolegend |
| IFN-G | PE | B27 | Biolegend |
| CD19 | PE | H1B19 | Biolegend |
| CD133 | PE-Vio615 | AC133 | Miltenyi |
| Foxo1 | -- | C29H4 | Cell Signal |
| 항-토끼 IG FAB2 | Alexa 647 | --- | Cell Signal |
| 스트렙태그 II | 비오틴 | --- | --- |
| 스트렙타비딘 | APC | --- | ebioscience |
| 7AAD | --- | --- | ebioscience |

도면3

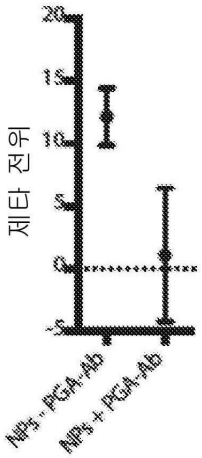
도 3A




도 3B

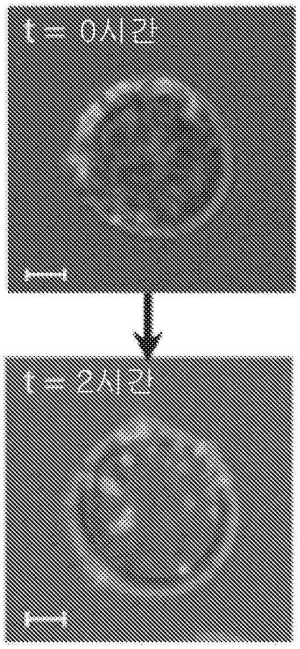



도 3C

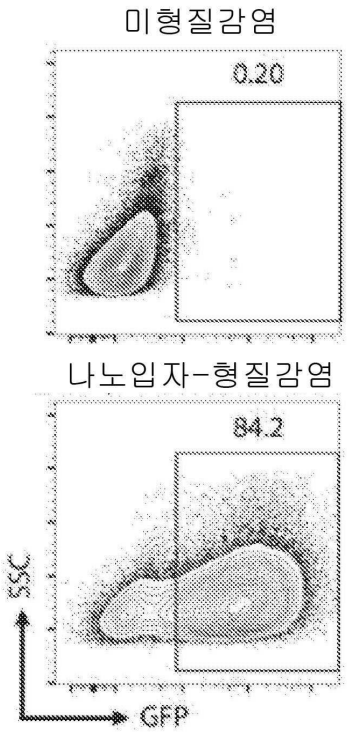


도면4ab

도 4A

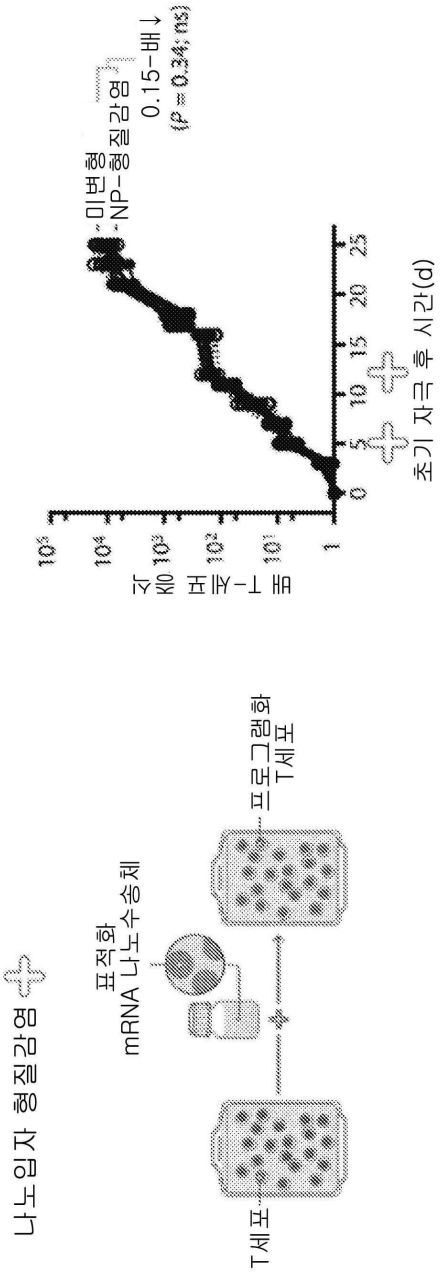



도 4B

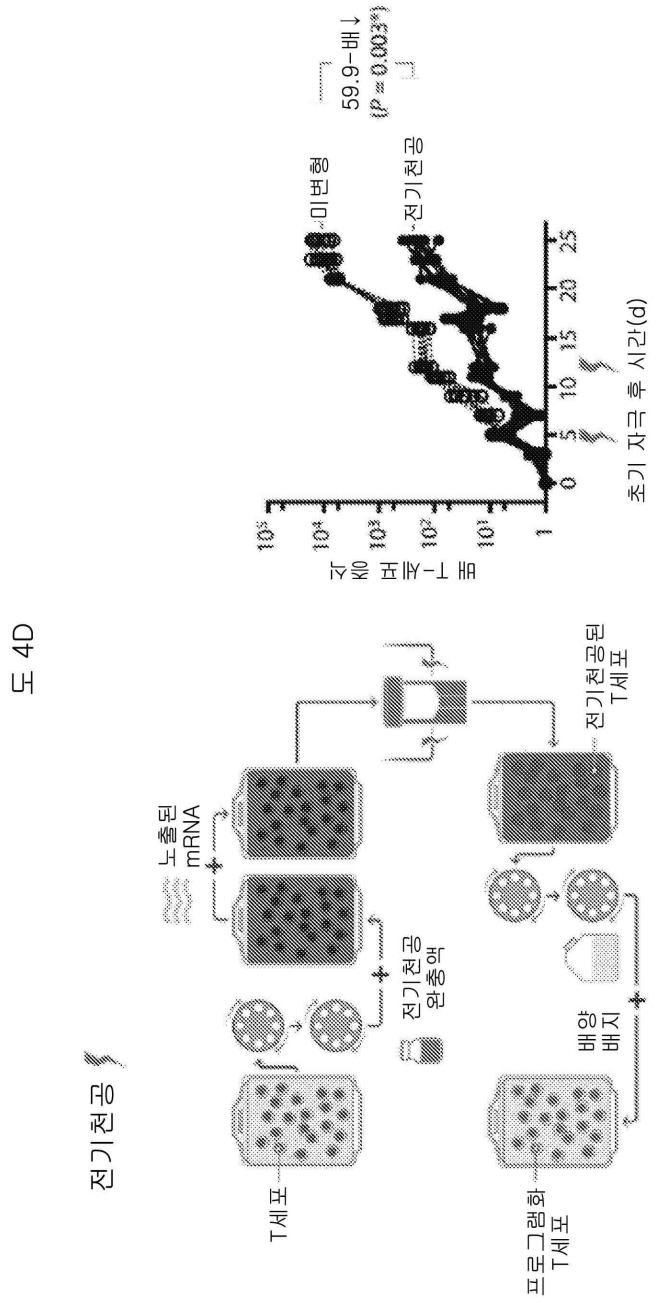


도면4c

도 4C

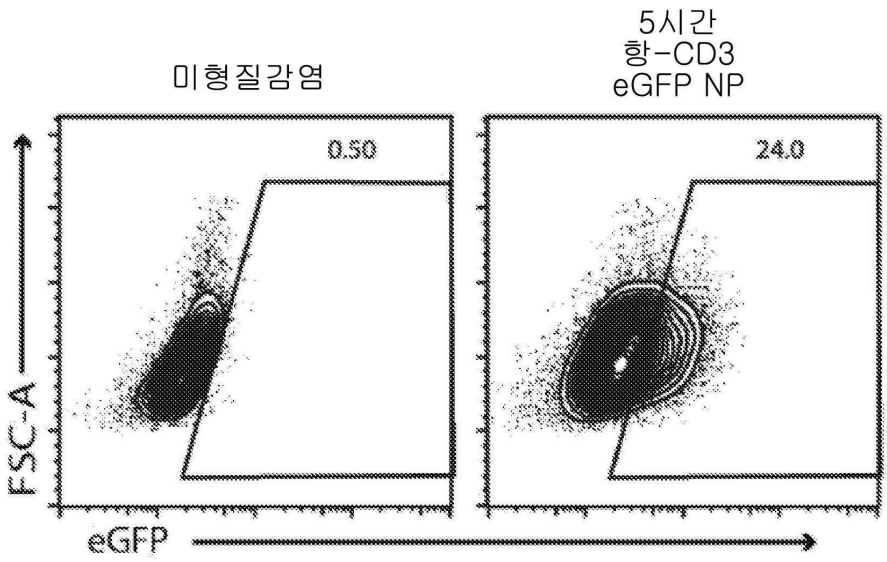

나노입자 형질감염
표적화
mRNA 나노수송체
T세포
프로그램화
T세포
바이러스 역가
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^1$
1
0
5
10
15
20
25
초기 자극후 시간(d)
미변형
NP-형질감염
0.15-배 ↓
($P = 0.34$; n.s)

도면4d


도 4D
전기천공
T세포
노출된 mRNA
전기천공 완충액
전기천공된 T세포
배양 배지
프로그램화 T세포
세포 트랜스펙션 %
$10^5$
$10^4$
$10^3$
$10^2$
$10^1$
1
0
5
10
15
20
25
초기 자극 후 시간(d)
미변형
전기천공
59.9-배↓
($P = 0.003^{**}$)

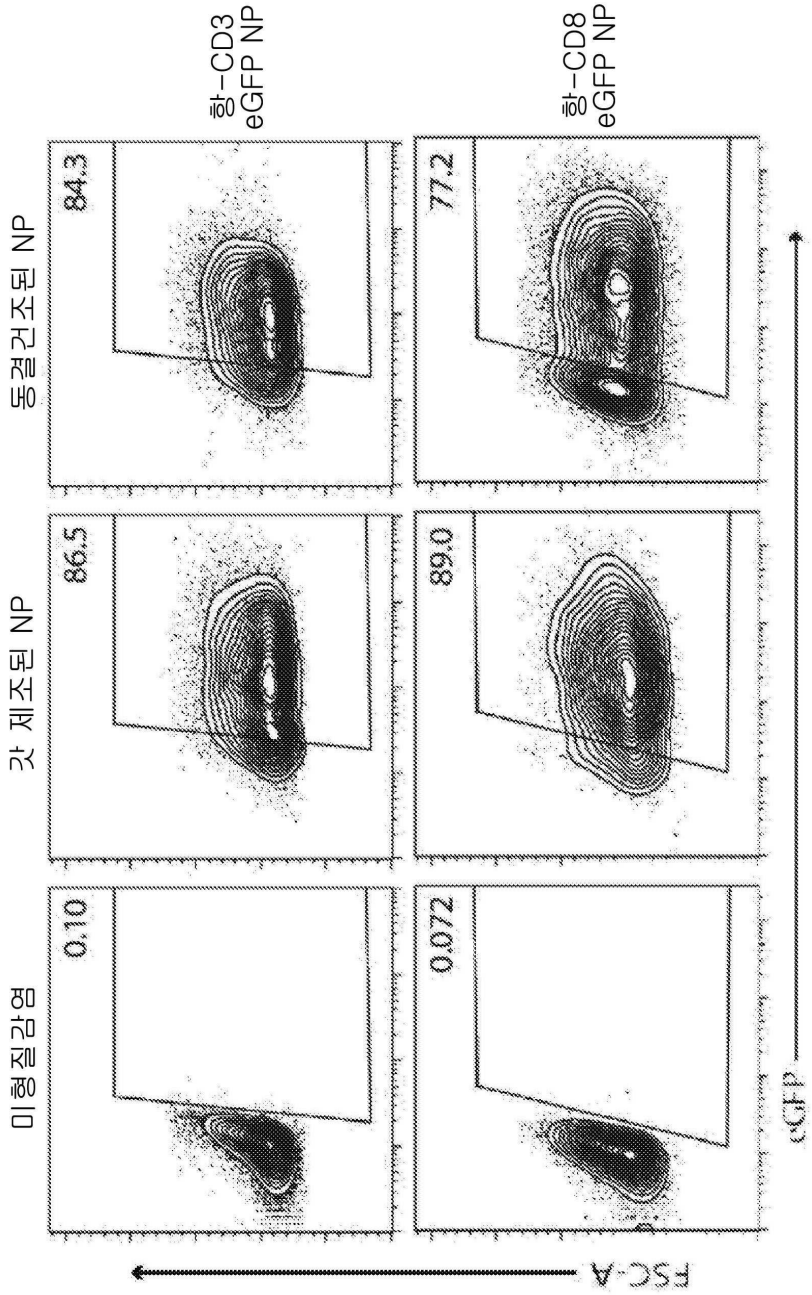
도면5a

도 5A

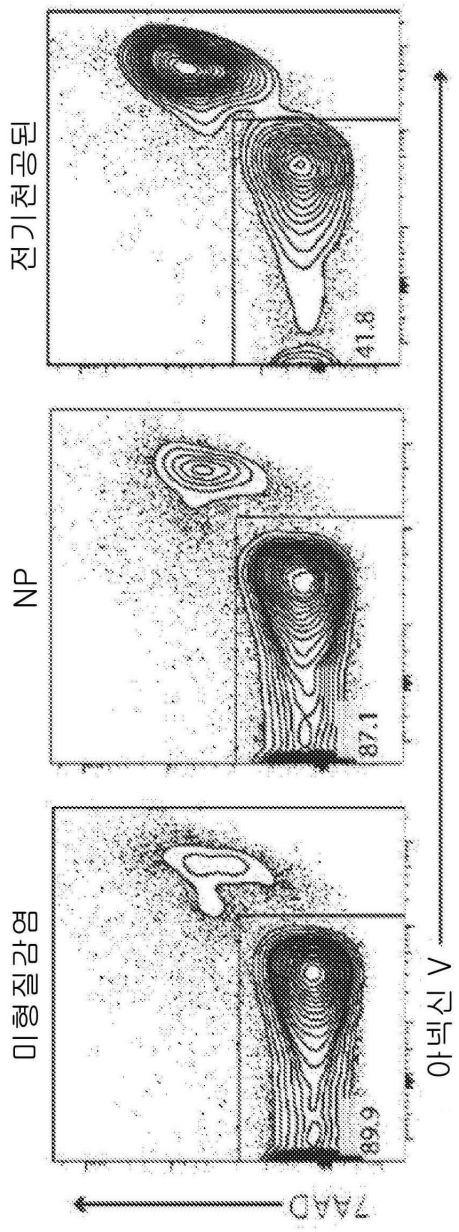


도면5b

도 5B

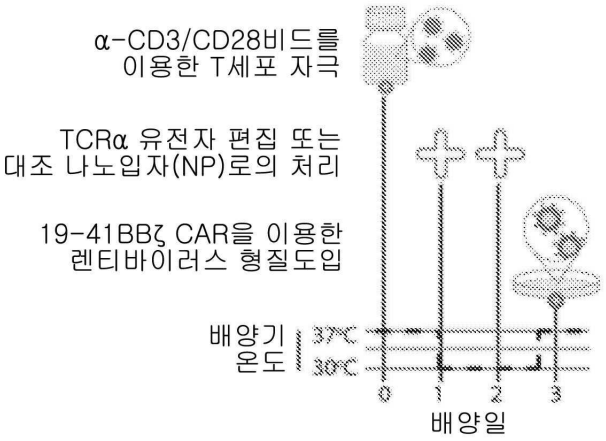

미형질감염
갓 제조된 NP
동결건조된 NP
항-CD3 eGFP NP
항-CD8 eGFP NP
0.10
86.5
84.3
0.072
89.0
77.2
FSC-A
eGFP

