(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0052669
(43) 공개일자 2019년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 11/06 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7004403
(22) 출원일자(국제) 2017년07월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/042454
(87) 국제공개번호 WO 2018/014038
국제공개일자 2018년01월18일
(30) 우선권주장
62/362,746 2016년07월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
포세이다 테라퓨틱스, 인크.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 스위트 700 포인트 코트 캠퍼스 4242
(72) 발명자
오스터태그 에릭
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 스위트 700 캠퍼스 포인트 코트 4242
쉬들록 데번
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 스위트 700 캠퍼스 포인트 코트 4242
(74) 대리인
김진희, 김태홍

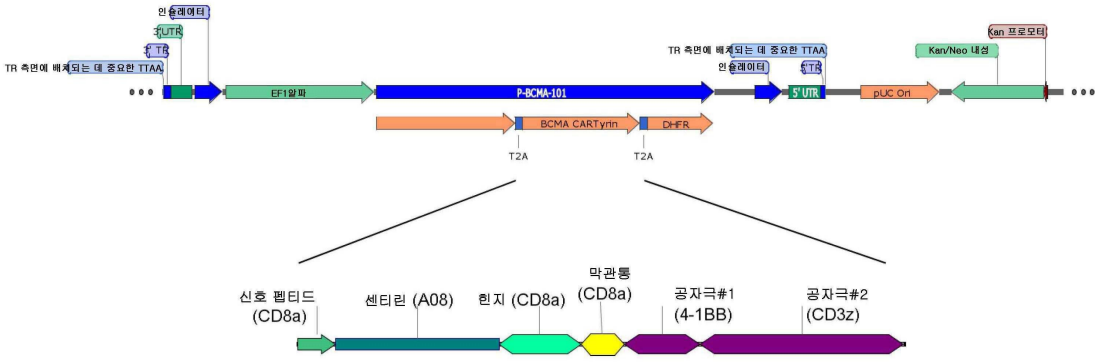
전체 청구항 수 : 총 233 항

(54) 발명의 명칭 **키메라 항원 수용체 및 사용 방법**

(57) 요 약

센티린을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)(즉, CARTyrin), 본 개시내용의 CAR 및 CARTyrin을 코딩하는 트랜스포존, 본 개시내용의 CAR 및 CARTyrin을 발현하도록 변형된 세포 뿐만 아니라, 상기의 제조 방법 및 입양 세포 요법을 위한 상기의 사용 방법을 개시한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 11/06 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61P 31/18 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/405,180 2016년10월06일 미국(US)
62/503,127 2017년05월08일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 항원 인식 영역을 포함하는 엑토도메인으로서, 여기서, 항원 인식 영역은 적어도 하나의 센티린(Centyrin)을 포함하는 것인 엑토도메인;

(b) 막관통 도메인, 및

(c) 적어도 하나의 공자극 도메인을 포함하는 엔도도메인

을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR).

청구항 2

제1항에 있어서, (a)의 엑토도메인이 신호 펩티드를 추가로 포함하는 것인 CAR.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, (a)의 엑토도메인이 항원 인식 영역과 막관통 도메인 사이에 힌지를 추가로 포함하는 것인 CAR.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 신호 펩티드가 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR 신호 펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서, 신호 펩티드가 인간 CD8α 신호 펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 6

제5항에 있어서, 신호 펩티드가 MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 3)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 신호 펩티드가 atggcactgccagtcaccgccctgctgctgcctctggctctgctgctgcacgcagctagacca(서열 번호 45)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 CAR.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR 막관통 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 인간 CD8α 막관통 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 10

제9항에 있어서, 막관통 도메인이 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열 번호 4)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 막관통 도메인이 atctacatttgggcaccactggccgggacctgtggagtgctgctgctgagcctggtcatcacactgtactgc(서열 번호 5)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 CAR.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 엔도도메인이 인간 CD3ζ 엔도도메인을 포함하는 것인 CAR.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 공자극 도메인이 인간 4-1BB, CD28, CD40, ICOS, MyD88, OX-40 세포내 세그먼트, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 CAR.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 공자극 도메인이 인간 CD28 및/또는 4-1BB 공자극 도메인을 포함하는 것인 CAR.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, CD28 공자극 도메인이 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R (서열 번호 6)을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 16

제15항에 있어서, CD28 공자극 도메인이 cgcgtgaagtttagtcgatcagcagatgccccagcttacaaacagggacagaaccagctgtataacgagctgaatctgggccgccga gaggaatatgacgtgctggataagcggagaggacgcgaccccgaaatgggaggcaagcccaggcgcaaaaaccctcaggaagg cctgtataacgagctgcagaaggacaaaatggcagaagcctattctgagatcggcatgaaggggagcgacggagaggcaaagg gcacgatgggctgtaccagggactgagcaccgccacaaaggacacctatgatgctctgcatatgcaggcactgcctccaagg (서열 번호 7)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 CAR.