도면6

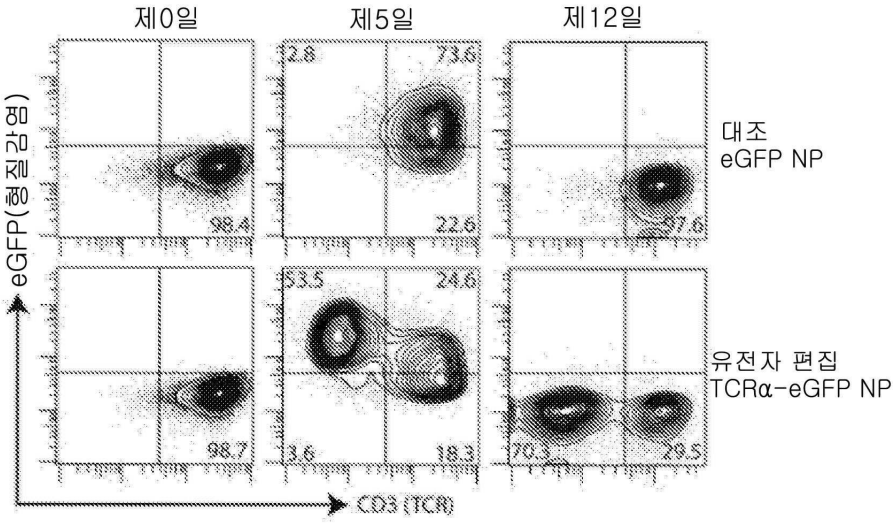


도면7ab

도 7A

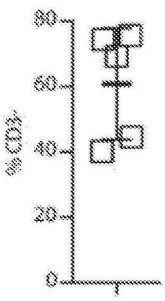



도 7B

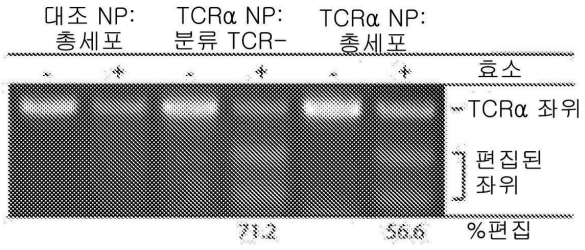



도면7cd

도 7C

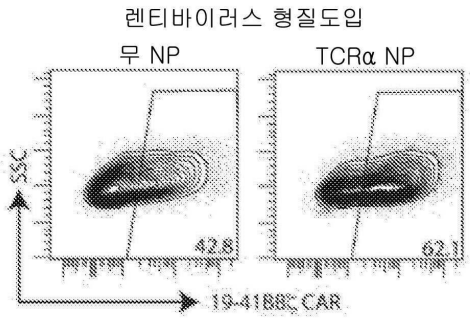



도 7D

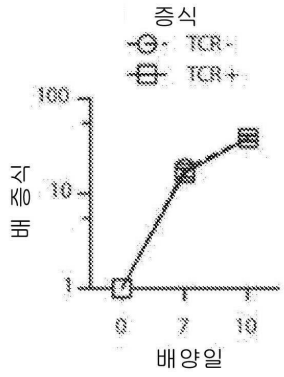


도면7ef

도 7E

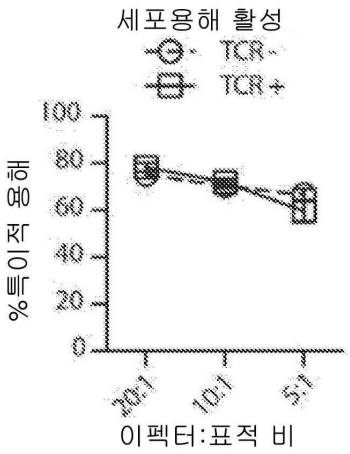



도 7F

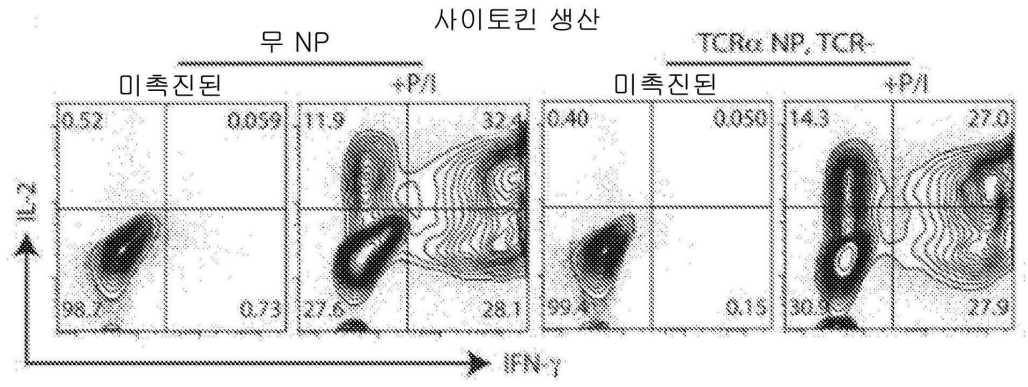



도면7gh

도 7G

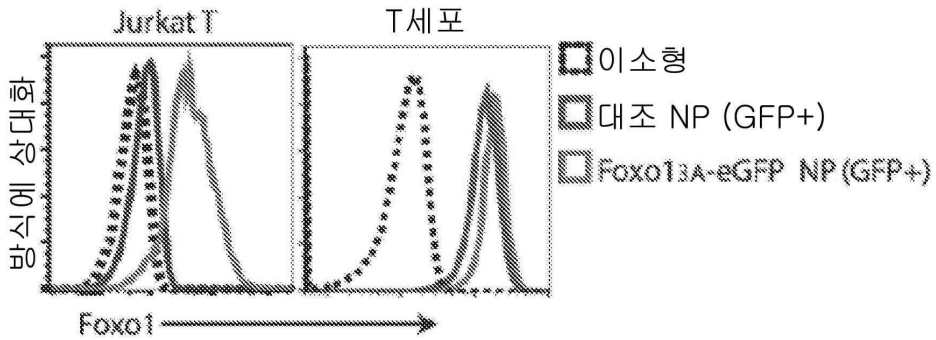



도 7H

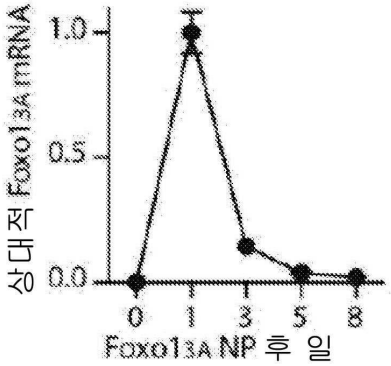


도면8ab

도 8A

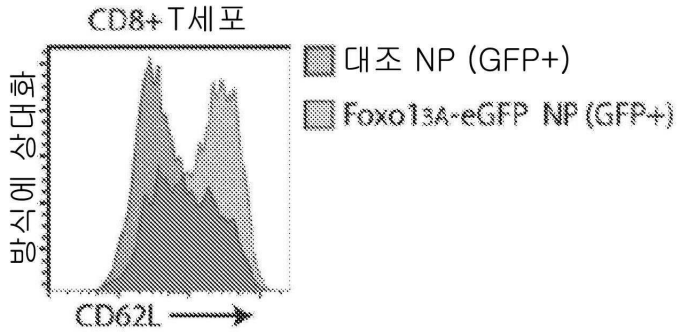



도 8B

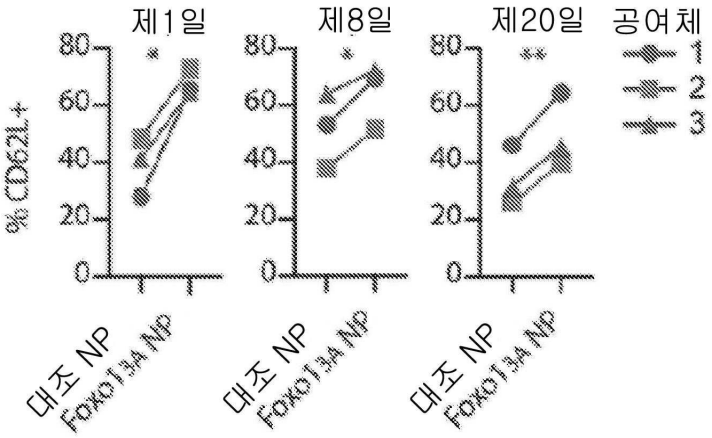


도면8cd

도 8C

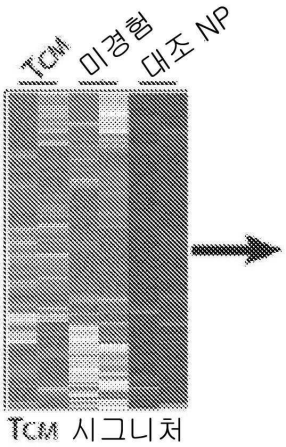



도 8D

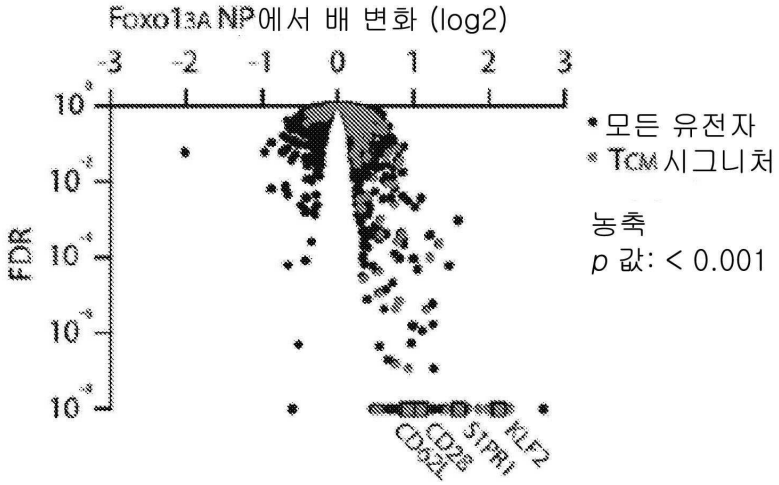


도면8ef

도 8E

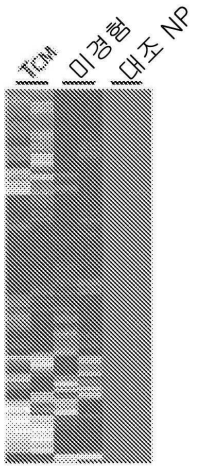



도 8F



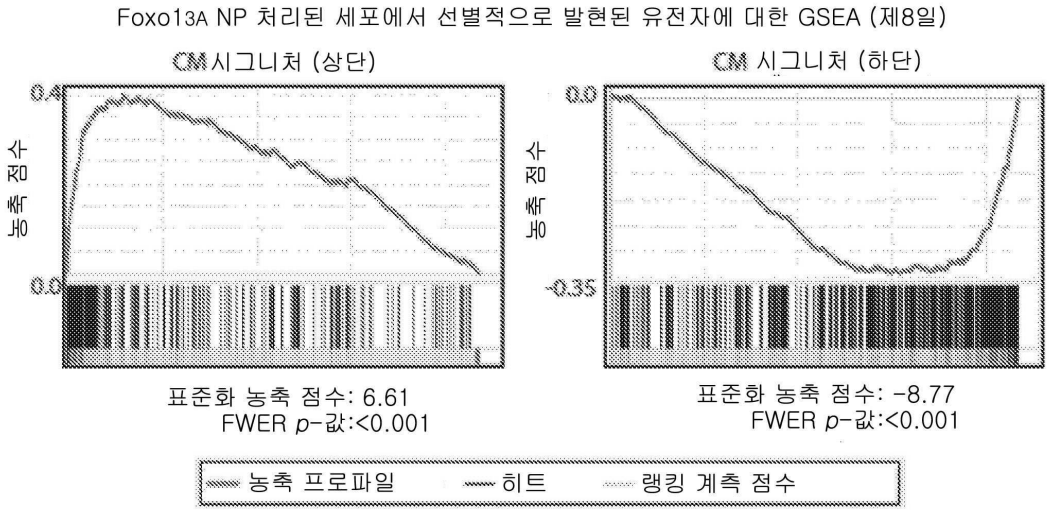
도면9

도 9A



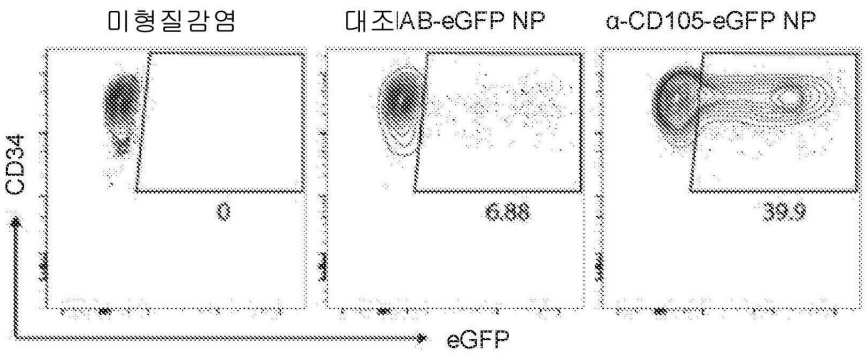

TCM 시그니처 (하단)

도 9B

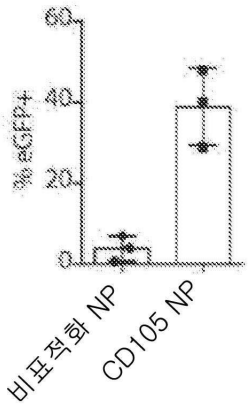


도면10ab

도 10A

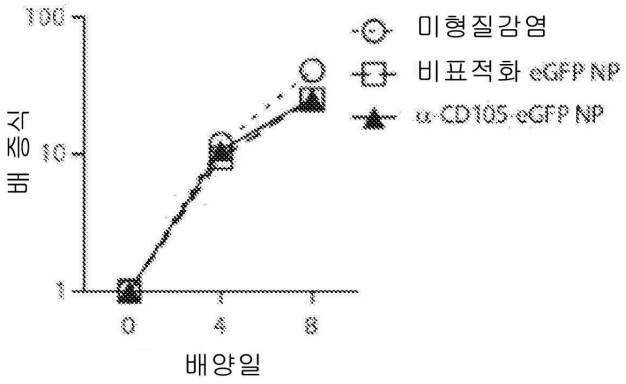



도 10B

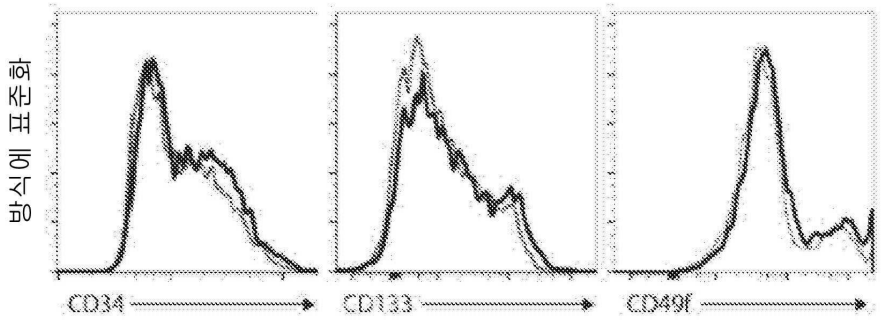


도면10cd

도 10C




도 10D




도면11a

TCRα에 특이적인 예시적인 메가TAL

MGSCRYPYDVPDYAPPKKKRKVVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSTVAQHHEALVGHGFT
HAHIVALSQHPAALGTVAVTYQHIITALPEATHEDIVGVGKQWSGARALEALLTDAGELRGP
PLQLDTGQLVKIAKRGGVTAMEAVHASRNALTGAPLNLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQR
LLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQA
LETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIAS
HDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTP
DQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC
QDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETV
QRLLPVLCQDHGLTPDQVVAIASNIGGKQALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGR
PAMDAVKKGLPHAPELIRRVNRRIGERTSHRVAISRVGGSSRRESINPWILTGFADAEGSFI
LDIRNRNNESNRYRTSLRFQITLHNKDKSILENIQSTWKVGKITNSGDRAVMLRVTRFEDLK
VIIDHFEKYPLITQKLGDYKLFKQAFSVMENKEHLKENGIKELVRIKAKMNWGLTDELKKAFP
ENISKERPLINKNIPNFKWLAGFTSGDGYFGVNLKKVKGNAKVYVGLRFSISQHIRDKNLMN
SLITYLGCGSIWEKNKSEFSWLEFVVTKFSDINDKIIPVFQENTLIGVKLEDFEDWCKVAKLIE
EKKHLTESGLDEIKKIKLNMNKGRVF* (서열 번호: 1)

도면11b

도 11(계속)

예시적인 Shp-1 포스파타제 유전자

접근 NM_080549: 인간

actctaaaacgagaagtacaagtgagttcccccaaggggtcggccgcgcctcttcctgtccccgccctgccggctgccccaggccagtgg
agtggcagccccagaactgggaccaccgggggtggtgaggcggcccggcactgggagctgcatctgaggcttagtccctgagctctctg
cctgcccagactagctgcacctcctcattccctgcgccccccttcctctccggaagcccccaggatggtgaggtggtttcaccgagacctcagt
gggctggatgcagagaccctgctcaagggccgaggtgtccacggtagcttcctggctcggcccagtcgcaagaaccagggtgacttctcg
ctctccgtcagggtgggggatcaggtgacccatattcggatccagaactcaggggatttctatgacctgtatggaggggagaagtttgcgact
ctgacagagctggtggagtactacactcagcagcagggtgtcctgcaggaccgcgacggcaccatcatccacctcaagtacccgctgaa
ctgctccgatcccactagtgagaggtggtaccatggccacatgtctggcgggcaggcagagacgctgctgcaggccaagggcgagccct
ggacgtttcttgtgcgtgagagcctcagccagcctggagacttcgtgctttctgtgctcagtgaccagcccaaggctggcccaggctccccgc
tcagggtcacccacatcaaggtcatgtgcgagggtggacgctacacagtgggtggtttggagaccttcgacagcctcacggacctggtgga
gcatttcaagaagacggggattgaggaggcctcaggcgcctttgtctacctgcggcagccgtactatgccacgagggtgaatgcggctgac
attgagaaccgagtgttggaactgaacaagaagcaggagtccgaggatacagccaaggctggcttctgggaggagtttgagagtttgcag
aagcaggaggtgaagaacttgcaccagcgtctggaagggcagcggccagagaacaagggcaagaaccgctacaagaacattctccc
ctttgaccacagccgagtgatcctgcagggacgggacagtaacatccccgggtccgactacatcaatgccaactacatcaagaaccagct
gctaggccctgatgagaacgctaagacctacatcgccagccagggctgtctggaggccacggtcaatgacttctggcagatggcgtggca
ggagaacagccgtgtcatcgtcatgaccacccgagaggtggagaaaggccggaacaaatgcgtcccatactggcccgaggtgggcat
gcagcgtgcttatgggccctactctgtgaccaactgcggggagcatgacacaaccgaatacaaactccgtaccttacaggtctccccgctg
gacaatggagacctgattcgggagatctggcattaccagtacctgagctggcccgaccatggggtcccagtgagcctgggggtgtcctca
gcttcctggaccagatcaaccagcggcaggaaagtctgcctcacgcagggcccatcatcgtgcactgcagcgccggcatcggcgcac
aggcaccatcattgtcatcgacatgctcatggagaacatctccaccaagggcctggactgtgacattgacatccagaagaccatccagatg
gtgcgggcgcagcgctcgggcatggtgcagacggaggcgcagtacaagttcatctacgtggccatcgcccagttcattgaaaccactaag
aagaagctggaggtcctgcagtcgcagaagggccaggagtcggagtacgggaacatcacctatcccccagccatgaagaatgcccatg
ccaaggcctcccgcacctcgtccaagagcttggagtctagtgcagggaccgtggctgcgtcacctgtgagacggggtggccagagggga
ctgccagtgccgggtcccctgtgctgtctcctgacctgcaccaactgcctgtacttgccccctgcacccggctgcagacacaaggaggat
gtgtatgagaacctgcacactaagaacaagagggaggagaaagtgaagaagcagcggtcagcagacaaggagaagagcaagggtt
ccctcaagaggaagtgagcggtgctgtcctcaggtggccatgcctcagccctgaccctgtggaagcatttcgcgatggacagactcacaac
ctgaacctaggagtgccccattcttttgtaatttaaatggctgcatcccccccacctctccctgaccctgtatatagcccagccaggccccagg
cagggccaaccctctcctcttgtaaataaagccctgggatcactgtgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (서열 번호: 2)

예시적인 PD1 수용체 (PDCD1 유전자)

접근 AY238517: 인간

atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggccaggatggttcttagactccccagaca
ggccctggaaccccccccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacac
atcggagagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccgcagc
cagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaacgggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggcccggcgcaat
gacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctcagggtga
cagagagaagggcagaagtgcccacagcccaccccagcccctcacccaggccagccggccagttccaaaccctggtggttggtgt
cgtgggcggcctgctgggcagcctggtgctgctagtctgggtcctggccgtcatctgctcccgggccgcacgagggacaataggagcc
aggcgcaccggccagcccctgaaggaggacccctcagccgtgcctgtgttctctgtggactatggggagctggatttccagtggcgag
agaagaccccggagccccccgtgccctgtgtccctgagcagacggagtatgccaccattgtctttcctagcggaatgggcacctcatcc
cccgcccgcaggggctcagctgacggccctcggagtgcccagccactgaggcctgaggatggacactgctcttggcccctctga
(서열 번호: 3)

도면11c

도 11(계속)

예시적인 TCRα 유전자

접근 X04954: 인간
atgacatccattcgagctgtatttatattcctgtggctgcagctggacttggtgaatggagagaatgtggagcagcatccttcaaccctgagtgtc
caggagggagacagcgctgttatcaagtgtacttattcagacagtgcctcaaactacttcccttggtataagcaagaacttggaaaaagacct
cagcttattatagacattcgttcaaatgtgggcgaaaagaaagaccaacgaattgctgttacattgaacaagacagccaaacatttctccctgc
acatcacagagacccaacctgaagactcggctgtctacttctgtgcagcaagtaggaaggactctgggggttaccagaaagttacctttgga
actggaacaaagctccaagtcatcccaaatatccagaaccctgac (서열 번호: 4)