청구항 17

제13항 또는 제14항에 있어서, 4-1BB 공자극 도메인이 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열 번호 8)을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 18

제17항에 있어서, 4-1BB 공자극 도메인이 aagagaggcaggaagaaactgctgtatattttcaaacagcccttcatgcgccccgtgcagactacccaggaggaagacgggtgctcc tgtcgattccctgaggaagaggaaggcgggtgtgagctg (서열 번호 9)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 CAR.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 4-1BB 공자극 도메인이 막관통 도메인과 CD28 공자극 도메인 사이에 위치하는 것인 CAR.

청구항 20

제2항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 힌지가 인간 CD8α, IgG4, 및/또는 CD4 서열로부터 유래된 서열을

포함하는 것인 CAR.

청구항 21

제2항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 힌지가 인간 CD8α 서열로부터 유래된 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 힌지가 TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 10)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 CAR.

청구항 23

제22항에 있어서, 힌지가

actaccacaccagcacctagaccaccaactccagctccaaccatcgcgagtcagcccctgagtctgagacctgaggcctgcaggcc
agctgcaggaggagctgtgcacaccaggggcctggacttcgcctgcgac (서열 번호 11)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 CAR.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 센티린이 단백질 스캐폴드를 포함하고, 여기서, 스캐폴드는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 CAR.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 센티린이 적어도 하나의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 공통 서열을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함하고, 여기서, 스캐폴드는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 CAR.

청구항 26

제25항에 있어서, 적어도 하나의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인이 인간 단백질로부터 유래된 것인 CAR.

청구항 27

제26항에 있어서, 인간 단백질이 테나신(Tenascin)-C인 것인 CAR.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 공통 서열이

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDL
TGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (서열 번호 1)

를 포함하는 것인 CAR.

청구항 29

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 공통 서열이

MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYD
LTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (서열 번호 13)

를 포함하는 것인 CAR.

청구항 30

제29항에 있어서, 공통 서열이

atgctgcctgcaccaaagaacctggtggtgtctcatgtgacagaggatagtgccagactgtcatggactgctcccgacgcagccttcg
atagttttatcatcgtgtaccgggagaacatcgaaaccggcgaggccattgtcctgacagtgccagggtccgaacgctcttatgacctg
acagatctgaagcccggaactgagtactatgtgcagatcgccggcgtcaaaggaggcaatatcagcttccctctgtccgcaatcttcac
caca (서열 번호 14)

를 포함하는 핵산 서열에

의해 코딩되는 것인 CAR.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 공통 서열이

(a) 공통 서열의 13-16번 위치에 아미노산 잔기 TEDS(서열 번호 15)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 A-B 루프;

(b) 공통 서열의 22-28번 위치에 아미노산 잔기 TAPDAAF(서열 번호 16)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 B-C 루프;

(c) 공통 서열의 38-43번 위치에 아미노산 잔기 SEKVGE(서열 번호 17)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 C-D 루프;

(d) 공통 서열의 51-54번 위치에 아미노산 잔기 GSER(서열 번호 18)을 포함하거나, 또는 그로 구성된 D-E 루프;

(e) 공통 서열의 60-64번 위치에 아미노산 잔기 GLKPG(서열 번호 19)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 E-F 루프;

(f) 공통 서열의 75-81번 위치에 아미노산 잔기 KGGHRSN(서열 번호 20)을 포함하거나, 또는 그로 구성된 F-G 루프; 또는

(g) (a)-(f)의 임의의 조합

내의 하나 이상의 위치에서 변형된 것인 CAR.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 5개의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 공통 서열을 포함하는 CAR.

청구항 33

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 10개의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 공통 서열을 포함하는 CAR.

청구항 34

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 15개의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 공통 서열을 포함하는 CAR.