예시적인 CCR5 유전자

접근 U66285: 인간
ttggattatcaagtgtcaagtccaatctatgacatcaattattatacatcggagccctgccaaaaaatcaatgtgaagcaaatcgcagcccgcc
tcctgcctccgctctactcactggtgttcatctttggttttgtgggcaacatgctggtcatcctcatcctgataaactgcaaaaggctgaagagcatg
actgacatctacctgctcaacctggccatctctgacctgtttttccttcttactgtcccccttctgggctcactatgctgccgcccagtgggactttgga
aatacaatgtgtcaactcttgacagggctctatttttataggcttcttctctggaatcttcttcatcatcctcctgacaatcgataggtacctggctgtcg
tccatgctgtgtttgctttaaaagccaggacggtcacctttggggtggtgacaagtgtgatcacttgggtggtggctgtgtttgcgtctctcccagg
aatcatctttaccagatctcaaaaagaaggtcttcattacacctgcagctctcattttccatacattaaagatagtcatcttggggctggtcctgcc
gctgcttgtcatggtcatctgctactcgggaatcctaaaaactctgcttcggtgtcgaaatgagaagaagaggcacagggctgtgaggcttatc
ttcaccatcatgattgtttatttttctcttctgggctccctacaacattgtccttctcctgaacaccttccaggaattctttggcctgaataattgcagtagc
tctaacaggttggaccaagctatgcaggtgacagagactcttgggatgacgcactgctgcatcaaccccatcatctatgcctttgtcggggag
aagttcagaaactacctcttagtcttcttccaaaagcacattgccaaacgcttctgcaaatgctgttctattttccagcaagaggctcccgagcga
gcaagctcagtttacacccgatccactggggagcaggaaatatctgtgggcttgtga (서열 번호: 5)

예시적인 CXCR4 유전자

접근 NM_001008540: 인간
ttttttttcttccctctagtgggcggggcagaggagttagccaagatgtgactttgaaaccctcagcgtctcagtgccctttgttctaaacaaagaa
ttttgtaattggttctaccaaagaaggatataatgaagtcactatgggaaaagatggggaggagagttgtaggattctacattaattctcttgtgc
ccttagcccactacttcagaatttcctgaagaaagcaagcctgaattggtttttaaattgctttaaaaatttttttttaactgggttaatgcttgctgaatt
ggaagtgaatgtccattcctttgcctcttttgcagatatacacttcagataactacaccgaggaaatgggctcaggggactatgactccatgaa
ggaaccctgtttccgtgaagaaaatgctaatttcaataaaatcttcctgcccaccatctactccatcatcttcttaactggcattgtgggcaatgga
ttggtcatcctggtcatgggttaccagaagaaactgagaagcatgacggacaagtacaggctgcacctgtcagtggccgacctcctctttgtc
atcacgcttcccttctgggcagttgatgccgtggcaaactggtactttgggaacttcctatgcaaggcagtccatgtcatctacacagtcaacctc
tacagcagtgtcctcatcctggccttcatcagtctggaccgctacctggccatcgtccacgccaccaacagtcagaggccaaggaagctgttg
gctgaaaaggtggtctatgttggcgtctggatccctgcctcctgctgactattcccgacttcatctttgccaacgtcagtgaggcagatgacag
atatatctgtgaccgcttctaccccaatgacttgtgggtggttgtgttccagtttcagcacatcatggttggccttatcctgcctggtattgtcatcctgt
cctgctattgcattatcatctccaagctgtcacactccaagggccaccagaagcgcaaggccctcaagaccacagtcatcctcatcctggcttt
cttcgcctgttggctgccttactacattgggatcagcatcgactccttcatcctcctggaaatcatcaagcaagggtgtgagtttgagaacactgt
gcacaagtggatttccatcaccgaggccctagctttcttccactgttgtctgaaccccatcctctatgctttccttggagccaaatttaaaacctctg
cccagcacgcactcacctctgtgagcagagggtccagcctcaagatcctctccaaaggaaagcgaggtggacattcatctgtttccactgag
tctgagtcttcaagttttcactccagctaacacagatgtaaaagacttttttttatacgataaataacttttttttaagttacacatttttcagatataaaa
gactgaccaatattgtacagttttattgcttgttggatttttgtcttgtgtttcttagttttgtgaagtttaattgacttatttatataaatttttttgtttcatattg
atgtgtgtctaggcaggacctgtggccaagttcttagttgctgtatgtctcgtggtaggactgtagaaaagggaactgaacattccagagcgtgt
agtgaatcacgtaaagctagaaatgatccccagctgtttatgcatagataatctctccattcccgtggaacgtttttcctgttcttaagacgtgatttt
gctgtagaagatggcacttataaccaaagcccaaagtggtatagaaatgctggtttttcagttttcaggagtgggttgatttcagcacctacagt
gtacagtcttgtattaagttgttaataaaagtacatgttaaacttaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (서열 번호: 6)

도면11d

도 11(계속)

예시적인 FOXO1 유전자

접근 BC021981: 인간

ttccgtccttccgtccgcggccctgtcagctggagcgcggcgcaggctctgccccggcccggcggctctggccggccgtccagtccgtgcgg
cggaccccgaggagcctcgatgtggatggccccgcgaagttaagttctgggctcgcgcttccactccgccgcgccttcctcccagtttccgtcc
gctcgccgcaccggcttcgttccccccaaatctcggaccgtcccttcgcgcccctccccgtccgccccccagtgctgcgttctcccccctcttggctc
tcctgcggctgggggaggggcgggggtcaccatggccgaggcgcctcaggtggtggagatcgacccggacttcgagccgctgccccggc
cgcgctcgtgcacctggccgctgcccaggccggagtttagccagtccaactcggccacctccagcccggcgccgtcgggcagcgcggctg
ccaaccccgacgccgcggcgggcctgccctcggcctcggctgccgctgtcagcgccgacttcatgagcaacctgagcttgctggaggaga
gcgaggacttcccgcaggcgcccggctccgtggcggcggcggtggcggcggcggccgccgcggccgccaccgggggggctgtgcgggg
acttccagggcccggaggcgggctgcctgcacccagcgccaccgcagcccccgccgcccgggccgctgtcgcagcacccgccggtgcc
ccccgccgccgctgggccgctcgcggggcagccgcgcaagagcagctcgtcccgccgcaacgcgtggggcaacctgtcctacgccgac
ctcatcaccaaggccatcgagagctcggcggagaagcggctcacgctgtcgcagatctacgagtggatggtcaagagcgtgccctacttca
aggataagggtgacagcaacagctcggcgggctggaagaattcaattcgtcataatctgtccctacacagcaagttcattcgtgtgcagaat
gaaggaactggaaaaagttcttggtggatgctcaatccagagggtggcaagagcgggaaatctcctaggagaagagctgcatccatgga
caacaacagtaaatttgctaagagccgaagccgagctgccaagaagaaagcatctctccagtctggccaggagggtgctggggacagcc
ctggatcacagttttccaaatggcctgcaagccctggctctcacagcaatgatgactttgataactggagtacatttcgccctcgaactagctca
aatgctagtactattagtgggagactctcacccattatgaccgaacaggatgatcttggagaaggggatgtgcattctatggtgtacccgccat
ctgccgcaaagatggcctctactttacccagtctgtctgagataagcaatcccgaaaacatggaaaatcttttggataatctcaaccttctctcat
caccaacatcattaactgtttcgacccagtcctcacctggcaccatgatgcagcagacgccgtgctactcgtttgcgccaccaaacaccagttt
gaattcacccagcccaaactaccaaaaatatacatatggccaatccagcatgagccctttgccccagatgcctatacaaacacttcaggac
aataagtcgagttatggaggtatgagtcagtataactgtgcgcctggactcttgaaggagttgctgacttctgactctcctccccataatgacatta
tgacaccagttgatcctggggtagcccagcccaacagccgggttctgggccagaacgtcatgatgggccctaattcggtcatgtcaacctatg
gcagccaggcatctcataacaaaatgatgaatcccagctcccatacccaccctggacatgctcagcagacatctgcagttaacgggcgtcc
cctgccccacacggtaagcaccatgccccacacctcgggtatgaaccgcctgacccaagtgaagacacctgtacaagtgcctctgcccca
ccccatgcagatgagtgccctgggggctactcctccgtgagcagctgcaatggctatggcagaatgggccttctccaccaggagaagctc
ccaagtgacttggatggcatgttcattgagcgcttagactgtgacatggaatccatcattcggaatgacctcatggatggagatacattggatttt
aactttgacaatgtgttgcccaaccaaagcttcccacacagtgtcaagacaacgacacatagctgggtgtcaggctgagggttagtgagcag
gttacacttaaaagtacttcagattgtctgacagcaggaactgagagaagcagtccaaagatgtctttcaccaactccctttagttttctcggtta
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (서열 번호: 7)

도면11e

도 11(계속)

예시적인 LKB1 유전자

접근 NM_000455: 인간

gcgtgtcgggcgcggaaggggggaggcggcccggggcgcccgcgagtgaggcgcggggcggcgaagggagcgcgggtggcg
gcacttgctgccgcggccttggatgggctgggccccccctcgccgctccgcctcctccacacgcgcggcggccgcggcgagggggga
cgcgccgcccgggggcccggcaccttcgggaacccccccggcccggagcctgcggcctgcgccgcctcggccgccgggagccccg
tggagcccccgccgccgcgccgcccccgcggaccggacgctgagggcactcggggcggggcgcgcgctcgggcagacgtttgcg
gggaggggggcgcctgccgggccccggcgaccaccttgggggtcgcgggccggctcgggggggcgcccagtgcgggccctcgc
gggcgccgggcagcgaccagccctgagcggagctgttggccgcggcgggaggcctcccggacgcccccagcccccccgaacgc
tcgcccgggccggcgggagtcggcgcccccccgggaggtccgctcggtcgtccgcggcggagcgtttgctcctgggacaggcggtg
ggaccggggcgtcgccggagacgcccccagcgaagttgggctctccaggtgtgggggtcccgggggggtagcgacgtcgcggacc
cggcctgtgggatgggcggcccggagaagactgcgctcggccgtgttcatacttgtccgtgggcctgaggtcccggaggatgacct
agcactgaaaagccccggccggcctccccagggtccccgaggacgaagttgaccctgaccgggccgtctcccagttctgaggccc
gggtcccactggaactcgcgtctgagccgccgtcccggaccccccggtgcccgccggtccgcagaccctgcaccgggcttggactcg
cagccgggactgacgtgtagaacaatcgtttctgttggaagaagggtttttccccttcctttttggggttttgttgccttttttttttctttttctttgtaa
aattttggagaagggaagtcggaacacaaggaaggaccgctcacccgcggactcagggctggcggcgggactccaggaccctg
ggtccagcatggaggtggtggacccgcagcagctgggcatgttcacggagggcgagctgatgtcggtgggtatggacacgttcatcc
accgcatcgactccaccgaggtcatctaccagccgccgccgcaagcgggccaagctcatcggcaagtacctgatgggggacctgct
gggggaaggctcttacggcaaggtgaaggaggtgctggactcggagacgctgtgcaggagggccgtcaagatcctcaagaagaa
gaagttgcgaaggatcccccaacggggaggccaacgtgaagaaggaaattcaactactgaggaggttacggcacaaaaatgtcat
ccagctggtggatgtgttatacaacgaagagaagcagaaaatgtatatggtgatggagtactgcgtgtgtggcatgcaggaaatgctg
gacagcgtgccggagaagcgtttcccagtgtgccaggcccacgggtacttctgtcagctgattgacggcctggagtacctgcatagcc
agggcattgtgcacaaggacatcaagccggggaacctgctgctcaccaccggtggcaccctcaaaatctccgacctgggcgtggc
cgaggcactgcacccgttcgcggcggacgacacctgccggaccagccagggctccccggctttccagccgcccgagattgccaac
ggcctggacaccttctccggcttcaaggtggacatctggtcggctggggtcaccctctacaacatcaccacgggtctgtacccttcga
aggggacaacatctacaagttgtttgagaacatcgggaaggggagctacgccatcccgggcgactgtggcccccgctctctgacct
gctgaaagggatgcttgagtacgaaccggccaagaggttctccatccggcagatccggcagcacagctggttccggaagaaacat
cctccggctgaagcaccagtgcccatcccaccgagcccagacaccaaggaccggtggcgcagcatgactgtggtgccgtacttgg
aggacctgcacggcgcggacgaggacgaggacctcttcgacatcgaggatgacatcatctacactcaggacttcacggtgcccgg
acaggtcccagaagaggaggccagtcacaatggacagcgccggggcctccccaaggccgtgtgtatgaacggcacagaggcg
gcgcagctgagcaccaaatccagggcggagggccgggcccccaaccctgcccgcaaggcctgctccgccagcagcaagatcc
gccggctgtcggcctgcaagcagcagtgaggctggccgcctgcagcccgtgtccaggagccccgccaggtgcccgcgccaggcc
ctcagtcttcctgccggttccgcccgccctcccggagaggtggccgccatgcttctgtgccgaccacgccccaggacctccggagcg
ccctgcagggccgggcaggggacagcagggaccgggcgcagccctccccctcggccgcccggcagtgcacgcggcttgttg
acttcgcagccccgggcggagccttcccgggcgggcgtgggaggagggaggcggcctccatgcactttatgtggagactactggcc
ccgcccgtggcctcgtgctccgcagggcgcccagcgccgtccggcggccccgccgcagaccagctggcgggtgtggagaccag
gctcctgaccccgccatgcatgcagcgccacctggaagccgcgcggccgctttggtttttgtttggttggttccatttttcttttttttcttttttttttt
aagaaaaaataaaaggtggatttgagctgtggctgtgaggggtgtttgggagctgctgggtggcaggggggctgtggggtcgggctc
acgtcgcggccgcctttgcgctctcgggtcaccctgctttggcggcccggccggagggcaggaccctcacctctccccaaggccac
tgcgctcttgggaccccagagaaaaccccggagcaagcaggagtgtgcggtcaatatttatatcatccagaaaagaaaaacacgag
aaacgccatcgcgggatggtgcagacgcggcggggactcggagggtgccgtgcgggcgaggccgcccaaatttggcaataaata
aagcttgggaagcttggacctgaaaaaaaaaa (서열 번호: 8)

도면11f

도 11(계속)

예시적인 EOMES 유전자

NCBI 참조 서열: NC_000003.12 인간

aagtttccaagtggtcaacttgaccgatgctttggcaattgaaaaagggcagaaaggcgcgggctagtgggtggatggggacaaagat
ctaagtcaccttcttccagcgtgtgagcctgggagggagggtgggggtcctgaggagcaagagggtacgaggaaggaaaaaggagaggg
cttctgggttagtttccacctcctgctttccaactcacggcgctttccttccggaaaggacgctggattcagggcgcgccagtacgcgcagta
gcggcccgcgagtcggcaggtgggtagccccggcgcgggaggaaggggaagttaccttcccctcggaagagggcgctggctccccc
atcctgcctttataataaggccaccggaggagaggaagcagccagctgccgtctgcgctttgcaaagcatgcagttaggggagcagctc
ttggtgagctcagtgaacctgcctggcgcgcacttctacccgctggagagtgcgcgaggcggcagcggcgggagcgctggccacctcc
ccagcgcggcccctctcctcagaagttggacttagacaaagcgtccaagaagttttccggcagtctctcctgcgaggcggtgagcggg
gagcccgcagccgccagcgcagggggccccgcggccatgcttagtgacaccgacgccggggacgcatttgccagcgctgcggcagt
ggccaagccggggccccggacggccgcaagggctccccctgcgggggaggaggagctgccctccgccgctgcagccgccgccgc
cgccgccgccgcggctgcggccactgcgcgctactccatggacagcctgagctccgagcggtactacctccagtcccccggtcctcag
gggtcggagctggctgcgccctgctcactcttcccgtaccaggcggcggctggggcgccccacggacctgtgtacccggctcctaacgg
ggcgcgctacccctacggctccatgctgccccccggcggcttccccgcggctgtgtgcccacccgggagggcgcagttcggcccagga
gccggtgcgggcagtggcgcgggcggtagcagcggcgggggcggcggcccgggcacctatcagtacagccaggggctccgctct
acgggccgtaccctggagccgcagcggcgggatcttgcggaggactgggggcctgggggttccaggttctggcttccgtgcccacgtc
tacctgtgcaaccggcctctgtggctcaaattccaccgccaccaaactgagatgatcattacgaaacagggcaggtgagcgcagcgtg
gaggggcccctgggttcggggataaagggtgacgtgtggtcctggggaaggtccgggatgagggagctgaacccagttgttccgcgcg
gtgcttagagtgtttcaccgcgcgcaataaatctccgtagacaccgcatctccaatgcggtgtccctctgtgtcagtgccccggcggctcttg
cagggtgccaatgttacggctgtacaccgcttttccctcccatcatcctcacctgaacagacctggaggaggcggaaatggaaattaggg
catgtccacaagctggattcgttagatcctcctgctcggcggtatgcttgtgcatgcctgcatgccggcaaggagccacggataggaag
gctcaagagctggccacctgagcgcagtagatgggctcccgcagttttaggcgccagggtctccacggggcgtctccgggaggtgggc
atgaaggctagagcgccggcctcggaagctcggtcggagtaggtggttagatctgccctggagccagacctggctcgggttcggtgcgc
gagaaagttctgatatacatccaactgctaacactggctacttctggggaaagggaggggtgggtgctgagagaggggcactcaaagg
ggacttttagcctaaagttttaatatatatttttaacaagaataacctaatattgttctctggtacttttcaaaatggtgcatttaaaaattagtagtttt
taacattctaggagaaaaatttaagagcgtctgaaagggccgagaatatgagccttcggaagcacgcgcgaatttggaatataccgat
gttggggcaagctttttttttttttttttttttttttttttttttttttttgaaaagacggaaaggttccaagagttgccaactcaaaaatattttacatagtttc
agaccacttgatctaccagcattctgttcactgcaaacttttaaatgtgttccgaccctatcccaggtgtctggggaacccgctggggcctgg
gcctgttctaggacatcccaattaaaatcgatttttctgattctattcccttgcacaggcgcatgtttccttttcttgagcttcaacataaacggactc
aatcccactgcccactacaatgtgttcgtagaggtggtgctggcggaccccaaccactggcgcttccaggggggcaaatgggtgacctgt
ggcaaagccgacaataacatgcagggtgagcagagaagaggctcgggccggggaggaacgggcgggaagaaatcgtaaccctc
gactcacacaactcacatttaaatgtagcacttttttttttcccctttccattctgaggcctagaggtgttagtatgagtgtctttgagttgcttgtttgac
ggagaggagagtttgctaagtcagatttcttgtctgccaatatgtagatatttagaaccttaactaagacatcaccccaccccccaatccct
acgtttaacaaatcagtagtcataagctctccaggtgggaagggctcctgggattctaatgttcacttgagaaagcccagccaaagtttagt
tcacccataaatatccaactgtcttccatcggatgttgcccttacagctttagaaggccccaaattgaccttcaagagtcatctcttgttagctc
cgtttctaaattctgaaatgccattcaggggagtccctagtgcaaggaaggttggaagcacaggggcctgggagggatatggatgtagtc
ctgctggtctccactggcctctttaagcaacttttactgggagaccaactgtaagtctagctcttatatcttgctcatagctaagagacatccctc
cgctttctccatttgtaaacagccctatatgcttgggttttgtgttttgtttcattttctcttaggcaacaaaatgtatgttcacccagagtctcctaata
ctggttcccactggatgagacaggagatttcattcgggaaattaaaactcaccaataacaaaggcgcaaataacaacaacacccaggt
agagtgacagagcaggaggggatatcttctggctttgactataaggcttttttctaataagagtccctactcttttcactgtatttataatatttgca
tttgtgacctgtttgctcgcctatttctaaccatttttgttcttttgacctttctcatcttcacttttcttattggatttcgataacagtgagttgactattaaga
acagaaatagcgaagtattttgggaatttaggaaaccaagaggaaagcatatctatcacaaccacatacccagctatgatttaaatttcaa
aaaaaaagTgggggggcaataatgagaccttaaacttgcaataaacaaagctgttagtgaggagcatttagaagtccaataccaaa
atacataatttgtcaaaatctaattttgttgaaccactaagaggcttttagatttagcaatttttttctgtactctttccagatgatagtcttacaatcc
ttacacaaatacccaaccccgactgcatattgttgaagttacagaggatggcgtggaggacttgaatgagccctcaaagacccagacttta
ccttctcagaaacgcaattcattgcagtgactgcctaccaaaacaccgatgtgagtgtcccagacatctcaagaatctctaaagctaaggt
ccagcatgataaatcactcaatgactgtttttctcccctatctagattactcaactaaagattgatcataacccctttgcaaaaggcttcagag
acaactatgattc