청구항 35

제24항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 스캐폴드가 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하, 10^{-12} M 이하, 10^{-13} M 이하, 10^{-14} M 이하, 및 10^{-15} M 이하인 K_D로부터 선택되는 적어도 하나의 친화도로 항원에 결합하는 것인 CAR.

청구항 36

제35항에 있어서, K_D가 표면 플라스몬 공명에 의해 측정되는 것인 CAR.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항의 CAR, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는 트랜스포존.

청구항 39

제38항에 있어서, 트랜스포존이 선별 유전자를 추가로 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 40

제39항에 있어서, 선별 유전자가 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩하는 것인 트랜스포존.

청구항 41

제39항에 있어서, 선별 유전자가 선별적 세포 배양 조건에 의해 시험감염되었을 때, 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩하는 것인 트랜스포존.

청구항 42

제41항에 있어서, 선별적 세포 배양 조건이 세포 생존능 또는 생존에 유해한 화합물을 포함하고, 여기서, 유전자 생성물이 상기 화합물에 대한 내성을 부여하는 것인 트랜스포존.

청구항 43

제39항에 있어서, 선별 유전자가 *neo,* DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제), TYMS(티미딜레이트 신테타제), MGMT(O(6)-메틸구아닌-DNA 메틸트랜스퍼라제), 다중약물 내성 유전자(MDR1), ALDH1(알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리, 구성원 A1), FRANCF, RAD51C(RAD51 파라로그 C), GCS(글루코실세라미드 신타제), NKX2.2(NK2 호메오박스 2) 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 44

제38항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이,

(a) 리간드 결합 영역,

(b) 링커, 및

(c) 절두된 카스파제 9 폴리펩티드

를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함하고, 여기서, 유도성 카스파제 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는 것인 트랜스포존.

청구항 45

제44항에 있어서, 비인간 서열이 제한 부위인 것인 트랜스포존.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 리간드 결합 영역 유도성 카스파제 폴리펩티드가 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 47

제46항에 있어서, FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드의 아미노산 서열이 서열의 36번 위치에 변형을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 48

제47항에 있어서, 변형이 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)인 것인 트랜스포존.

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, FKBP12 폴리펩티드가 GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE(서열 번호 23)를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 50

제49항에 있어서, FKBP12 폴리펩티드가

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG (서열 번호 24)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 51

제44항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 링커 영역이 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 아미노산에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 52

제51항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 링커 영역이 GGAGGAGGAGGATCC(서열 번호 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 53

제44항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가 서열의 87번 위치에 아르기닌(R)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 54

제44항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가 서열의 282번 위치에 알라닌(A)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 55

제44항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가

GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 27)

를 포함하는 아미노산에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 56

제55항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTG
CAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCT
GCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACC
GCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCT
CTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGC
AGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGA
TCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACT
GTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGC
CAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAAC
TCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTG
CCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATG
GCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGA
ACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGC
TGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGA
AAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 28)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 57

제44항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드가

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGGS
GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 29)

를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 58

제57항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드가

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAACTGCTGAAGCTGGAGGGAG
GAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATG
CCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAA
CAATGTGAACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATAT
TGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTG
AAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAG
CAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCC
AGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGT
CAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGG
GGAAAGCCAAAACTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCAC
GGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCT
GAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGAT
GCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCC
AGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACT
GGACGACATCTTTGAACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCT
GCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTG
CTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 30)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스포존.

청구항 59

제38항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 60

제39항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 자기 절단 펩티드가 CAR과 선별 유전자 사이에 위치하는 것인 트랜스포존.

청구항 61

제44항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 자기 절단 펩티드가 CAR과 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 사이에 위치하는 것인 트랜스포존.

청구항 62

제44항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 2개의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드가 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상류에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드가 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 하류에 위치하는 것인 트랜스포존.

청구항 63

제38항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드가 CAR의 상류에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드가 CAR의 하류에 위치하는 것인 트랜스포존.

청구항 64

제59항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 자기 절단 펩티드가 T2A 펩티드, GSG-T2A 펩티드, E2A 펩티드, GSG-E2A 펩티드, F2A 펩티드, GSG-F2A 펩티드, P2A 펩티드, 또는 GSG-P2A 펩티드를 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 65

제64항에 있어서, T2A 펩티드가 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 66

제64항에 있어서, GSG-T2A 펩티드가 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 67

제64항에 있어서, E2A 펩티드가 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 68

제64항에 있어서, GSG-E2A 펩티드가 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 69

제64항에 있어서, F2A 펩티드가 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 70

제64항에 있어서, GSG-F2A 펩티드가 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 71

제64항에 있어서, P2A 펩티드가 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 72

제64항에 있어서, GSG-P2A 펩티드가 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 트랜스포존.

청구항 73

제38항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 피기백(piggyBac) 트랜스포존인 것인 트랜스포존.

청구항 74

제38항 내지 제73항 중 어느 한 항의 트랜스포존을 포함하는 조성물.

청구항 75

제74항에 있어서, 트랜스포사제 효소를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 76

제75항에 있어서, 트랜스포사제 효소를 코딩하는 서열이 mRNA 서열인 것인 조성물.

청구항 77

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포사제가 피기백 트랜스포사제인 것인 조성물.

청구항 78

제77항에 있어서, 피기백 트랜스포사제가 서열 번호 12를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 피기백 트랜스포사제가 과활성 변이체이고, 여기서, 과활성 변이체가 서열 번호 12의 30, 165, 282, 및 538번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함하는 것인 조성물.

청구항 80

제79항에 있어서, 서열 번호 12의 30번 위치에서의 아미노산 치환이 이소류신(I)의 발린(V)으로의 치환(I30V)인 것인 조성물.

청구항 81

제79항에 있어서, 서열 번호 12의 165번 위치에서의 아미노산 치환이 글리신(G)의 세린(S)으로의 치환(G165S)인 것인 조성물.

청구항 82

제79항에 있어서, 서열 번호 12의 282번 위치에서의 아미노산 치환이 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환(M282V)인 것인 조성물.

청구항 83

제79항에 있어서, 서열 번호 12의 538번 위치에서의 아미노산 치환이 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환(N538K)인 것인 조성물.

청구항 84

제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포사제가 슈퍼 피기백(sPBo) 트랜스포사제인 것인 조성물.

청구항 85

제84항에 있어서, 슈퍼 피기백(sPBo) 트랜스포사제가 서열 번호 2를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 86

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는 벡터.

청구항 87

제86항에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인 것인 벡터.

청구항 88

제87항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 그의 임의의 조합으로부터 단리되거나, 또는 그로부터 유래된 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 89

제87항 또는 제88항에 있어서, 바이러스 벡터가 아데노 연관 바이러스로부터 단리되거나, 또는 그로부터 유래된 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 90

제87항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 재조합 벡터인 것인 벡터.

청구항 91

제86항에 있어서, 벡터가 나노입자 벡터인 것인 벡터.

청구항 92

제91항에 있어서, 나노입자 벡터가 핵산, 아미노산, 중합체, 미셀, 지질, 유기 분자, 무기 분자 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 벡터.

청구항 93

제86항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 선별 유전자를 추가로 포함하는 것인 벡터.

청구항 94

제93항에 있어서, 선별 유전자가 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩하는 것인 벡터.

청구항 95

제93항에 있어서, 선별 유전자가 선별적 세포 배양 조건에 의해 시험감염되었을 때, 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩하는 것인 벡터.

청구항 96

제95항에 있어서, 선별적 세포 배양 조건이 세포 생존능 또는 생존에 유해한 화합물을 포함하고, 여기서, 유전자 생성물이 상기 화합물에 대한 내성을 부여하는 것인 벡터.

청구항 97

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 선별 유전자가 *neo,* DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제), TYMS(티미딜레이트 신테타제), MGMT(O(6)-메틸구아닌-DNA 메틸트랜스퍼라제), 다중약물 내성 유전자(MDR1), ALDH1(알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리, 구성원 A1), FRANCF, RAD51C(RAD51 파라로그 C), GCS(글루코실세라미드 신타제), NKX2.2(NK2 호메오박스 2) 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 벡터.

청구항 98

제86항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가,

(a) 리간드 결합 영역,

(b) 링커, 및

(c) 절두된 카스파제 9 폴리펩티드

를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함하고, 여기서, 유도성 카스파제 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는 것인 벡터.

청구항 99

제98항에 있어서, 비인간 서열이 제한 부위인 것인 벡터.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 리간드 결합 영역 유도성 카스파제 폴리펩티드가 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 것인 벡터.