도면11g

도 11(계속)

gtaagtgcagcttttatccacacttgcctgatcatctctgagcaggacatacatcaacaggcactttgctgataatgtattttaggaagagctt
ttacctttgggatttttacatatttttctttttccaaaatttttttcctttactaatcttgctttagatttttctcagaaaggttgtgttaatttctgaagaaatgtt
aaggacttaaaaatgaagaggttttttagcatttgagtgaagatttgaaattttaagaatctgcatttatatataccttttcttttcatttgatccatttt
tttatcctcccaagagcagatattattactctccccacccccactttttttttaacataagaaaaaactgaaactaagaggatgtaatttcac
aacacgaaatagcaaggccctgctctttttaaaatctgagttttctaccgccacagccagtgtttttccatcacattgacaaaggaggtttga
tctgagtttttcgtgttctaggactagtaaaggtagattttctatagtttaaatacttgatgcctaggaggaaacttttttcttgcatggtgggaaattt
ttcccaataagccaagagtccagctaaaatgggccagtgcatctcctgcctctgttctttcagcccaacagaccagcactttcggtgtagat
aaccaacacaagccttttcatttctgggaggtggtttgtttggggacaacattagggttttttttttttttaagtgtttctctttatattgtagcatgtac
accgcttcagaaaatgacaggttaactccatctcccacggattctcctagatcccatcagattgtccctggaggtcggtacggcgttcaatc
cttcttcccggagccctttgtcaacactttacctcaagcccgctattataatggcgagagaaccgtgccacagaccaacggcctcctttcac
cccaacagagcgaagaggtggccaaccctccccagcggtggcttgtcacgcctgtccagcaacctgggaccaacaaactagacatc
agttcctatgaatctgaatatacttctagcacattgctcccatatggcattaaatccttgccccttcagacatcccatgccctggggtattaccc
agacccaaccttttcctgcaatggcagggtggggaggtcgaggttcttaccagaggaagatggcagctggactaccatggacctccaga
acaagccccactgtgttctctgaagatcagctctccaaggagaaagtgaaagaggaaattggctcttcttggatagagacacccccttcc
atcaaatctctagattccaatgattcaggagtatacaccagtgcttgtaagcgaaggcggctgtctcctagcaactccagtaatgaaaatt
caccctccataaagtgtgaggacattaatgctgaagagtatagtaaagacacctcaaaaggcatgggagggtattatgctttttacacaa
ctccctaaagagttatttttaacctcaaaaattagctaacttttgcagatggacttggtggtgttttttgttgtcttctttgcctaggttgccaaaaaag
atgtttgccttccaccttgatgcatcctgttttgtgcaattctctaaaagaaggtgccaaagctttttgattgctgcaggtaactgaaacaaacct
agcatttttaaaaaaataagattaatggaagactttaaggtattttaaaattcgaagggtatccaaggttctgtatttatttattggggagacact
aacccttcaaagaagcaggctgtgaacattgggtgcccagtgctatcagatgagttaaaaccttgattctcatttctatttgtaaattcttaag
caaatagaagccgagtgttaaggtgttttgcttctgaaagagggctgtgccttccgtttcagaaggagacattttgctgttacattctgccagg
ggcaaaagatactaggcccaggagtcaagaaaagctttgtgaaagtgatagtttcacctgactttgattccttaacccccggcttttggaa
caagccatgtttgccctagtccaggattgcctcacttgagacttgctaggcctctgctgtgtgctggggtggccagtgggactcaggagag
agcaagctaaggagtcaccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagggagaatttaaaagtgtacagttgtgtgtttagatacactatagaat
aatgtggtatatattgtacaaatagtctacataggtgtctgggataatgtaaaactggtgctttggctttgtaaagaatttgcaaatcacttaac
agctgcaggggcaaggggagagtttcatcatccccatgatatttgggaatattctgtttacttcttagatagttaagaatgtattcagctactat
gtactaacttgaaccgtgtttaaggaaaactcctatttcatcctcttcttgcgccatcccctctccctaacttggtaatgtgaagaaactaaaac
ctgataccacagctcctataggcattttagagatcttggatttttatgtacagtcttagtcatttttaataaatgtggttcagtaagggaacgga
(서열 번호: 9)

도면11h

도 11(계속)

예시적인 ID2 유전자

NCBI 참조 서열: NC 000002.12 인간
ggggacgaagggaagctccagcgtgtggccccggcgagtgcggataaaagccgccccgccgggctcgggcttcattctgagccgag
cccggtgccaagcgcagctagctcagcaggcggcagcggcggcctgagcttcagggcagccagctccctcccggtctcgccttccctc
gcggtcagcatgaaagccttcagtcccgtgaggtccgttaggaaaaacagcctgtcggaccacagcctgggcatctcccggagcaaaa
cccctgtggacgacccgatgagcctgctatacaacatgaacgactgctactccaagctcaaggagctggtgcccagcatcccccagaa
caagaaggtgagcaagatggaaatcctgcagcacgtcatcgactacatcttggacctgcagatcgccctggactcgcatcccactattgt
cagcctgcatcaccagagacccgggcagaaccaggcgtccaggacgccgctgaccaccctcaacacggatatcagcatcctgtcctt
gcaggtaagacctgctccggggtccccgccccgccgccgcacactcccgcggtcgtctgggctgtcactaggagatccgtagcccaga
cggtgactttcgtatgagctatttaactttatttttcttcagaatctgctgtagattgagctgtgcgtgaaattgctagtaagttctgacatgttaatgc
gtctgtctttaaatctgaattgttaccataaacgtgtttaatggaacttgctggtctgtggactacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaac
cctttctacttaacattgtcttaacctcgtactctttatcctctttctttccaggcttctgaattcccttctgagttaatgtcaaatgacagcaaagcac
tgtgtggctgaataagcggtgagtgtttgcttgtgccacccgtgggtaaactgcccctcggtgtgtgtgcgcgcgcgcgcatgtgtttttgcttgt
gtatctataaaatgtctgatttggtaaatgcatgcttacttcgcggtgttacccgtactacattgtctcactagacatgaaggagcttgtagctttg
ggtgctcgagatcacagaacatttttcctttaaaaggaaatgatgccaataacttactacgaaggcggccgaggaacgtgtgtattggctttg
tagcaaatgtaatgccctggatcttcctacgagtcctctggtactatgaggtactaacctccactgtaattaatcttaccgccacaaattccata
gtgatcctccttccctaaaactatagtcctctgggattctctgggctagttgaggattgctaccctgtgccttcaaccctgtgatgtgggatccca
gacttccctatctgttaactaaagggctgttttcaatcaaataattgttacgagaagcagactggcgcctgtagcactgctgttggagatccaa
ataggagattgggttgggaagtttttcccttgagtctctgctattttaatgtttaatttgcgctgtcgaggcgagtgtgtgtgttgcatctggacgcc
agggtttgcccaatctttgagtgtttggttaaatgttcaaactgtggcttcctcccggcgccagtcgcccgcctctgcccttaggttacattctctt
aaacatgcctttctcccccactctttcgcaggtgttcatgatttcttttattctttgcacaacaacaacaacaacaaattcacggaatcttttaagt
gctgaacttatttttcaaccatttcacaaggaggacaagttgaatggacctttttaaaaagaaaaaaaaaaatggaaggaaaactaagaat
gatcatcttcccagggtgttctcttacttggactgtgatattcgttatttatgaaaaagacttttaaatgccctttctgcagttggaaggttttctttata
tactattcccaccatggggagcgaaaacgttaaaatcacaaggaattgcccaatctaagcagactttgccttttttcaaaggtggagcgtga
ataccagaaggatccagtattcagtcacttaaatgaagtcttttggtcagaaattacctttttgacacaagcctactgaatgctgtgtatatattt
atatataaatatatctatttgagtgaaaccttgtgaactctttaattagagtttttcttgtatagtggcagagatgtctatttctgcattcaaaagtgta
atgatgtacttattcatgctaaactttttataaaagtttagttgtaaacttaaccctttttatacaaaataaatcaagtgtgtttattgaatggtgattgc
ctgctttatttcagaggaccagtgctttgatttttattatgctatgttataactgaacccaaataaatacaagttcaaatttatgtagactgtataag
attataataaaacatgtctgaagtcaa (서열 번호: 10)

도면11i

도 11(계속)

예시적인 TERT 유전자

접근 NM_198253: 인간

caggcagcgctgcgtcctgctgcgcacgtgggaagccctggccccggccaccccccgcgatgccgcgcgctccccgctgccgagccgt
gcgctccctgctgcgcagccactaccgcgaggtgctgccgctggccacgttcgtgcggcgcctggggccccagggctggcggctggtgc
agcgcggggacccggcggctttccgcgcgctggtggcccagtgcctggtgtgcgtgccctgggacgcacggccgccccccgccgcccc
ctccttccgccaggtgtcctgcctgaaggagctggtggcccgagtgctgcagaggctgtgcgagcgcggcgcgaagaacgtgctggcctt
cggcttcgcgctgctggacggggcccgcgggggcccccccgaggccttcaccaccagcgtgcgcagctacctgcccaacacggtgac
cgacgcactgcgggggagcgggggcgtgggggctgctgctgcgccgcgtgggcgacgacgtgctggttcacctgctggcacgctgcgcg
ctctttgtgctggtggctcccagctgcgcctaccaggtgtgcgggccgccgctgtaccagctcggcgctgccactcaggcccggccccgc
cacacgctagtggaccccgaaggcgtctgggatgcgaacgggcctggaaccatagcgtcagggaggccggggtcccctgggcctgc
cagccccgggtgcgaggaggcgcgggggcagtgccagccgaagtctgccgttgcccaagaggcccaggcgtggcgctgccctgag
ccggagcggacgcccgttgggcaggggtcctgggcccacccgggcaggacgcgtggaccgagtgaccgtggtttctgtgtggtgtcacc
tgccagacccgccgaagaagccacctctttggagggtgcgctctctggcacgcgccactcccacccatccgtgggccgccagcaccac
gcgggcccccccatccacatcgcggccaccacgtccctgggacacgccttgtcccccggtgtacgccgagaccaagcacttcctctactcc
tcaggcgacaaggagcagctgcggccctccttcctactcagctctctgaggcccagcctgactggcgctcggaggctcgtggagaccatc
tttctgggttccaggccctggatgccagggactccccgcaggttgccccgcctgccccagcgctactggcaaatgcggcccctgtttctgga
gctgcttgggaaccacgcgcagtgcccctacggggtgctcctcaagacgcactgcccgctgcgagctgcggtcaccccagcagccggt
gtctgtgcccgggagaagccccagggctctgtggcggcccccgaggaggaggacacagaccccgtcgcctggtgcagctgctccgc
cagcacagcagcccctggcaggtgtacggcttcgtgcgggcctgcctgcgccggctggtgcccccaggcctctggggctccaggcaca
acgaacgccgcttcctcaggaacaccaagaagttcatctccctggggaagcatgccaagctctcgctgcaggagctgacgtggaagatg
agcgtgcgggactgcgcttggctgcgcaggagcccaggggttggctgtgttccggccgcagagcaccgtctgcgtgaggagatcctggc
caagttcctgcactggctgatgagtgtgtacgtcgtcgagctgctcaggtctttcttttatgtcacggagaccacgtttcaaaagaacaggctct
ttttctaccggaagagtgtctggagcaagttgcaaagcattggaatcagacagcacttgaagagggtgcagctgcgggagctgtcggaag
cagaggtcaggcagcatcgggaagccaggcccgccctgctgacgtccagactccgcttcatccccaagcctgacgggctgcggccgat
tgtgaacatggactacgtcgtgggagccagaacgttccgcagagaaaagagggccgagcgtctcacctcgagggtgaaggcactgttc
agcgtgctcaactacgagcgggcgcggcgccccggcctcctgggcgcctctgtgctgggcctggacgatatccacagggcctggcgca
ccttcgtgctgcgtgtgcgggcccaggacccgccgcctgagctgtactttgtcaaggtggatgtgacgggcgcgtacgacaccatccccca
ggacaggctcacggaggtcatcgccagcatcatcaaaccccagaacacgtactgcgtgcgtcggtatgccgtggtccagaaggccgcc
catgggcacgtccgcaaggccttcaagagccacgtctctaccttgacagacctccagccgtacatgcgacagttcgtggctcacctgcag
gagaccagcccgctgagggatgccgtcgtcatcgagcagagctcctccctgaatgaggccagcagtggcctcttcgacgtcttcctacgct
tcatgtgccaccacgccgtgcgcatcaggggcaagtcctacgtccagtgccaggggatcccgcagggctccatcctctccacgctgctct
gcagcctgtgctacggcgacatggagaacaagctgtttgcggggattcggcgggacgggctgctcctgcgtttggtggatgatttcttgttgg
tgacacctcacctcacccacgcgaaaaccttcctcaggaccctggtccgaggtgtccctgagtatggctgcgtggtgaacttgcggaaga
cagtggtgaacttccctgtagaagacgaggccctgggtggcacggcttttgttcagatgccggcccacggcctattccctggtgcggcctg
ctgctggatacccggaccctggaggtgcagagcgactactccagctatgcccggacctccatcagagccagtctcaccttcaaccgcgg
cttcaaggctgggaggaacatgcgtcgcaaaactctttggggtcttgcggctgaagtgtcacagcctgtttctggatttgcaggtgaacagcct
ccagacggtgtgcaccaacatctacaagatcctcctgctgcaggcgtacaggtttcacgcatgtgtgctgcagctcccatttcatcagcaag
tttggaagaaccccacatttttcctgcgcgtcatctctgacacggcctccctctgctactccatcctgaaagccaagaacgcagggatgtcgc
tgggggccaagggcgccgccggccctctgccctccgaggccgtgcagtggctgtgccaccaagcattcctgctcaagctgactcgacac
cgtgtcacctacgtgccactcctggggtcactcaggacagcccagacgcagctgagtcggaagctcccggggacgacgctgactgccct
ggaggccgcagccaacccggcactgccctcagacttcaagaccatcctggactgatggccacccgcccacagccaggccgagagca
gacaccagcagccctgtcacgccgggctctacgtcccagggagggaggggcggcccacacccaggcccgcaccgctgggagtctga
ggcctgagtgagtgtttggccgaggcctgcatgtccggctgaaggctgagtgtccggctgaggcctgagcgagtgtccagccaagggctg
agtgtccagcacacctgccgtcttcacttccccacaggctggcgctcggctccaccccagggccagcttttcctcaccaggagcccggctt
ccactccccacataggaatagtccatccccagattcgccattgttcacccctcgccctgccctccttgccttccaccccccaccatccaggtg
gagaccctgagaaggaccctgggagctctgggaatttggagtgaccaaaggtgtgccctgtacacaggcgaggaccctgcacctggat
gggggtccctgtgggtcaaattgggggggaggtgctgtgggagtaaaatactgaatatatgagtttttcagttttgaaaaaaa (서열
번호: 11)

도면11j

도 11(계속)

예시적인 CCR2b 유전자

접근 NM_001123396: 인간

gttattctctggaacatgaaacattctgttgtgctcatatcatgcaaattatcactagtaggagagcagagagtggaaatgttccaggtataa
agacccacaagataaagaagctcagagtcgttagaaacaggagcagatgtacagggtttgcctgactcacactcaaggttgcataag
caagatttcaaaattaatcctattctggagacctcaacccaatgtacaatgttcctgactggaaaagaagaactatatttttctgatttttttttc
aaatctttaccattagttgccctgtatctccgccttcactttctgcaggaaactttatttcctacttctgcatgccaagtttctacctctagatctgttt
ggttcagttgctgagaagcctgacataccaggactgcctgagacaagccacaagctgaacagagaaagtggattgaacaaggacgc
atttccccagtacatccacaacatgctgtccacatctcgttctcggtttatcagaaatacccaacgagagcggtgaagaagtcaccacctttt
tgattatgattacggtgctccctgtcataaatttgacgtgaagcaaattggggcccaactcctgcctccgctctactcgctggtgttcatctttg
gttttgtgggcaacatgctggtcgtcctcatcttaataaactgcaaaaagctgaagtgcttgactgacatttacctgctcaacctggccatctc
tgatctgctttttcttattactctcccattgtgggctcactctgctgcaaatgagtgggtctttgggaatgcaatgtgcaaattattcacagggctgt
atcacatcggttatttggcggaatcttcttcatcatcctcctgacaatcgatagatacctggctattgtccatgctgtgtttgctttaaaagccag
gacggtcacctttggggtggtgacaagtgtgatcacctggttggtggctgtgtttgcttctgtcccaggaatcatctttactaaatgccagaaa
gaagattctgtttatgtctgtggcccttattttccacgaggatggaataatttccacacaataatgaggaacattttggggctggtcctgccgct
gctcatcatggtcatctgctactcgggaatcctgaaaaccctgcttcggtgtcgaaacgagaagaagaggcatagggcagtgagagtc
atcttcaccatcatgattgtttactttctcttctggactccctataatattgtcattctcctgaacaccttccaggaattcttcggcctgagtaactgt
gaaagcaccagtcaactggaccaagccacgcaggtgacagagactcttgggatgactcactgctgcatcaatcccatcatctatgcctt
cgttggggagaagttcagaaggtatctctcggtgttcttccgaaagcacatcaccaagcgcttctgcaaacaatgtccagttttctacaggg
agacagtggatggagtgacttcaacaaacacgccttccactggggagcaggaagtctcggctggtttataaaacgaggagcagtttgat
tgttgtttataaagggagataacaatctgtatataacaacaaacttcaagggtttgttgaacaatagaaacctgtaaagcaggtgcccagg
aacctcagggctgtgtgtactaatacagactatgtcacccaatgcatatccaacatgtgctcagggaataatccagaaaaactgtgggta
gagactttgactctccagaaagctcatctcagctcctgaaaaatgcctcattaccttgtgctaatcctctttttctagtcttcataatttcttcactc
aatctctgattctgtcaatgtcttgaaatcaagggccagctggaggtgaagaagagaatgtgacaggcacagatgaatgggagtgagg
gatagtggggtcagggctgagaggagaaggagggagacatgagcatggctgagcctggacaaagacaaaggtgagcaaagggc
tcacgcattcagccaggagatgatactggtccttagccccatctgccacgtgtatttaaccttgaagggttcaccaggtcagggagagtttg
ggaactgcaataacctgggagttttggtggagtccgatgattctctttgcataagtgcatgacatatttttgctttattacagtttatctatggcac
ccatgcaccttacatttgaaatctatgaaatatcatgctccattgttcagatgcttcttaggccacatccccctgtctaaaaattcagaaaatttt
tgtttataaaaga (서열 번호: 12)