청구항 101

제100항에 있어서, FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드의 아미노산 서열이 서열의 36번 위치에 변형을 포함하는 것인 벡터.

청구항 102

제101항에 있어서, 변형이 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)인 것인 벡터.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, FKBP12 폴리펩티드가 GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (서열 번호 23)를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 104

제103항에 있어서, FKBP12 폴리펩티드가 GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG (서열 번호 24)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 105

제98항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 링커 영역이 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 아미노산에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 106

제105항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 링커 영역이 GGAGGAGGAGGATCC(서열 번호 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 107

제98항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가 서열의 87번 위치에 아르기닌(R)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 108

제98항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가 서열의 282번 위치에 알라닌(A)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 109

제98항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가 GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS (서열 번호 27)를 포함하는 아미노산에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 110

제109항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드가

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTG
CAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCT
GCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACC
GCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCT
CTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGC
AGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGA
TCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACT
GTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGC
CAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAAC
TCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTG
CCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATG
GCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGA
ACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGC
TGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGA
AAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 28)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 111

제98항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드가
GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGS
GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 29)

를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 112

제111항에 있어서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드가

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAACTGCTGAAGCTGGAGGGAG
GAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATG
CCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAA
CAATGTGAACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATAT
TGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTG
AAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAG
CAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCC
AGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGT
CAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGG
GGAAAGCCAAAACTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCAC
GGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCT
GAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGAT
GCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCC
AGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACT
GGACGACATCTTTGAACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCT
GCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTG
CTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 30)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 벡터.

청구항 113

제86항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하는 것인 벡터.

청구항 114

제86항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 자기 절단 펩티드가 CAR과 선별 유전자 사이에 위치하는 것인 벡터.

청구항 115

제98항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 자기 절단 펩티드가 CAR과 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 사이에 위치하는 것인 벡터.

청구항 116

제98항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존이 적어도 2개의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드가 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상류에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드가 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 하류에 위치하는 것인 벡터.

청구항 117

제86항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함하고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드가 CAR의 상류에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드가 CAR의 하류에 위치하는 것인 벡터.

청구항 118

제113항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 자기 절단 펩티드가 T2A 펩티드, GSG-T2A 펩티드, E2A 펩티드, GSG-E2A 펩티드, F2A 펩티드, GSG-F2A 펩티드, P2A 펩티드, 또는 GSG-P2A 펩티드를 포함하는 것인 벡터.

청구항 119

제118항에 있어서, T2A 펩티드가 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 120

제118항에 있어서, GSG-T2A 펩티드가 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 121

제118항에 있어서, E2A 펩티드가 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 122

제118항에 있어서, GSG-E2A 펩티드가 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 123

제118항에 있어서, F2A 펩티드가 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 124

제118항에 있어서, GSG-F2A 펩티드가 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 125

제118항에 있어서, P2A 펩티드가 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 126

제118항에 있어서, GSG-P2A 펩티드가 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 127

제86항 내지 제126항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 128

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항의 CAR을 포함하는 세포.

청구항 129

제38항 내지 제85항 중 어느 한 항의 트랜스포존 또는 트랜스포사제를 포함하는 세포.

청구항 130

제86항 내지 제126항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 131

제128항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 세포 표면 상에 CAR을 발현하는 것인 세포.

청구항 132

제128항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 면역 세포인 것인 세포.

청구항 133

제132항에 있어서, 면역 세포가 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해(NK) 유사 세포, 조혈 전구 세포, 말초 혈액(PB) 유래 T 세포 또는 제대혈(UCB) 유래 T 세포인 것인 세포.

청구항 134

제132항에 있어서, 면역 세포가 T 세포인 것인 세포.

청구항 135

제128항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 인공 항원 제시 세포인 것인 세포.

청구항 136

제128항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 종양 세포인 것인 세포.

청구항 137

제118항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 자가 유래 세포인 것인 세포.

청구항 138

제118항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 동종이계 세포인 것인 세포.

청구항 139

제128항 내지 제138항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 조성물.

청구항 140

(a) 세포 집단을 수득하는 단계;

(b) 세포 집단 내 적어도 하나의 세포의 세포막을 통해 키메라 항원 수용체(CAR)를 전달하는 데 충분한 조건하에서 세포 집단을 제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 CAR 또는 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 조성물에 접촉시켜 변형된 세포 집단을 생성하는 단계;

(c) CAR의 통합에 적합한 조건하에서 변형된 세포 집단을 배양하는 단계;

(d) 세포 표면 상에 CAR을 발현하는 적어도 하나의 세포를 변형된 세포 집단으로부터 확장시키고/거나, 선별하는 단계

를 포함하는, 세포의 표면 상에 CAR을 발현시키는 방법.

청구항 141

제140항에 있어서, 세포 집단이 백혈구를 포함하는 것인 방법.

청구항 142

제141항에 있어서, 세포 집단이 최적화된 비로 CD4+ 및 CD8+ 백혈구를 포함하는 것인 방법.

청구항 143

제142항에 있어서, 최적화된 비의 CD4+ 대 CD8+ 백혈구가 생체내에서는 자연적으로 존재하지 않는 것인 방법.

청구항 144

제140항에 있어서, 트랜스포존 또는 벡터가 CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 145

제140항에 있어서, 제38항 내지 제73항 중 어느 한 항의 트랜스포존이 CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 146

제144항 또는 제145항에 있어서, 트랜스포존이 피기백 트랜스포존을 포함하는 것인 방법.

청구항 147

제146항에 있어서, 트랜스포사제 효소를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드를 포함하는 조성물을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 148

제147항에 있어서, 트랜스포사제 효소를 코딩하는 서열이 mRNA 서열인 것인 방법.

청구항 149

제147항 또는 제148항에 있어서, 트랜스포사제가 피기백 트랜스포사제인 것인 방법.

청구항 150

제149항에 있어서, 피기백 트랜스포사제가 서열 번호 12를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 151

제149항 또는 제150항에 있어서, 피기백 트랜스포사제가 과활성 변이체이고, 여기서, 과활성 변이체가 서열 번호 12의 30, 165, 282, 및 538번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함하는 것인 방법.

청구항 152

제151항에 있어서, 서열 번호 12의 30번 위치에서의 아미노산 치환이 이소류신(I)의 발린(V)으로의 치환(I30V)인 것인 방법.

청구항 153

제151항에 있어서, 서열 번호 12의 165번 위치에서의 아미노산 치환이 글리신(G)의 세린(S)으로의 치환(G165S)인 것인 방법.

청구항 154

제151항에 있어서, 서열 번호 12의 282번 위치에서의 아미노산 치환이 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환(M282V)인 것인 방법.

청구항 155

제151항에 있어서, 서열 번호 12의 538번 위치에서의 아미노산 치환이 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환(N538K)인 것인 방법.

청구항 156

제149항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포사제가 슈퍼 피기백(sPBo) 트랜스포사제인 것인 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, 슈퍼 피기백(sPBo) 트랜스포사제가 서열 번호 2를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 158

제140항에 있어서, 제76항 내지 제116항 중 어느 한 항의 벡터가 CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 159

제140항, 제144항, 제145항, 및 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 집단 내 적어도 하나의 세포의 세포막을 통해 CAR을 코딩하는 서열을 전달하는 데 충분한 조건이 뉴클레오펙션을 포함하는 것인 방법.

청구항 160

제140항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, (b)의 세포 집단 내 적어도 하나의 세포의 세포막을 통해 CAR을 코딩하는 서열을 전달하는 데 충분한 조건이 명시된 전압에서의 1회 이상의 전기 펄스 적용, 완충제, 및 하나 인자의 보충 인자(들) 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 161

제160항에 있어서, 완충제가 PBS, HBSS, 옵티MEM(OptiMEM), BTX프레스(BTXpress), 아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucleofector), 인간 T 세포 뉴클레오펙션 완충제 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 162

제160항 또는 제161항에 있어서, 하나 이상의 보충 인자(들)가

(a) 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합;

(b) 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합;

(c) 세포 배지;

(d) 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제; 및

(e) 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약

을 포함하는 것인 방법.