도면11k

도 11(계속)

예시적인 CCR4 유전자

접근 NM_005508: 인간

tctcacaggaagccacgcacccttgaaaggcaccgggtccttcttagcatcgtgcttcctgagcaagcctggcattgcctcacagaccttcctc
agagccgctttcagaaaagcaagctgcttctggttgggcccagacctgccttgaggagcctgtagagttaaaaaatgaaccccacggatata
gcagacaccaccctcgatgaaagcatatacagcaattactatctgtatgaaagtatccccaagccttgcaccaaagaaggcatcaaggcatt
tggggagctcttcctgcccccactgtattccttggtttttgtatttggtctgcttggaaattctgtggtggttctggtcctgttcaaatacaagcggctcag
gtccatgactgatgtgtacctgctcaaccttgccatctcggatctgctcttcgtgttttccctccctttttggggctactatgcagcagaccagtgggtttt
tgggctaggtctgtgcaagatgatttcctggatgtacttggtgggcttttacagtggcatattctttgtcatgctcatgagcattgatagatacctggca
attgtgcacgcggtgttttccttgagggcaaggaccttgacttatggggtcatcaccagtttggctacatggtcagtggctgtgttcgcctcccttcct
ggctttctgttcagcacttgttatactgagcgcaaccatacctactgcaaaaccaagtactctctcaactccacgacgtggaaggttctcagctcc
ctggaaatcaacattctcggattggtgatcccctagggatcatgctgttttgctactccatgatcatcaggaccttgcagcattgtaaaaatgaga
agaagaacaaggcggtgaagatgatctttgccgtggtggtcctcttccttgggttctggacaccttacaacatagtgctcttcctagagaccctgg
tggagctagaagtccttcaggactgcaccttttgaaagatacttggactatgccatccaggccacagaaactctggcttttgttcactgctgccttaa
tcccatcatctactttttctgggggagaaatttcgcaagtacatcctacagctcttcaaaacctgcaggggccttttgtgctctgccaatactgtgg
gctcctccaaatttactctgctgacaccccagctcatcttacacgcagtccaccatggatcatgatctccatgatgctctgtagaaaaatgaaat
ggtgaaatgcagagtcaatgaactttccacattcagagcttacttaaaattgtattttagtaagagattcctgagccagtgtcaggaggaaggctt
acacccacagtggaaagacagcttctcatcctgcaggcagcttttctctcccactagacaagtccagcctggcaagggttcacctgggctga
ggcatccttcctcacaccaggcttgcctgcaggcatgagtcagtctgatgagaactctgagcagtgcttgaatgaagttgtaggtaatattgcaa
ggcaaagactattcccttctaacctgaactgatgggtttctccagagggaattgcagagtactggctgatggagtaaatcgctacctttttgctgtgg
caaatgggccctct (서열 번호: 13)

도면11l

도 11(계속)

항-CD19 scFv (VH-VL) FMC63

Cacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagctgccgggccagccaggacat
cagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgt
gcccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatcgccacctacttttt
gccagcagggcaacacactgccctacacctttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcct
ggcagcggcgagggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggcccccagccagagcctgagc
gtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaagggcctggaatggctg
ggcgtgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaagagcc
aggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgc
catggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcag (서열 번호: 28)

항-CD19 scFv (VH-VL) FMC63

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGS
GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQ
ESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIK
DNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (서열 번호: 29)

CD28 이펙터 도메인

cggagcaagcggagcagaggcggccacagcgactacatgaacatgacccccagacggcctggccccacccggaagcactacc
agccctacgccccacccagggactttgccgcctacagaagc (서열 번호: 36)

도면11m

도 11(계속)

P28z CAR

Gtggcctcaccgttgacccgctttctgtcgctgaacctgctgctgctgggtgagtcgattatcctggggagtggagaagctgaggtgcag
ctgcagcagtcaggacctgaactggtgaagcctgggacttcagtgaggatatcctgcaagacttctggatacacattcactgaatatacc
atacactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggaaacatcaatcctaacaatggtggtaccacctacaatcag
aagttcgaggacaaggccacattgactgtagacaagtcctccagtacagcctacatggagctccgcagcctaacatctgaggattctg
cagtctattattgtgcagctggttggaactttgactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggaggtggatcaggtg
gaggtggatctggtggaggtggatctgacattgtgatgacccagtctcacaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcatc
atctgtaaggccagtcaagatgtgggtactgctgtagactggtatcaacagaaaccaggacaatctcctaaactactgatttattgggcat
ccactcggcacactggagtccctgatcgcttcacaggcagtggatctgggacagacttcactctcaccattactaatgttcagtctgaaga
cttggcagattatttctgtcagcaatatatacagctatcccctcacgttcggtgctgggaccatgctggacctgaaacgggcggccgcatct
actactaccaagccagtgctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagaccagaagattgtcggccc
cgtggctcagtgaaggggaccggattggacttcgcctgtgatatttacatctgggcacccttggccggaatctgcgtggcccttctgctgtc
cttgatcatcactctcatctgctacaatagtagaaggaacagactccttcaaagtgactacatgaacatgactccccggaggcctgggct
cactcgaaagccttaccagccctacgcccctgccagagactttgcagcgtaccgccccagagcaaaattcagcaggagtgcagaga
ctgctgccaacctgcaggaccccaaccagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttggagaagaag
cgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggaggaaccccccaggaaggcgtatacaatgcactgcagaaag
acaagatggcagaagcctacagtgagatcggcacaaaaggcgagaggcggagaggcaaggggcacgatggcctttaccagggt
ctcagcactgccaccaaggacacctatgatgccctgcatatgcagaccctggcccctcgctaa (서열 번호: 37)

도면11n

도 11(계속)

IgG4-Fc
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열 번호: 39)

경첩-CH2-CH3
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열 번호: 40)

경첩-CH3
ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
(서열 번호: 41)

경첩 단독
ESKYGPPCPPCP (서열 번호: 42)

CD28 막통과 도메인
MFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (서열 번호: 43)

CD28 세포질 도메인 (LL에서 GG로)
RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (서열 번호: 44)

4-1BB 세포질 도메인
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열 번호: 45)

CD3-ζ 세포질 도메인
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호:
46)

도면11o

도 11(계속)

T2A
LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR (서열 번호: 47)

tEGFR
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGD
SFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTQHGQFSLAVVSLNITS
LGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP
EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGR
GPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGC
PTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (서열 번호: 48)

Strep 태그 II
WSHPQFEK (서열 번호: 49)

Myc 태그
EQKLISEEDL (서열 번호: 50)

V5 태그
GKPIPNPLLGLDST (서열 번호: 51)

FLAG 태그
DYKDDDDK (서열 번호: 52)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER

<120> COMPOSITIONS AND METHODS TO PROGRAM THERAPEUTIC CELLS

<130> F053-0046PCT

<150> US 62/442,890

<151> 2017-01-05

<150> US 62/322,581

<151> 2016-04-14

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 887

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> megaTAL protein specific for TCRalpha

<400> 1

Met Gly Ser Cys Arg Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Pro Pro
1 5 10 15

Lys Lys Lys Arg Lys Val Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln
20 25 30

Gln Gln Gln Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln
35 40 45

His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val
50 55 60

Ala Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Thr Tyr
65 70 75 80

Gln His Ile Ile Thr Ala Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Asp Ile Val
85 90 95

Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu
100 105 110

Thr Asp Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly
115 120 125

Gln Leu Val Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala
130 135 140

Val His Ala Ser Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr
145 150 155 160

Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
165 170 175

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly
180 185 190

Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
195 200 205

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp
210 215 220

His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
225 230 235 240

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

245 250 255

Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

260 265 270

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

275 280 285

Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala

290 295 300

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

305 310 315 320

Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala

325 330 335

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

340 345 350

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val

355 360 365

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

370 375 380

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr

420 425 430

Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala

435 440 445

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly

450 455 460

Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

465 470 475 480

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp

485 490 495

His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
500 505 510
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp
515 520 525

Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys
530 535 540
Leu Gly Gly Arg Pro Ala Met Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His
545 550 555 560
Ala Pro Glu Leu Ile Arg Arg Val Asn Arg Arg Ile Gly Glu Arg Thr
565 570 575
Ser His Arg Val Ala Ile Ser Arg Val Gly Gly Ser Ser Arg Arg Glu
580 585 590

Ser Ile Asn Pro Trp Ile Leu Thr Gly Phe Ala Asp Ala Glu Gly Ser
595 600 605
Phe Ile Leu Asp Ile Arg Asn Arg Asn Asn Glu Ser Asn Arg Tyr Arg
610 615 620
Thr Ser Leu Arg Phe Gln Ile Thr Leu His Asn Lys Asp Lys Ser Ile
625 630 635 640
Leu Glu Asn Ile Gln Ser Thr Trp Lys Val Gly Lys Ile Thr Asn Ser
645 650 655

Gly Asp Arg Ala Val Met Leu Arg Val Thr Arg Phe Glu Asp Leu Lys
660 665 670
Val Ile Ile Asp His Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Ile Thr Gln Lys Leu
675 680 685
Gly Asp Tyr Lys Leu Phe Lys Gln Ala Phe Ser Val Met Glu Asn Lys
690 695 700
Glu His Leu Lys Glu Asn Gly Ile Lys Glu Leu Val Arg Ile Lys Ala
705 710 715 720

Lys Met Asn Trp Gly Leu Thr Asp Glu Leu Lys Lys Ala Phe Pro Glu
725 730 735
Asn Ile Ser Lys Glu Arg Pro Leu Ile Asn Lys Asn Ile Pro Asn Phe

740 745 750

Lys Trp Leu Ala Gly Phe Thr Ser Gly Asp Gly Tyr Phe Gly Val Asn

755 760 765

Leu Lys Lys Val Lys Gly Asn Ala Lys Val Tyr Val Gly Leu Arg Phe

770 775 780

Ser Ile Ser Gln His Ile Arg Asp Lys Asn Leu Met Asn Ser Leu Ile

785 790 795 800

Thr Tyr Leu Gly Cys Gly Ser Ile Trp Glu Lys Asn Lys Ser Glu Phe

805 810 815

Ser Trp Leu Glu Phe Val Val Thr Lys Phe Ser Asp Ile Asn Asp Lys

820 825 830

Ile Ile Pro Val Phe Gln Glu Asn Thr Leu Ile Gly Val Lys Leu Glu

835 840 845

Asp Phe Glu Asp Trp Cys Lys Val Ala Lys Leu Ile Glu Glu Lys Lys

850 855 860

His Leu Thr Glu Ser Gly Leu Asp Glu Ile Lys Lys Ile Lys Leu Asn

865 870 875 880

Met Asn Lys Gly Arg Val Phe

885

<210> 2

<211> 2464

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

actctaaaac gagaagtaca agtgagttcc cccaaggggt cggccgcgcc tcttcctgtc 60

cccgccctgc cggctgcccc aggccagtgg agtggcagcc ccagaactgg gaccaccggg 120

ggtggtgagg cggcccggca ctgggagctg catctgaggc ttagtccctg agctctctgc 180

ctgcccagac tagctgcacc tcctcattcc ctgcgccccc ttcctctccg gaagccccca 240

ggatggtgag gtggtttcac cgagacctca gtgggctgga tgcagagacc ctgctcaagg 300

gccgaggtgt ccacggtagc ttcctggctc ggcccagtcg caagaaccag ggtgacttct 360

cgctctccgt cagggtgggg gatcaggtga cccatattcg gatccagaac tcaggggatt 420

tctatgacct gtatggaggg gagaagtttg cgactctgac agagctggtg gagtactaca 480

ctcagcagca gggtgtcctg caggaccgcg acggcaccat catccacctc aagtacccgc 540

tgaactgctc cgatcccact agtgagaggt ggtaccatgg ccacatgtct ggcgggcagg 600

cagagacgct gctgcaggcc aagggcgagc cctggacgtt tcttgtgcgt gagagcctca 660

gccagcctgg agacttcgtg ctttctgtgc tcagtgacca gcccaaggct ggcccaggct 720

ccccgctcag ggtcacccac atcaaggtca tgtgcgaggg tggacgctac acagtgggtg 780

gtttggagac cttcgacagc ctcacggacc tggtggagca tttcaagaag acggggattg 840

aggaggcctc aggcgccttt gtctacctgc ggcagccgta ctatgccacg agggtgaatg 900

cggctgacat tgagaaccga gtgttggaac tgaacaagaa gcaggagtcc gaggatacag 960

ccaaggctgg cttctgggag gagtttgaga gtttgcagaa gcaggaggtg aagaacttgc 1020

accagcgtct ggaagggcag cggccagaga acaagggcaa gaaccgctac aagaacattc 1080

tccccttga ccacagccga gtgatcctgc agggacggga cagtaacatc cccgggtccg 1140

actacatcaa tgccaactac atcaagaacc agctgctagg ccctgatgag aacgctaaga 1200

cctacatcgc cagccagggc tgtctggagg ccacggtcaa tgacttctgg cagatggcgt 1260

ggcaggagaa cagccgtgtc atcgtcatga ccacccgaga ggtggagaaa ggccggaaca 1320

aatgcgtccc atactggccc gaggtgggca tgcagcgtgc ttatgggccc tactctgtga 1380

ccaactgcgg ggagcatgac acaaccgaat acaaactccg taccttacag gtctccccgc 1440

tggacaatgg agacctgatt cgggagatct ggcattacca gtacctgagc tggcccgacc 1500

atggggtccc cagtgagcct gggggtgtcc tcagcttcct ggaccagatc aaccagcggc 1560

aggaaagtct gcctcacgca gggcccatca tcgtgcactg cagcgccggc atcggccgca 1620

caggcaccat cattgtcatc gacatgctca tggagaacat ctccaccaag ggcctggact 1680

gtgacattga catccagaag accatccaga tggtgcgggc gcagcgctcg ggcatggtgc 1740

agacggaggc gcagtacaag ttcatctacg tggccatcgc ccagttcatt gaaaccacta 1800

agaagaagct ggaggtcctg cagtcgcaga agggccagga gtcggagtac gggaacatca 1860

cctatccccc agccatgaag aatgcccatg ccaaggcctc ccgcacctcg tccaagagct 1920

tggagtctag tgcagggacc gtggctgcgt cacctgtgag acggggtggc cagaggggac 1980

tgccagtgcc gggtcccccc gtgctgtctc ctgacctgca ccaactgcct gtacttgccc 2040

ccctgcaccc ggctgcagac acaaggagga tgtgtatgag aacctgcaca ctaagaacaa 2100

gagggaggag aaagtgaaga agcagcggtc agcagacaag gagaagagca agggttccct 2160

caagaggaag tgagcggtgc tgtcctcagg tggccatgcc tcagccctga ccctgtggaa 2220

gcatttcgcg atggacagac tcacaacctg aacctaggag tgccccattc ttttgtaatt 2280

taaatggctg catccccccc acctctccct gaccctgtat atagcccagc caggccccag 2340

gcagggccaa cccttctcct cttgtaaata aagccctggg atcactgtga aaaaaaaaaa 2400

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460

aaaa 2464

<210> 3

<211> 867

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180

gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480

aggccagccg gccagttcca aaccctggtg gttggtgtcg tgggcggcct gctgggcagc 540

ctggtgctgc tagtctgggt cctggccgtc atctgctccc gggccgcacg agggacaata 600

ggagccaggc gcaccggcca gcccctgaag gaggaccccct cagccgtgcc tgtgttctct 660

gtggactatg gggagctgga tttccagtgg cgagagaaga ccccggagcc ccccgtgccc 720

tgtgtccctg agcagacgga gtatgccacc attgtctttc ctagcggaat gggcacctca 780

tcccccgccc gcaggggctc agctgacggc cctcggagtg cccagccact gaggcctgag 840

gatggacact gctcttggcc cctctga 867

<210> 4

<211> 420

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgacatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga 60

gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgttatc 120

aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgga 180

aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaatgtgg gcgaaaagaa agaccaacga 240

attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa 300

cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcaagtagga aggactctgg gggttaccag 360

aaagttacct ttggaactgg aacaaagctc caagtcatcc caaatatcca gaaccctgac 420

<210> 5

<211> 1027

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ttggattatc aagtgtcaag tccaatctat gacatcaatt attatacatc ggagccctgc 60

caaaaaatca atgtgaagca aatcgcagcc cgcctcctgc ctccgctcta ctcactggtg 120

ttcatctttg gttttgtggg caacatgctg gtcatcctca tcctgataaa ctgcaaaagg 180

ctgaagagca tgactgacat ctacctgctc aacctggcca tctctgacct gtttttcctt 240

cttactgtcc ccttctgggc tcactatgct gccgcccagt gggactttgg aaatacaatg 300

tgtcaactct tgacagggct ctattttata ggcttcttct ctggaatctt cttcatcatc 360

ctcctgacaa tcgataggta cctggctgtc gtccatgctg tgtttgcttt aaaagccagg 420

acggtcacct ttggggtggt gacaagtgtg atcacttggg tggtggctgt gtttgcgtct 480

ctcccaggaa tcatctttac cagatctcaa aaagaaggtc ttcattacac ctgcagctct 540

cattttccat acattaaaga tagtcatctt ggggctggtc ctgccgctgc ttgtcatggt 600

catctgctac tcgggaatcc taaaaactct gcttcggtgt cgaaatgaga agaagaggca 660

cagggctgtg aggcttatct tcaccatcat gattgtttat tttctcttct gggctcccta 720

caacattgtc cttctcctga acaccttcca ggaattcttt ggcctgaata attgcagtag 780

ctctaacagg ttggaccaag ctatgcaggt gacagagact cttgggatga cgcactgctg 840

catcaacccc atcatctatg cctttgtcgg ggagaagttc agaaactacc tcttagtctt 900

cttccaaaag cacattgcca aacgcttctg caaatgctgt tctattttcc agcaagaggc 960

tcccgagcga gcaagctcag tttacacccg atccactggg gagcaggaaa tatctgtggg 1020

cttgtga 1027

<210> 6

<211> 1912

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ttttttttct tccctctagt gggcggggca gaggagttag ccaagatgtg actttgaaac 60

cctcagcgtc tcagtgccct tttgttctaa acaaagaatt ttgtaattgg ttctaccaaa 120

gaaggatata atgaagtcac tatgggaaaa gatggggagg agagttgtag gattctacat 180

taattctctt gtgcccttag cccactactt cagaatttcc tgaagaaagc aagcctgaat 240

tggtttttta aattgcttta aaaatttttt ttaactgggt taatgcttgc tgaattggaa 300

gtgaatgtcc attcctttgc ctcttttgca gatatacact tcagataact acaccgagga 360

aatgggctca ggggactatg actccatgaa ggaaccctgt ttccgtgaag aaaatgctaa 420

tttcaataaa atcttcctgc ccaccatcta ctccatcatc ttcttaactg gcattgtggg 480

caatggattg gtcatcctgg tcatgggtta ccagaagaaa ctgagaagca tgacggacaa 540

gtacaggctg cacctgtcag tggccgacct cctctttgtc atcacgcttc ccttctgggc 600

agttgatgcc gtggcaaact ggtactttgg gaacttccta tgcaaggcag tccatgtcat 660

ctacacagtc aacctctaca gcagtgtcct catcctggcc ttcatcagtc tggaccgcta 720

cctggccatc gtccacgcca ccaacagtca gaggccaagg aagctgttgg ctgaaaaggt 780

ggtctatgtt ggcgtctgga tccctgccct cctgctgact attcccgact tcatctttgc 840

caacgtcagt gaggcagatg acagatatat ctgtgaccgc ttctacccca atgacttgtg 900

ggtggttgtg ttccagtttc agcacatcat ggttggcctt atcctgcctg gtattgtcat 960

cctgtcctgc tattgcatta tcatctccaa gctgtcacac tccaagggcc accagaagcg 1020

caaggccctc aagaccacag tcatcctcat cctggctttc ttcgcctgtt ggctgcctta 1080

ctacattggg atcagcatcg actccttcat cctcctggaa atcatcaagc aagggtgtga 1140

gtttgagaac actgtgcaca agtggatttc catcaccgag gccctagctt tcttccactg 1200

ttgtctgaac cccatcctct atgctttcct tggagccaaa tttaaaacct ctgcccagca 1260

cgcactcacc tctgtgagca gagggtccag cctcaagatc ctctccaaag gaaagcgagg 1320

tggacattca tctgtttcca ctgagtctga gtcttcaagt tttcactcca gctaacacag 1380

atgtaaaaga ctttttttta tacgataaat aacttttttt taagttacac atttttcaga 1440

tataaaagac tgaccaatat tgtacagttt ttattgcttg ttggattttt gtcttgtgtt 1500

tctttagttt ttgtgaagtt taattgactt atttatataa atttttttg tttcatattg 1560

atgtgtgtct aggcaggacc tgtggccaag ttcttagttg ctgtatgtct cgtggtagga 1620

ctgtagaaaa gggaactgaa cattccagag cgtgtagtga atcacgtaaa gctagaaatg 1680

atccccagct gtttatgcat agataatctc tccattcccg tggaacgttt ttcctgttct 1740

taagacgtga ttttgctgta gaagatggca cttataacca aagcccaaag tggtatagaa 1800

atgctggttt ttcagttttc aggagtgggt tgatttcagc acctacagtg tacagtcttg 1860

tattaagttg ttaataaaag tacatgttaa acttaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1912