청구항 163

제162항에 있어서, 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합이 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN 감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 164

제162항에 있어서, 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합이 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염, 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgCl2, Na2HPO4, NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313(Pop313), 크라운-5(Crown-5), 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 165

제162항에 있어서, 세포 배지가 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로(CellGro) DC 배지, CTS 옵티마이저(OpTimizer) T 세포 확장 SFM, 텍스MACS(TexMACS) 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF(ImmunoCult-XF) T 세포 확장 배지 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 166

제162항에 있어서, 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조

합의 억제제가 TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 억제제, TWS119, 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 167

제162항에 있어서, 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약이 pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 168

제140항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열의 통합에 적합한 조건이 완충제 및 하나 이상의 보충 인자(들) 중 적어도 하나를 포함하는 것인 방법.

청구항 169

제168항에 있어서, 완충제가 PBS, HBSS, 옵티MEM, BTX프레스, 아막사 뉴클레오펙터, 인간 T 세포 뉴클레오펙션 완충제 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 170

제168항 또는 제169항에 있어서, 하나 이상의 보충 인자(들)가

(a) 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합;

(b) 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합;

(c) 세포 배지;

(d) 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제; 및

(e) 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약

을 포함하는 것인 방법.

청구항 171

제170항에 있어서, 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합이 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN 감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 172

제170항에 있어서, 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합이 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염, 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgCl2, Na2HPO4, NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313, 크라운-5, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 173

제170항에 있어서, 세포 배지가 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 174

제170항에 있어서, 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제가 TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 억제제, TWS119, 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 175

제170항에 있어서, 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약이 pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 176

제140항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, (d)의 확장 및 선별이 순차적으로 진행되는 것인 방법.

청구항 177

제176항에 있어서, 확장이 선별 이전에 진행되는 것인 방법.

청구항 178

제176항에 있어서, 확장이 선별 이후에 진행되는 것인 방법.

청구항 179

제178항에 있어서, 추가의 선별이 확장 이후에 진행되는 것인 방법.

청구항 180

제140항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, (d)의 확장 및 선별이 동시에 진행되는 것인 방법.

청구항 181

제140항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 확장이 변형된 세포 집단의 적어도 하나의 세포를 항원과 접촉시켜 CAR을 통해 적어도 하나의 세포를 자극시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 182

제181항에 있어서, 항원이 기재 표면 상에 제공되는 것인 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, 기재가 하나의 비드, 또는 복수 개의 비드들인 것인 방법.

청구항 184

제183항에 있어서, 하나의 비드, 또는 복수 개의 비드들이 확장 후 변형된 세포 집단으로부터 분리되는 것인 방법.

청구항 185

제181항에 있어서, 항원이 세포 표면 상에 제공되는 것인 방법.

청구항 186

제185항에 있어서, 항원이 인공 항원 제시 세포의 표면 상에 제공되는 것인 방법.

청구항 187

제140항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스포존 또는 벡터가 선별 유전자를 포함하고, 여기서, 선별 단계는 변형된 세포 집단의 적어도 하나의 세포를, 선별 유전자가 부여하는 내성의 대상이 되는 화합물과 접촉시켜, 선별 유전자를 발현하는 세포는 선별에서 생존한 것으로 확인하고, 선별 유전자를 발현하지 못한 세포는 선별 단계에서 생존하지 못한 것으로 확인하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 188

제140항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 확장 및 선별 단계가 종점인 10일 및 14일을 포함하는, 10 내지 14일 기간 동안 진행되는 것인 방법.

청구항 189

제140항 내지 제188항 중 어느 한 항의 확장 및 선별된 세포 집단을 포함하는 조성물.

청구항 190

제37항, 제74항 내지 제85항, 제127항, 제139항, 및 제189항 중 어느 한 항의 조성물을 암 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 종양 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 암 치료를 필요로 하는 피험체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 종양 세포가 악성 종양 세포인 것인 방법.

청구항 192

제190항 또는 제191항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 193

제190항 또는 제191항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 194

제37항, 제74항 내지 제85항, 제127항, 제139항, 및 제189항 중 어느 한 항의 조성물을 자가면역 병태 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 피험체의 자가면역 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 자가면역 병태 치료를 필요로 하는 피험체에서 자가면역 병태를 치료하는 방법.

청구항 195

제194항에 있어서, 자가면역 세포가 피험체의 표적 세포 상의 자기 항원에 특이적으로 결합하는 림프구인 것인 방법.

청구항 196

제194항 또는 제195항에 있어서, 자가면역 세포가 B 림프구인 것인 방법.

청구항 197

제194항 또는 제195항에 있어서, 자가면역 세포가 T 림프구인 것인 방법.