<210> 7

<211> 2413

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ttccgtcctt ccgtccgcgg ccctgtcagc tggagcgcgg cgcaggctct gccccggccc 60

ggcggctctg gccggccgtc cagtccgtgc ggcggacccc gaggagcctc gatgtggatg 120

gccccgcgaa gttaagttct gggctcgcgc ttccactccg ccgcgccttc ctcccagttt 180

ccgtccgctc gccgcaccgg cttcgttccc ccaaatctcg gaccgtccct tcgcgccccc 240

tccccgtccg cccccagtgc tgcgttctcc ccctcttggc tctcctgcgg ctgggggagg 300

ggcgggggtc accatggccg aggcgcctca ggtggtggag atcgacccgg acttcgagcc 360

gctgccccgg ccgcgctcgt gcacctggcc gctgcccagg ccggagttta gccagtccaa 420

ctcggccacc tccagcccgg cgccgtcggg cagcgcggct gccaaccccg acgccgcggc 480

gggcctgccc tcggcctcgg ctgccgctgt cagcgccgac ttcatgagca acctgagctt 540

gctggaggag agcgaggact tcccgcaggc gcccggctcc gtggcggcgg cggtggcggc 600

ggcggccgcc gcggccgcca ccgggggggct gtgcggggac ttccagggcc cggaggcggg 660

ctgcctgcac ccagcgccac cgcagccccc gccgcccggg ccgctgtcgc agcacccgcc 720

ggtgcccccc gccgccgctg ggccgctcgc ggggcagccg cgcaagagca gctcgtcccg 780

ccgcaacgcg tggggcaacc tgtcctacgc cgacctcatc accaaggcca tcgagagctc 840

ggcggagaag cggctcacgc tgtcgcagat ctacgagtgg atggtcaaga gcgtgcccta 900

cttcaaggat aagggtgaca gcaacagctc ggcgggctgg aagaattcaa ttcgtcataa 960

tctgtcccta cacagcaagt tcattcgtgt gcagaatgaa ggaactggaa aaagttcttg 1020

gtggatgctc aatccagagg gtggcaagag cgggaaatct cctaggagaa gagctgcatc 1080

catggacaac aacagtaaat ttgctaagag ccgaagccga gctgccaaga agaaagcatc 1140

tctccagtct ggccaggagg gtgctgggga cagccctgga tcacagtttt ccaaatggcc 1200

tgcaagccct ggctctcaca gcaatgatga ctttgataac tggagtacat ttcgccctcg 1260

aactagctca aatgctagta ctattagtgg gagactctca cccattatga ccgaacagga 1320

tgatcttgga gaaggggatg tgcattctat ggtgtacccg ccatctgccg caaagatggc 1380

ctctacttta cccagtctgt ctgagataag caatcccgaa aacatggaaa atcttttgga 1440

taatctcaac cttctctcat caccaacatc attaactgtt tcgacccagt cctcacctgg 1500

caccatgatg cagcagacgc cgtgctactc gtttgcgcca ccaaacacca gtttgaattc 1560

acccagccca aactaccaaa aatatacata tggccaatcc agcatgagcc ctttgcccca 1620

gatgcctata caaacacttc aggacaataa gtcgagttat ggaggtatga gtcagtataa 1680

ctgtgcgcct ggactcttga aggagttgct gacttctgac tctcctcccc ataatgacat 1740

tatgacacca gttgatcctg gggtagccca gcccaacagc cgggttctgg gccagaacgt 1800

catgatgggc cctaattcgg tcatgtcaac ctatggcagc caggcatctc ataacaaaat 1860

gatgaatccc agctcccata cccaccctgg acatgctcag cagacatctg cagttaacgg 1920

gcgtcccctg ccccacacgg taagcaccat gccccacacc tcgggtatga accgcctgac 1980

ccaagtgaag acacctgtac aagtgcctct gccccacccc atgcagatga gtgccctggg 2040

gggctactcc tccgtgagca gctgcaatgg ctatggcaga atgggccttc tccaccagga 2100

gaagctccca agtgacttgg atggcatgtt cattgagcgc ttagactgtg acatggaatc 2160

catcattcgg aatgacctca tggatggaga tacattggat tttaactttg acaatgtgtt 2220

gcccaaccaa agcttcccac acagtgtcaa gacaacgaca catagctggg tgtcaggctg 2280

agggttagtg agcaggttac acttaaaagt acttcagatt gtctgacagc aggaactgag 2340

agaagcagtc caaagatgtc tttcaccaac tccctttag ttttctcggt taaaaaaaaa 2400

aaaaaaaaaa aaa 2413

<210> 8

<211> 3286

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gcgtgtcggg cgcggaaggg ggaggcggcc cggggcgccc gcgagtgagg cgcggggcgg 60

cgaagggagc gcgggtggcg gcacttgctg ccgcggcctt ggatgggctg ggcccccctc 120

gccgctccgc ctcctccaca cgcgcggcgg ccgcggcgag ggggacgcgc cgcccggggc 180

ccggcacctt cgggaacccc ccggcccgga gcctgcggcc tgcgccgcct cggccgccgg 240

gagccccgtg gagcccccgc cgccgcgccg ccccgcggac cggacgctga gggcactcgg 300

ggcggggcgc gcgctcgggc agacgtttgc ggggaggggg gcgcctgccg ggccccggcg 360

accaccttgg gggtcgcggg ccggctcggg gggcgcccag tgcgggccct cgcgggcgcc 420

gggcagcgac cagccctgag cggagctgtt ggccgcggcg ggaggcctcc cggacgcccc 480

cagccccccg aacgctcgcc cgggccggcg ggagtcggcg ccccccggga ggtccgctcg 540

gtcgtccgcg gcggagcgtt tgctcctggg acaggcggtg ggaccggggc gtcgccggag 600

acgcccccag cgaagttggg ctctccaggt gtgggggtcc cgggggggtag cgacgtcgcg 660

gacccggcct gtgggatggg cggcccggag aagactgcgc tcggccgtgt tcatacttgt 720

ccgtgggcct gaggtccccg gaggatgacc tagcactgaa aagccccggc cggcctcccc 780

agggtccccg aggacgaagt tgaccctgac cgggccgtct cccagttctg aggcccgggt 840

cccactggaa ctcgcgtctg agccgccgtc ccggaccccc ggtgcccgcc ggtccgcaga 900

ccctgcaccg ggcttggact cgcagccggg actgacgtgt agaacaatcg tttctgttgg 960

aagaagggtt tttcccttcc ttttggggtt tttgttgcct ttttttttttc ttttttcttt 1020

gtaaaatttt ggagaaggga agtcggaaca caaggaagga ccgctcaccc gcggactcag 1080

ggctggcggc gggactccag gaccctgggt ccagcatgga ggtggtggac ccgcagcagc 1140

tgggcatgtt cacggagggc gagctgatgt cggtgggtat ggacacgttc atccaccgca 1200

tcgactccac cgaggtcatc taccagccgc gccgcaagcg ggccaagctc atcggcaagt 1260

acctgatggg ggacctgctg ggggaaggct cttacggcaa ggtgaaggag gtgctggact 1320

cggagacgct gtgcaggagg gccgtcaaga tcctcaagaa gaagaagttg cgaaggatcc 1380

ccaacgggga ggccaacgtg aagaaggaaa ttcaactact gaggaggtta cggcacaaaa 1440

atgtcatcca gctggtggat gtgttataca acgaagagaa gcagaaaatg tatatggtga 1500

tggagtactg cgtgtgtggc atgcaggaaa tgctggacag cgtgccggag aagcgtttcc 1560

cagtgtgcca ggcccacggg tacttctgtc agctgattga cggcctggag tacctgcata 1620

gccagggcat tgtgcacaag gacatcaagc cggggaacct gctgctcacc accggtggca 1680

ccctcaaaat ctccgacctg ggcgtggccg aggcactgca cccgttcgcg gcggacgaca 1740

cctgccggac cagccagggc tccccggctt tccagccgcc cgagattgcc aacggcctgg 1800

acaccttctc cggcttcaag gtggacatct ggtcggctgg ggtcaccctc tacaacatca 1860

ccacgggtct gtaccccttc gaaggggaca acatctacaa gttgtttgag aacatcggga 1920

aggggagcta cgccatcccg ggcgactgtg gccccccgct ctctgacctg ctgaaaggga 1980

tgcttgagta cgaaccggcc aagaggttct ccatccggca gatccggcag cacagctggt 2040

tccggaagaa acatcctccg gctgaagcac cagtgcccat cccaccgagc ccagacacca 2100

aggaccggtg gcgcagcatg actgtggtgc cgtacttgga ggacctgcac ggcgcggacg 2160

aggacgagga cctcttcgac atcgaggatg acatcatcta cactcaggac ttcacggtgc 2220

ccggacaggt cccagaagag gaggccagtc acaatggaca gcgccggggc ctccccaagg 2280
ccgtgtgtat gaacggcaca gaggcggcgc agctgagcac caaatccagg gcggagggcc 2340
gggcccccaa ccctgcccgc aaggcctgct ccgccagcag caagatccgc cggctgtcgg 2400
cctgcaagca gcagtgaggc tggccgcctg cagcccgtgt ccaggagccc cgccaggtgc 2460
ccgcgccagg ccctcagtct tcctgccggt tccgcccgcc ctcccggaga ggtggccgcc 2520
atgcttctgt gccgaccacg ccccaggacc tccggagcgc cctgcagggc cgggcagggg 2580
gacagcaggg accgggcgca gccctccccc ctcggccgcc cggcagtgca cgcggcttgt 2640

tgacttcgca gccccgggcg gagccttccc gggcgggcgt gggaggaggg aggcggcctc 2700
catgcacttt atgtggagac tactggcccc gcccgtggcc tcgtgctccg cagggcgccc 2760
agcgccgtcc ggcggccccg ccgcagacca gctggcgggt gtggagacca ggctcctgac 2820
cccgccatgc atgcagcgcc acctggaagc cgcgcggccg ctttggtttt ttgtttggtt 2880
ggttccattt tctttttttc ttttttttt taagaaaaaa taaaaggtgg atttgagctg 2940
tggctgtgag gggtgtttgg gagctgctgg gtggcagggg ggctgtgggg tcgggctcac 3000
gtcgcggccg cctttgcgct ctcgggtcac cctgctttgg cggcccggcc ggagggcagg 3060

accctcacct ctcccccaag gccactgcgc tcttgggacc ccagagaaaa cccggagcaa 3120
gcaggagtgt gcggtcaata tttatatcat ccagaaaaga aaaacacgag aaacgccatc 3180
gcgggatggt gcagacgcgg cggggactcg gagggtgccg tgcgggcgag gccgcccaaa 3240
tttggcaata aataaagctt gggaagcttg gacctgaaaa aaaaaa 3286

<210> 9
<211> 6767
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9

aagtttccaa gtggtcaact tgaccgatgc tttggcaatt gaaaaagggc agaaaggcgc 60
gggctagtgg gtggatgggg acaaagatct aagtcacctt cttccagcgt gtgagcctgg 120

gaggagggtg ggggtcctga ggagcaagag gtacgaggaa ggaaaaggag agggcttctg 180
ggttagtttc cacctcctgc tttccaactc acggcgcttt ccttccggaa aggacgctgg 240
attcagggcg cgccagtacg cgcagtagcg gcccgcgagt cggcaggtgg gtagccccgg 300
cgcgggagga aggggaagtt accttcccct cggaagaggg cgctggctcc cccatcctgc 360
ctttataata aggccaccgg aggagaggaa gcagccagct gccgtctgcg ctttgcaaag 420

catgcagtta ggggagcagc tcttggtgag ctcagtgaac ctgcctggcg cgcacttcta 480

cccgctggag agtgcgcgag gcggcagcgg cgggagcgct ggccacctcc ccagcgcggc 540

cccctctcct cagaagttgg acttagacaa agcgtccaag aagttttccg gcagtctctc 600

ctgcgaggcg gtgagcgggg agcccgcagc cgccagcgca ggggcccccg cggccatgct 660

tagtgacacc gacgccgggg acgcatttgc cagcgctgcg gcagtggcca agccggggcc 720

cccggacggc cgcaagggct ccccctgcgg ggaggaggag ctgccctccg ccgctgcagc 780

cgccgccgcc gccgccgccg cggctgcggc cactgcgcgc tactccatgg acagcctgag 840

ctccgagcgg tactacctcc agtcccccgg tcctcagggg tcggagctgg ctgcgccctg 900

ctcactcttc ccgtaccagg cggcggctgg ggcgccccac ggacctgtgt acccggctcc 960

taacggggcg cgctaccect acggctccat gctgcccccc ggcggcttcc ccgcggctgt 1020

gtgcccaccc gggagggcgc agttcggccc aggagccggt gcgggcagtg gcgcgggcgg 1080

tagcagcggc gggggcggcg gcccgggcac ctatcagtac agccaggggg ctccgctcta 1140

cgggccgtac cctggagccg cagcggcggg atcttgcgga ggactggggg gcctgggggt 1200

tccaggttct ggcttccgtg cccacgtcta cctgtgcaac cggcctctgt ggctcaaatt 1260

ccaccgccac caaactgaga tgatcattac gaaacagggc aggtgagcgc agcgtggagg 1320

ggcccctggg ttcggggata aagggtgacg tgtggtcctg gggaaggtcc gggatgaggg 1380

agctgaaccc agttgttccg cgcggtgctt agagtgtttc accgcgcgca ataaatctcc 1440

gtagacaccg catctccaat gcggtgtccc tctgtgtcag tgccccggcg gctcttgcag 1500

ggtgccaatg ttacggctgt acaccgcttt tccctcccat catcctcacc tgaacagacc 1560

tggaggaggc ggaaatggaa attagggcat gtccacaagc tggattcgtt agatcctcct 1620

gctcggcggt atgcttgtgc atgcctgcat gccggcaagg agccacggat agggaaggct 1680

caagagctgg ccacctgagc gcagtagatg ggctcccgca gttttaggcg ccagggtctc 1740

cacggggcgt ctccgggagg tgggcatgaa ggctagagcg ccggcctcgg aagctcggtc 1800

ggagtaggtg gttagatctg ccctggagcc agacctggct cgggttcggt gcgcgagaaa 1860

gttctgatat acatccaact gctaacactg gctacttctg gggaaaggga ggggtgggtg 1920

ctgagagagg ggcactcaaa ggggactttt agcctaaagt tttaatatat atttttaaca 1980

agaataacct aatattgttc tctggtactt ttcaaaatgg tgcatttaaa aattagtagt 2040

ttttaacatt ctaggagaaa aattttaaga gcgtctgaaa gggccgagaa tatgagcctt 2100

cggaagcacg cgcgaatttg gaatataccg atgttggggc aagcttttt ttttttttt 2160

tttttttttt tttttttttt ttttgaaaag acggaaaggt tccaagagtt gccaactcaa 2220

aaatatttta catagtttca gaccacttga tctaccagca ttctgttcac tgcaaacttt 2280
taaatgtgtt ccgaccctat cccaggtgtc tggggaaccc gctggggcct gggcctgttc 2340
taggacatcc caattaaaat cgatttttct gattctattc ccttgcacag gcgcatgttt 2400
cctttcttga gcttcaacat aaacggactc aatcccactg cccactacaa tgtgttcgta 2460
gaggtggtgc tggcggaccc caaccactgg cgcttccagg ggggcaaatg ggtgacctgt 2520
ggcaaagccg acaataacat gcagggtgag cagagaagag gctcgggccg gggaggaacg 2580
ggcgggaaga aatcgtaacc ctcgactcac acaactcaca tttaaatgta gcacttttt 2640

tttccccttc cattctgagg cctagaggtg ttagtatgag tgtctttgag ttgcttgttt 2700
gacggagagg agagtttgct aagtcagatt tcttgtctgc caatatgtag atatttagaa 2760
cctttaacta agacatcacc ccacccccca atccctacgt ttaacaaatc agtagtcata 2820
agctctccag gtgggaaggg ctcctgggat tctaatgttc acttgagaaa gcccagccaa 2880
agtttagttc acccataaat atccaactgt cttccatcgg atgttgccct tacagcttta 2940
gaaggcccca aattgacctt caagagtcat ctcttgttag ctccgtttct aaattctgaa 3000
atgccattca ggggagtccc tagtgcaagg aaggttggaa gcacaggggc ctgggaggga 3060

tatggatgta gtcctgctgg tctccactgg cctctttaag caacttttac tgggagacca 3120
actgtaagtc tagctcttat atcttgctca tagctaagag acatccctcc gctttctcca 3180
tttgtaaaca gccctatatg cttgggtttt gtgttttgtt tcattttctc ttaggcaaca 3240
aaatgtatgt tcacccagag tctcctaata ctggttccca ctggatgaga caggagattt 3300
cattcgggaa attaaaactc accaataaca aaggcgcaaa taacaacaac acccaggtag 3360
agtgacagag caggagggga tatcttctgg ctttgactat aaggcttttt tctaataaga 3420
gtccctactc ttttcactgt atttataata tttgcatttg tgacctgttt gctcgcctat 3480

ttctaaccat ttttgttctt ttgacctttc tcatcttcac tttcttattg gatttcgata 3540
acagtgagtt gactattaag aacagaaata gcgaagtatt ttgggaattt aggaaaccaa 3600
gaggaaagca tatctatcac aaccacatac ccagctatga tttaaatttc aaaaaaaaag 3660
tgggggggca ataatgagac ctttaaactt gcaataaaca aagctgttag tgaggagcat 3720
ttagaagtcc aataccaaaa tacataattt gtcaaaatct aattttgttg aaccactaag 3780
aggcttttta gatttagcaa tttttttctg tactctttcc agatgatagt cttacaatcc 3840
ttacacaaat accaaccccg actgcatatt gttgaagtta cagaggatgg cgtggaggac 3900

ttgaatgagc cctcaaagac ccagactttt accttctcag aaacgcaatt cattgcagtg 3960

actgcctacc aaaacaccga tgtgagtgtc ccagacatct caagaatctc taaagctaag 4020

gtccagcatg ataaatcact caatgactgt ttttctcccc tatctagatt actcaactaa 4080

agattgatca taaccccttt gcaaaaggct tcagagacaa ctatgattcg taagtgcagc 4140

ttttatccac acttgcctga tcatctctga gcaggacata catcaacagg cactttgctg 4200

ataatgtatt ttaggaagag cttttacctt tgggattttt acatattttt ctttttccaa 4260

aatttttcc tttactaatc ttgctttaga tttttctcag aaaggttgtg ttaatttctg 4320

aagaaatgtt aaggacttaa aaatgaagag gtttttttag catttgagtg aagatttgaa 4380

attttaagaa tctgcattta tatatacctt tcttttcatt tgatccattt ttttatcctc 4440

ccaagagcag atattattac tctcccccac ccccactttt ttttttaaca taagaaaaaa 4500

ctgaaactaa gaggatgtaa tttcacaaca cgaaatagca aggccctgct ctttttaaaa 4560

tctgagtttt ctaccgccac agccagtgtt ttttccatca cattgacaaa ggaggtttga 4620

tctgagtttt tcgtgttcta ggactagtaa aggtagattt tctatagttt aaatacttga 4680

tgcctaggag gaaacttttt cttgcatggt gggaaatttt tcccaataag ccaagagtcc 4740

agctaaaatg ggccagtgca tctcctgcct ctgttctttc agcccaacag accagcactt 4800

tcggtgtaga taaccaacac aagccttttt catttctggg aggtggtttg tttggggaca 4860

acattagggt ttttttttttt ttttaagtgt ttctctttat attgtagcat gtacaccgct 4920

tcagaaaatg acaggttaac tccatctccc acggattctc ctagatccca tcagattgtc 4980

cctggaggtc ggtacggcgt tcaatccttc ttcccggagc cctttgtcaa cactttacct 5040

caagcccgct attataatgg cgagagaacc gtgccacaga ccaacggcct cctttcaccc 5100

caacagagcg aagaggtggc caaccctccc cagcggtggc ttgtcacgcc tgtccagcaa 5160

cctgggacca acaaactaga catcagttcc tatgaatctg aatatacttc tagcacattg 5220

ctcccatatg gcattaaatc cttgcccctt cagacatccc atgccctggg gtattaccca 5280

gacccaacct ttcctgcaat ggcagggtgg ggaggtcgag gttcttacca gaggaagatg 5340

gcagctggac taccatggac ctccagaaca agccccactg tgttctctga agatcagctc 5400

tccaaggaga aagtgaaaga ggaaattggc tcttcttgga tagagacacc cccttccatc 5460

aaatctctag attccaatga ttcaggagta tacaccagtg cttgtaagcg aaggcggctg 5520

tctcctagca actccagtaa tgaaaattca ccctccataa agtgtgagga cattaatgct 5580

gaagagtata gtaaagacac ctcaaaaggc atgggagggt attatgcttt ttacacaact 5640

ccctaaagag ttattttaac ctcaaaaatt agctaacttt ttgcagatgg acttggtggt 5700

gtttttttgtt gtcttctttg cctaggttgc caaaaagatg tttgccttcc accttgatgc 5760

atcctgtttt gtgcaattct ctaaaagaag gtgccaaagc tttttgattg ctgcaggtaa 5820

ctgaaacaaa cctagcattt ttaaaaaata agattaatgg aagactttaa ggtattttaa 5880

aattcgaagg gtatccaagg ttctgtattt atttattggg gagacactaa cccttcaaag 5940

aagcaggctg tgaacattgg gtgcccagtg ctatcagatg agttaaaacc tttgattctc 6000

atttctattt gtaaattctt aagcaaatag aagccgagtg ttaaggtgtt ttgcttctga 6060

aagagggctg tgccttccgt ttcagaagga gacattttgc tgttacattc tgccaggggc 6120

aaaagatact aggcccagga gtcaagaaaa gcttttgtga aagtgatagt ttcacctgac 6180

tttgattcct taacccccgg cttttggaac aagccatgtt tgccctagtc caggattgcc 6240

tcacttgaga cttgctaggc ctctgctgtg tgctggggtg gccagtggga ctcaggagag 6300

agcaagctaa ggagtcacca aaaaaaaaaa aaaaaaaaag ggagaattta aaagtgtaca 6360

gttgtgtgtt tagatacact atagaataat gtggtatata ttgtacaaat agtctacata 6420

ggtgtctggg ataatgtaaa actggtgctt tggctttgta aagaatttgc aaatcactta 6480

acagctgcag gggcaagggg agagtttcat catccccatg atatttggga atattctgtt 6540

tacttcttag atagttaaga atgtattcag ctactatgta ctaacttgaa ccgtgtttaa 6600

ggaaaactcc tatttcatcc tcttcttgcg ccatcccctc tccctaactt ggtaatgtga 6660

agaaactaaa acctgatacc acagctccta taggcatttt agagatcttg gatttttatg 6720

tacagtctta gtcatttta ataaatgtgg ttcagtaagg gaacgga 6767

<210> 10

<211> 2471

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggggacgaag ggaagctcca gcgtgtggcc ccggcgagtg cggataaaag ccgccccgcc 60

gggctcgggc ttcattctga gccgagcccg gtgccaagcg cagctagctc agcaggcggc 120

agcggcggcc tgagcttcag ggcagccagc tccctcccgg tctcgccttc cctcgcggtc 180

agcatgaaag ccttcagtcc cgtgaggtcc gttaggaaaa acagcctgtc ggaccacagc 240

ctgggcatct cccggagcaa aacccctgtg gacgacccga tgagcctgct atacaacatg 300

aacgactgct actccaagct caaggagctg gtgcccagca tcccccagaa caagaaggtg 360

agcaagatgg aaatcctgca gcacgtcatc gactacatct tggacctgca gatcgccctg 420

gactcgcatc ccactattgt cagcctgcat caccagagac ccgggcagaa ccaggcgtcc 480

aggacgccgc tgaccaccct caacacggat atcagcatcc tgtccttgca ggtaagacct 540

gctccggggt ccccgccccg ccgccgcaca ctcccgcggt cgtctgggct gtcactagga 600

gatccgtagc ccagacggtg actttcgtat gagctattta actttatttt cttcagaatc 660

tgctgtagat tgagctgtgc gtgaaattgc tagtaagttc tgacatgtta atgcgtctgt 720

ctttaaatct gaattgttac cataaacgtg tttaatggaa cttgctggtc tgtggactac 780

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaccctt tctacttaac attgtcttaa cctcgtactc 840

tttatcctct ttctttccag gcttctgaat tcccttctga gttaatgtca aatgacagca 900

aagcactgtg tggctgaata agcggtgagt gtttgcttgt gccacccgtg ggtaaactgc 960

ccctcggtgt gtgtgcgcgc gcgcgcatgt gtttttgctt gtgtatctat aaaatgtctg 1020

atttggtaaa tgcatgctta cttcgcggtg ttacccgtac tacattgtct cactagacat 1080

gaaggagctt gtagctttgg gtgctcgaga tcacagaaca ttttccttta aaaggaaatg 1140

atgccaataa cttactacga aggcggccga ggaacgtgtg tattggcttt gtagcaaatg 1200

taatgccctg gatcttccta cgagtcctct ggtactatga ggtactaacc tccactgtaa 1260

ttaatcttac cgccacaaat tccatagtga tcctccttcc ctaaaactat agtcctctgg 1320

gattctctgg gctagttgag gattgctacc ctgtgccttc aaccctgtga tgtgggatcc 1380

cagacttccc tatctgttaa ctaaagggct gttttcaatc aaataattgt tacgagaagc 1440

agactggcgc ctgtagcact gctgttggag atccaaatag gagattgggt tgggaagttt 1500

ttcccttgag tctctgctat tttaatgttt aatttgcgct gtcgaggcga gtgtgtgtgt 1560

tgcatctgga cgccagggtt tgcccaatct ttgagtgttt ggttaaatgt tcaaactgtg 1620

gcttcctccc ggcgccagtc gcccgcctct gcccttaggt tacattctct taaacatgcc 1680

tttctccccc actctttcgc aggtgttcat gatttctttt attctttgca caacaacaac 1740

aacaacaaat tcacggaatc ttttaagtgc tgaacttatt tttcaaccat ttcacaagga 1800

ggacaagttg aatggacctt tttaaaaaga aaaaaaaaat ggaaggaaaa ctaagaatga 1860

tcatcttccc agggtgttct cttacttgga ctgtgatatt cgttatttat gaaaaagact 1920

tttaaatgcc ctttctgcag ttggaaggtt ttctttatat actattccca ccatggggag 1980

cgaaaacgtt aaaatcacaa ggaattgccc aatctaagca gactttgcct tttttcaaag 2040

gtggagcgtg aataccagaa ggatccagta ttcagtcact taaatgaagt cttttggtca 2100

gaaattacct ttttgacaca agcctactga atgctgtgta tatatttata tataaatata 2160

tctatttgag tgaaaccttg tgaactcttt aattagagtt ttcttgtata gtggcagaga 2220

tgtctatttc tgcattcaaa agtgtaatga tgtacttatt catgctaaac tttttataaa 2280

agtttagttg taaacttaac ccttttatac aaaataaatc aagtgtgttt attgaatggt 2340

gattgcctgc tttatttcag aggaccagtg ctttgatttt tattatgcta tgttataact 2400

gaacccaaat aaatacaagt tcaaatttat gtagactgta taagattata ataaaacatg 2460

tctgaagtca a 2471

<210> 11

<211> 4018

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

caggcagcgc tgcgtcctgc tgcgcacgtg ggaagccctg gccccggcca cccccgcgat 60

gccgcgcgct ccccgctgcc gagccgtgcg ctccctgctg cgcagccact accgcgaggt 120

gctgccgctg gccacgttcg tgcggcgcct ggggccccag ggctggcggc tggtgcagcg 180

cggggacccg gcggctttcc gcgcgctggt ggcccagtgc ctggtgtgcg tgccctggga 240

cgcacggccg cccccgccg ccccctcctt ccgccaggtg tcctgcctga aggagctggt 300

ggcccgagtg ctgcagaggc tgtgcgagcg cggcgcgaag aacgtgctgg ccttcggctt 360

cgcgctgctg gacggggccc gcgggggccc ccccgaggcc ttcaccacca gcgtgcgcag 420

ctacctgccc aacacggtga ccgacgcact gcgggggagc ggggcgtggg ggctgctgct 480

gcgccgcgtg ggcgacgacg tgctggttca cctgctggca cgctgcgcgc tctttgtgct 540

ggtggctccc agctgcgcct accaggtgtg cgggccgccg ctgtaccagc tcggcgctgc 600

cactcaggcc cggcccccgc cacacgctag tggaccccga aggcgtctgg gatgcgaacg 660

ggcctggaac catagcgtca gggaggccgg ggtccccctg ggcctgccag ccccgggtgc 720

gaggaggcgc gggggcagtg ccagccgaag tctgccgttg cccaagaggc ccaggcgtgg 780

cgctgcccct gagccggagc ggacgcccgt tgggcagggg tcctgggccc acccgggcag 840

gacgcgtgga ccgagtgacc gtggtttctg tgtggtgtca cctgccagac ccgccgaaga 900

agccacctct ttggagggtg cgctctctgg cacgcgccac tcccacccat ccgtgggccg 960

ccagcaccac gcgggccccc catccacatc gcggccacca cgtccctggg acacgccttg 1020

tcccccggtg tacgccgaga ccaagcactt cctctactcc tcaggcgaca aggagcagct 1080

gcggccctcc ttcctactca gctctctgag gcccagcctg actggcgctc ggaggctcgt 1140

ggagaccatc tttctgggtt ccaggccctg gatgccaggg actccccgca ggttgccccg 1200

cctgccccag cgctactggc aaatgcggcc cctgtttctg gagctgcttg ggaaccacgc 1260

gcagtgcccc tacggggtgc tcctcaagac gcactgcccg ctgcgagctg cggtcacccc 1320

agcagccggt gtctgtgccc gggagaagcc ccagggctct gtggcggccc ccgaggagga 1380

ggacacagac ccccgtcgcc tggtgcagct gctccgccag cacagcagcc cctggcaggt 1440

gtacggcttc gtgcgggcct gcctgcgccg gctggtgccc ccaggcctct ggggctccag 1500

gcacaacgaa cgccgcttcc tcaggaacac caagaagttc atctccctgg ggaagcatgc 1560

caagctctcg ctgcaggagc tgacgtggaa gatgagcgtg cgggactgcg cttggctgcg 1620

caggagccca ggggttggct gtgttccggc cgcagagcac cgtctgcgtg aggagatcct 1680

ggccaagttc ctgcactggc tgatgagtgt gtacgtcgtc gagctgctca ggtctttctt 1740

ttatgtcacg gagaccacgt ttcaaaagaa caggctcttt ttctaccgga agagtgtctg 1800

gagcaagttg caaagcattg gaatcagaca gcacttgaag agggtgcagc tgcgggagct 1860

gtcggaagca gaggtcaggc agcatcggga agccaggccc gccctgctga cgtccagact 1920

ccgcttcatc cccaagcctg acgggctgcg gccgattgtg aacatggact acgtcgtggg 1980

agccagaacg ttccgcagag aaaagagggc cgagcgtctc acctcgaggg tgaaggcact 2040

gttcagcgtg ctcaactacg agcgggcgcg gcgccccggc ctcctgggcg cctctgtgct 2100

gggcctggac gatatccaca gggcctggcg caccttcgtg ctgcgtgtgc gggcccagga 2160

cccgccgcct gagctgtact ttgtcaaggt ggatgtgacg ggcgcgtacg acaccatccc 2220

ccaggacagg ctcacggagg tcatcgccag catcatcaaa ccccagaaca cgtactgcgt 2280

gcgtcggtat gccgtggtcc agaaggccgc ccatgggcac gtccgcaagg ccttcaagag 2340

ccacgtctct accttgacag acctccagcc gtacatgcga cagttcgtgg ctcacctgca 2400

ggagaccagc ccgctgaggg atgccgtcgt catcgagcag agctcctccc tgaatgaggc 2460

cagcagtggc ctcttcgacg tcttcctacg cttcatgtgc caccacgccg tgcgcatcag 2520

gggcaagtcc tacgtccagt gccaggggat cccgcagggc tccatcctct ccacgctgct 2580

ctgcagcctg tgctacggcg acatggagaa caagctgttt gcggggattc ggcgggacgg 2640

gctgctcctg cgtttggtgg atgatttctt gttggtgaca cctcacctca cccacgcgaa 2700

aaccttcctc aggaccctgg tccgaggtgt ccctgagtat ggctgcgtgg tgaacttgcg 2760

gaagacagtg gtgaacttcc ctgtagaaga cgaggccctg ggtggcacgg cttttgttca 2820

gatgccggcc cacggcctat tcccctggtg cggcctgctg ctggataccc ggaccctgga 2880

ggtgcagagc gactactcca gctatgcccg gacctccatc agagccagtc tcaccttcaa 2940

ccgcggcttc aaggctggga ggaacatgcg tcgcaaactc tttggggtct tgcggctgaa 3000

gtgtcacagc ctgtttctgg atttgcaggt gaacagcctc cagacggtgt gcaccaacat 3060

ctacaagatc ctcctgctgc aggcgtacag gtttcacgca tgtgtgctgc agctcccatt 3120

tcatcagcaa gtttggaaga accccacatt tttcctgcgc gtcatctctg acacggcctc 3180

cctctgctac tccatcctga aagccaagaa cgcagggatg tcgctggggg ccaagggcgc 3240

cgccggccct ctgccctccg aggccgtgca gtggctgtgc caccaagcat tcctgctcaa 3300

gctgactcga caccgtgtca cctacgtgcc actcctgggg tcactcagga cagcccagac 3360
gcagctgagt cggaagctcc cggggacgac gctgactgcc ctggaggccg cagccaaccc 3420
ggcactgccc tcagacttca agaccatcct ggactgatgg ccacccgccc acagccaggc 3480
cgagagcaga caccagcagc cctgtcacgc cgggctctac gtcccaggga gggaggggcg 3540
gcccacaccc aggcccgcac cgctgggagt ctgaggcctg agtgagtgtt tggccgaggc 3600
ctgcatgtcc ggctgaaggc tgagtgtccg gctgaggcct gagcgagtgt ccagccaagg 3660
gctgagtgtc cagcacacct gccgtcttca cttccccaca ggctggcgct cggctccacc 3720

ccagggccag cttttcctca ccaggagccc ggcttccact ccccacatag gaatagtcca 3780
tccccagatt cgccattgtt caccctcgc cctgccctcc tttgccttcc acccccacca 3840
tccaggtgga gaccctgaga aggaccctgg gagctctggg aatttggagt gaccaaaggt 3900
gtgccctgta cacaggcgag gaccctgcac ctggatgggg gtccctgtgg gtcaaattgg 3960
ggggaggtgc tgtgggagta aaatactgaa tatatgagtt tttcagtttt gaaaaaaa 4018

<210> 12
<211> 2335
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 12

gttattctct ggaacatgaa acattctgtt gtgctcatat catgcaaatt atcactagta 60

ggagagcaga gagtggaaat gttccaggta taaagaccca caagataaag aagctcagag 120
tcgttagaaa caggagcaga tgtacagggt ttgcctgact cacactcaag gttgcataag 180
caagatttca aaattaatcc tattctggag acctcaaccc aatgtacaat gttcctgact 240
ggaaaagaag aactatattt ttctgatttt ttttttcaaa tctttaccat tagttgccct 300
gtatctccgc cttcactttc tgcaggaaac tttatttcct acttctgcat gccaagtttc 360
tacctctaga tctgtttggt tcagttgctg agaagcctga cataccagga ctgcctgaga 420
caagccacaa gctgaacaga gaaagtggat tgaacaagga cgcatttccc cagtacatcc 480

acaacatgct gtccacatct cgttctcggt ttatcagaaa taccaacgag agcggtgaag 540
aagtcaccac ctttttttgat tatgattacg gtgctccctg tcataaattt gacgtgaagc 600
aaattggggc ccaactcctg cctccgctct actcgctggt gttcatcttt ggttttgtgg 660
gcaacatgct ggtcgtcctc atcttaataa actgcaaaaa gctgaagtgc ttgactgaca 720
tttacctgct caacctggcc atctctgatc tgctttttct tattactctc ccattgtggg 780

ctcactctgc tgcaaatgag tgggtctttg ggaatgcaat gtgcaaatta ttcacagggc 840

tgtatcacat cggttatttt ggcggaatct tcttcatcat cctcctgaca atcgatagat 900

acctggctat tgtccatgct gtgtttgctt taaaagccag gacggtcacc tttggggtgg 960

tgacaagtgt gatcacctgg ttggtggctg tgtttgcttc tgtcccagga atcatcttta 1020

ctaaatgcca gaaagaagat tctgtttatg tctgtggccc ttattttcca cgaggatgga 1080

ataatttcca cacaataatg aggaacattt tggggctggt cctgccgctg ctcatcatgg 1140

tcatctgcta ctcgggaatc ctgaaaaccc tgcttcggtg tcgaaacgag aagaagaggc 1200

atagggcagt gagagtcatc ttcaccatca tgattgttta ctttctcttc tggactccct 1260

ataatattgt cattctcctg aacaccttcc aggaattctt cggcctgagt aactgtgaaa 1320

gcaccagtca actggaccaa gccacgcagg tgacagagac tcttgggatg actcactgct 1380

gcatcaatcc catcatctat gccttcgttg gggagaagtt cagaaggtat ctctcggtgt 1440

tcttccgaaa gcacatcacc aagcgcttct gcaaacaatg tccagttttc tacagggaga 1500

cagtggatgg agtgacttca acaaacacgc cttccactgg ggagcaggaa gtctcggctg 1560

gtttataaaa cgaggagcag tttgattgtt gtttataaag ggagataaca atctgtatat 1620

aacaacaaac ttcaagggtt tgttgaacaa tagaaacctg taaagcaggt gcccaggaac 1680

ctcagggctg tgtgtactaa tacagactat gtcacccaat gcatatccaa catgtgctca 1740

gggaataatc cagaaaaact gtgggtagag actttgactc tccagaaagc tcatctcagc 1800

tcctgaaaaa tgcctcatta ccttgtgcta atcctctttt tctagtcttc ataatttctt 1860

cactcaatct ctgattctgt caatgtcttg aaatcaaggg ccagctggag gtgaagaaga 1920

gaatgtgaca ggcacagatg aatgggagtg agggatagtg gggtcagggc tgagaggaga 1980

aggagggaga catgagcatg gctgagcctg gacaaagaca aaggtgagca aagggctcac 2040

gcattcagcc aggagatgat actggtcctt agccccatct gccacgtgta tttaaccttg 2100

aagggttcac caggtcaggg agagtttggg aactgcaata acctgggagt tttggtggag 2160

tccgatgatt ctcttttgca taagtgcatg acatattttt gctttattac agtttatcta 2220

tggcacccat gcaccttaca tttgaaatct atgaaatatc atgctccatt gttcagatgc 2280

ttcttaggcc acatcccccc gtctaaaaat tcagaaaatt tttgtttata aaaga 2335

<210> 13

<211> 1657

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

tctcacagga agccacgcac ccttgaaagg caccgggtcc ttcttagcat cgtgcttcct 60

gagcaagcct ggcattgcct cacagacctt cctcagagcc gctttcagaa aagcaagctg 120

cttctggttg ggcccagacc tgccttgagg agcctgtaga gttaaaaaat gaaccccacg 180

gatatagcag acaccaccct cgatgaaagc atatacagca attactatct gtatgaaagt 240

atccccaagc cttgcaccaa agaaggcatc aaggcatttg gggagctctt cctgccccca 300

ctgtattcct tggtttttgt atttggtctg cttggaaatt ctgtggtggt tctggtcctg 360

ttcaaataca agcggctcag gtccatgact gatgtgtacc tgctcaacct tgccatctcg 420

gatctgctct tcgtgttttc cctccctttt tggggctact atgcagcaga ccagtgggtt 480

tttgggctag gtctgtgcaa gatgatttcc tggatgtact tggtgggctt ttacagtggc 540

atattctttg tcatgctcat gagcattgat agatacctgg caattgtgca cgcggtgttt 600

tccttgaggg caaggacctt gacttatggg gtcatcacca gtttggctac atggtcagtg 660

gctgtgttcg cctcccttcc tggctttctg ttcagcactt gttatactga gcgcaaccat 720

acctactgca aaaccaagta ctctctcaac tccacgacgt ggaaggttct cagctccctg 780

gaaatcaaca ttctcggatt ggtgatcccc ttagggatca tgctgttttg ctactccatg 840

atcatcagga ccttgcagca ttgtaaaaat gagaagaaga acaaggcggt gaagatgatc 900

tttgccgtgg tggtcctctt ccttgggttc tggacacctt acaacatagt gctcttccta 960

gagaccctgg tggagctaga agtccttcag gactgcacct ttgaaagata cttggactat 1020

gccatccagg ccacagaaac tctggctttt gttcactgct gccttaatcc catcatctac 1080

ttttttctgg gggagaaatt tcgcaagtac atcctacagc tcttcaaaac ctgcaggggc 1140

ctttttgtgc tctgccaata ctgtgggctc ctccaaattt actctgctga cacccccagc 1200

tcatcttaca cgcagtccac catggatcat gatctccatg atgctctgta gaaaaatgaa 1260

atggtgaaat gcagagtcaa tgaactttcc acattcagag cttacttaaa attgtatttt 1320

agtaagagat tcctgagcca gtgtcaggag gaaggcttac acccacagtg gaaagacagc 1380

ttctcatcct gcaggcagct ttttctctcc cactagacaa gtccagcctg gcaagggttc 1440

acctgggctg aggcatcctt cctcacacca ggcttgcctg caggcatgag tcagtctgat 1500

gagaactctg agcagtgctt gaatgaagtt gtaggtaata ttgcaaggca aagactattc 1560

ccttctaacc tgaactgatg ggtttctcca gagggaattg cagagtactg gctgatggag 1620

taaatcgcta ccttttgctg tggcaaatgg gccctct 1657

<210> 14

<211> 750

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
65 70 75 80

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

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
115 120 125

Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
130 135 140

Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
145 150 155 160

Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
165 170 175

Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
180 185 190

Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
195 200 205

Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
210 215 220

Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys

225 230 235 240

Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly

245 250 255

Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr

260 265 270

Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly

275 280 285

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys

290 295 300

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg

305 310 315 320

Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn

325 330 335

Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val

340 345 350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro

355 360 365

Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly

370 375 380

Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg

385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile

405 410 415

Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr

420 425 430

Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala

435 440 445

Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val

450 455 460

Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu

465 470 475 480

Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser
485 490 495
Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
500 505 510
Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
515 520 525

Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn
530 535 540
Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
545 550 555 560
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
565 570 575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
580 585 590

Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
595 600 605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
610 615 620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
625 630 635 640
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
645 650 655

Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
660 665 670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg
675 680 685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
690 695 700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
705 710 715 720

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala

725 730 735

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala

740 745 750

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln

1 5 10 15

Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn

20 25 30

Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys

35 40 45

Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys

50 55 60

Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly

65 70 75 80

Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly

85 90 95

Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala

100 105 110

Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu

115 120

<210> 16

<211> 622

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro

1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln

20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu

35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg

50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu

65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu

85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro

100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro

115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr His Phe Phe Ser Arg Ile

130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln

145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu

165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu

180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu

195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg

210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp

225 230 235 240

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

245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg

260 265 270

Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile

275 280 285

Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser

290 295 300

Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys

305 310 315 320

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met

325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu

340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val

355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile

370 375 380

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

385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp

405 410 415

Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr

420 425 430

Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu

435 440 445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp

450 455 460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala

465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile

485 490 495

Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser

500 505 510

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

515 520 525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly

530 535 540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg

545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu

565 570 575

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser

580 585 590

Val Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro

595 600 605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala

610 615 620

<210> 17

<211> 556

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met

1 5 10 15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp

20 25 30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln

35 40 45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu

50 55 60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ser

65 70 75 80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu

85 90 95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr

100 105 110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp

115 120 125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro

130 135 140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala

145 150 155 160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Val Pro Pro

165 170 175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro

180 185 190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser

195 200 205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser

210 215 220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp

225 230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala

245 250 255

Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu

260 265 270

Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly

275 280 285

Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu

290 295 300

Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg

305 310 315 320

Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val

325 330 335

Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu

340 345 350

Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
355 360 365

Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
370 375 380

Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
385 390 395 400

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
405 410 415

Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
420 425 430

Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
435 440 445

Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
450 455 460

Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
465 470 475 480

Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
485 490 495

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
500 505 510

Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
515 520 525

Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
530 535 540

Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545 550 555

<210> 18

<211> 297

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro

1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg

20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu

35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile

50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile

65 70 75 80

Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Tyr Ile Ile

85 90 95

Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu

100 105 110

Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile

115 120 125

Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser

130 135 140

His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro

145 150 155 160

Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn

165 170 175

Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly

180 185 190

Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile

195 200 205

Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro

245 250 255

Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
260 265 270
Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
275 280 285
Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 19
<211> 937
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 19
Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
20 25 30
Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile
35 40 45
Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
50 55 60

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

Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
130 135 140
Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
145 150 155 160
Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile

165 170 175

Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu

180 185 190

His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met

195 200 205

Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile

210 215 220

Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser

225 230 235 240

Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu

245 250 255

Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met

260 265 270

Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro

275 280 285

Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala

290 295 300

Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp

305 310 315 320

Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro

325 330 335

Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe

340 345 350

Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln

355 360 365

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

370 375 380

Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn

385 390 395 400

Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu

405 410 415

Ala Ile Ala Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
420 425 430
Lys Ser Ser Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly
435 440 445

Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
450 455 460
Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
465 470 475 480
Glu Cys Ala Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
485 490 495
Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
500 505 510

Asn Pro Gln Gln Trp Thr Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
515 520 525
Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
530 535 540
Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu
545 550 555 560
His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
565 570 575

Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe
580 585 590
Leu His Ile Ala Ile Gln Ile Ala Ala Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser
595 600 605
His Phe Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Ile Gly
610 615 620
Glu Gln Leu His Val Lys Ile Ser Asp Leu Gly Leu Ser Arg Glu Ile
625 630 635 640

Tyr Ser Ala Asp Tyr Tyr Arg Val Gln Ser Lys Ser Leu Leu Pro Ile
645 650 655
Arg Trp Met Pro Pro Glu Ala Ile Met Tyr Gly Lys Phe Ser Ser Asp

660 665 670

Ser Asp Ile Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile Phe Ser Phe

675 680 685

Gly Leu Gln Pro Tyr Tyr Gly Phe Ser Asn Gln Glu Val Ile Glu Met

690 695 700

Val Arg Lys Arg Gln Leu Leu Pro Cys Ser Glu Asp Cys Pro Pro Arg

705 710 715 720

Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu Cys Trp Asn Glu Ile Pro Ser Arg Arg

725 730 735

Pro Arg Phe Lys Asp Ile His Val Arg Leu Arg Ser Trp Glu Gly Leu

740 745 750

Ser Ser His Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Gly Gly Asn Ala Thr Thr

755 760 765

Gln Thr Thr Ser Leu Ser Ala Ser Pro Val Ser Asn Leu Ser Asn Pro

770 775 780

Arg Tyr Pro Asn Tyr Met Phe Pro Ser Gln Gly Ile Thr Pro Gln Gly

785 790 795 800

Gln Ile Ala Gly Phe Ile Gly Pro Pro Ile Pro Gln Asn Gln Arg Phe

805 810 815

Ile Pro Ile Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Pro Gly Tyr Ala Ala Phe Pro

820 825 830

Ala Ala His Tyr Gln Pro Thr Gly Pro Pro Arg Val Ile Gln His Cys

835 840 845

Pro Pro Pro Lys Ser Arg Ser Pro Ser Ser Ala Ser Gly Ser Thr Ser

850 855 860

Thr Gly His Val Thr Ser Leu Pro Ser Ser Gly Ser Asn Gln Glu Ala

865 870 875 880

Asn Ile Pro Leu Leu Pro His Met Ser Ile Pro Asn His Pro Gly Gly

885 890 895

Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile

900 905 910

Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
915 920 925

Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
930 935

<210> 20

<211> 168

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15

Ile Glu Gly Arg His Met Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
20 25 30

Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala
35 40 45

Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met
50 55 60

His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys
65 70 75 80

Asp Cys Glu Arg Arg Phe Phe Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln
85 90 95

Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg
100 105 110

Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr His Thr Arg Thr His Thr
115 120 125

Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
130 135 140

Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn
145 150 155 160

Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
165

<210> 21

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu
1 5 10 15

Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr
20 25 30

Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala
35 40 45

Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu
50 55 60

Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser
65 70 75 80

Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn
85 90 95

Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro
115 120 125

Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu
130 135 140

Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe
145 150 155 160

Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His
165 170 175

Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn
180 185 190

Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg
195 200 205

Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly

210 215 220

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val
225 230 235 240
Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu
245 250 255
Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala
260 265 270
Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly Ser
275 280 285

Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr Glu
290 295 300
Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu Glu
305 310 315 320
Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp
325 330 335
Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
340 345

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFV CDRL1

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFV CDRL2

<400> 23

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFV CDRL3

<400> 24

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFV CDRH1

<400> 25

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFV CDRH2

<400> 26

Val Thr Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFV CDRH3

<400> 27

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 28

<211> 734

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFv (VH-VL) FMC63

<400> 28

cacatccaga tgacccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga ccgggtgacc 60

atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120

gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240

gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300

ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360

ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420

cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480

tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540

accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600

agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgccat ctactactgc 660

gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720

gtgaccgtga gcag 734

<210> 29

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 scFv (VH-VL) FMC63

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly

100 105 110

Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys

115 120 125

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

130 135 140

Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser

145 150 155 160

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile

165 170 175

Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn

195 200 205

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr

210 215 220

Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser

245

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-ROR1 scFV CDRL1

<400> 30

Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr Tyr Met

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-ROR1 scFV CDRL2

<400> 31

Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly

1 5

<210> 32

<211> 9

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-ROR1 scFV CDRL3

<400> 32

Ala Asp Arg Ala Thr Tyr Phe Cys Ala

1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-ROR1 scFV CDRH1

<400> 33

Asp Thr Ile Asp Trp Tyr

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-ROR1 scFV CDRH2

<400> 34

Val Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp Arg

1 5 10 15

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-ROR1 scFV CDRH3

<400> 35

Tyr Ile Gly Gly Tyr Val Phe Gly

1 5

<210> 36

<211> 123

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

cggagcaagc ggagcagagg cggccacagc gactacatga acatgacccc cagacggcct 60

ggccccaccc ggaagcacta ccagccctac gccccaccca gggactttgc cgcctacaga 120

agc 123

<210> 37

<211> 1476

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P28z CAR

<400> 37

gtggcctcac cgttgacccg ctttctgtcg ctgaacctgc tgctgctggg tgagtcgatt 60

atcctgggga gtggagaagc tgaggtgcag ctgcagcagt caggacctga actggtgaag 120

cctgggactt cagtgaggat atcctgcaag acttctggat acacattcac tgaatatacc 180

atacactggg tgaagcagag ccatggaaag agccttgagt ggattggaaa catcaatcct 240

aacaatggtg gtaccaccta caatcagaag ttcgaggaca aggccacatt gactgtagac 300

aagtcctcca gtacagccta catggagctc cgcagcctaa catctgagga ttctgcagtc 360

tattattgtg cagctggttg gaactttgac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 420

tcctcaggtg gaggtggatc aggtggaggt ggatctggtg gaggtggatc tgacattgtg 480

atgacccagt ctcacaaatt catgtccaca tcagtaggag acagggtcag catcatctgt 540

aaggccagtc aagatgtggg tactgctgta gactggtatc aacagaaacc aggacaatct 600

cctaaactac tgatttattg ggcatccact cggcacactg gagtccctga tcgcttcaca 660

ggcagtggat ctgggacaga cttcactctc accattacta atgttcagtc tgaagacttg 720

gcagattatt tctgtcagca atataacagc tatcccctca cgttcggtgc tgggaccatg 780

ctggacctga aacgggcggc cgcatctact actaccaagc cagtgctgcg aactccctca 840

cctgtgcacc ctaccgggac atctcagccc cagagaccag aagattgtcg gccccgtggc 900

tcagtgaagg ggaccggatt ggacttcgcc tgtgatattt acatctgggc acccttggcc 960

ggaatctgcg tggcccttct gctgtccttg atcatcactc tcatctgcta caatagtaga 1020

aggaacagac tccttcaaag tgactacatg aacatgactc cccggaggcc tgggctcact 1080

cgaaagcctt accagcccta cgcccctgcc agagactttg cagcgtaccg ccccagagca 1140

aaattcagca ggagtgcaga gactgctgcc aacctgcagg accccaacca gctctacaat 1200

gagctcaatc tagggcgaag agaggaatat gacgtcttgg agaagaagcg ggctcgggat 1260

ccagagatgg gaggcaaaca gcagaggagg aggaaccccc aggaaggcgt atacaatgca 1320

ctgcagaaag acaagatggc agaagcctac agtgagatcg gcacaaaagg cgagaggcgg 1380

agaggcaagg ggcacgatgg cctttaccag ggtctcagca ctgccaccaa ggacacctat 1440

gatgccctgc atatgcagac cctggccccc cgctaa 1476

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 39

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4-Fc

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 40

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge-CH2-CH3

<400> 40

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
195 200 205
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 41
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Hinge-CH3
<400> 41
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
1 5 10 15
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
20 25 30
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
50 55 60
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
65 70 75 80
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
85 90 95
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

115

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hinge only

<400> 42

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 43

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 44

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cytoplasmic domain of CD28 with LL to GG substitution

<400> 44

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 45

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln 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> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T2A ribosomal skip element

<400> 47

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 48

<211> 356

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> tEGFR

<400> 48

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val

115 120 125

Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile

130 135 140

Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala

145 150 155 160

Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr

165 170 175

Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln

180 185 190

Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro

195 200 205

Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val

210 215 220

Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn

225 230 235 240

Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn

245 250 255

Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His

260 265 270

Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met

275 280 285

Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val

290 295 300

Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly

305 310 315 320

Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr

325 330 335

Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile

340 345 350

Gly Leu Phe Met

355

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> STREP TAG II

<400> 49

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myc tag

<400> 50

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> V5 tag

<400> 51

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLAG tag

<400> 52

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAC-Forward

<400> 53

cccgtgtcat tctctggact 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAC-Reverse

<400> 54

atcacgagca gctggtttct 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxo13A Forward

<400> 55

ggacagccta gaaagagcag 20

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxo13A Probe

<400> 56

aggtcggcgt agctcagatt gc 22

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxo13A Reverse

<400> 57

ctcttgacca tccactcgta g 21