청구항 198

제194항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 199

제194항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 200

제37항, 제74항 내지 제85항, 제127항, 제139항, 및 제189항 중 어느 한 항의 조성물을 감염 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 병원체를 포함하는 세포, 병원체와 소통하는 세포, 또는 병원체에 노출된 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 감염 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험체에서 감염을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 201

제200항에 있어서, 병원체가 박테리아, 바이러스, 효모, 또는 미생물인 것인 방법.

청구항 202

제200항 또는 제201항에 있어서, 병원체가 감염, 면역결핍 병태, 염증성 병태 및 증식성 장애 중 하나 이상의 것을 유도할 수 있는 것인 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 감염이 결핵, 소뇌증, 신경변성 또는 말라리아를 유발하는 것인 방법.

청구항 204

제202항 또는 제203항에 있어서, 감염이 피험체의 태아에서 소뇌증을 유발하는 것인 방법.

청구항 205

제204항에 있어서, 병원체가 바이러스이고, 여기서, 바이러스는 지카(Zika) 바이러스인 것인 방법.

청구항 206

제202항에 있어서, 면역결핍 병태가 후천성 면역결핍 증후군(AIDS)인 것인 방법.

청구항 207

제202항에 있어서, 증식성 장애가 암인 것인 방법.

청구항 208

제207항에 있어서, 암이 자궁경부암이고, 여기서, 병원체는 인간 유두종 바이러스(HPV)인 것인 방법.

청구항 209

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 210

제200항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 211

제37항, 제74항 내지 제85항, 제127항, 제139항, 및 제189항 중 어느 한 항의 조성물을 비만 세포병 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 비만 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 비만 세포병 치료를 필요로 하는 피험체에서 비만 세포병을 치료하는 방법.

청구항 212

제211항에 있어서, 비만 세포병이 비만 세포의 과도한 증식과 연관된 장애인 것인 방법.

청구항 213

제212항에 있어서, 비만 세포병이 비만 세포증인 것인 방법.

청구항 214

제213항에 있어서, 비만 세포병이 비만 세포의 비정상적인 활성과 연관된 장애인 것인 방법.

청구항 215

제214항에 있어서, 비만 세포병이 비만 세포 활성 증후군(MCAS), 알레르기 질환, 천식 또는 염증성 질환인 것인 방법.

청구항 216

제211항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 217

제211항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 218

제37항, 제74항 내지 제85항, 제127항, 제139항, 및 제189항 중 어느 한 항의 조성물을 변성 질환 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 유해한 세포 또는 노화 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 변성 질환 치료를 필요로 하는 피험체에서 변성 질환을 치료하는 방법.

청구항 219

제218항에 있어서, 변성 질환이 신경변성 장애, 대사 장애, 혈관 장애 또는 노화인 것인 방법.

청구항 220

제218항 또는 제219항에 있어서, 변성 질환이 신경변성 장애이고, 여기서, 유해한 세포 또는 노화 세포가 줄기세포, 면역 세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포인 것인 방법.

청구항 221

제218항 또는 제219항에 있어서, 변성 질환이 대사 장애이고, 여기서, 유해한 세포 또는 노화 세포가 줄기세포, 체세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포인 것인 방법.

청구항 222

제218항 또는 제219항에 있어서, 변성 질환이 혈관 장애이고, 여기서, 유해한 세포 또는 노화 세포가 줄기세포, 체세포, 면역 세포, 내피 세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포인 것인 방법.

청구항 223

제218항 또는 제219항에 있어서, 변성 질환이 노화이고, 여기서, 유해한 세포 또는 노화 세포가 난모세포,

정자, 줄기 세포, 체세포, 면역 세포, 내피 세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포인 것인 방법.

청구항 224

제218항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 225

제218항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, 제139항 또는 제185항의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단인 것인 방법.

청구항 226

제38항 내지 제73항 중 어느 한 항의 트랜스포존을 포함하는 세포를 포함하는 조성물을 세포 요법 변형을 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 아폽토시스는 세포를 유도제와 접촉시킴으로써 세포에서 선택적으로 유도될 수 있는 것인, 세포 요법 변형을 필요로 하는 피험체에서 세포 요법을 변형시키는 방법.

청구항 227

제86항 내지 제126항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 세포를 포함하는 조성물을 세포 요법 변형을 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 아폽토시스는 세포를 유도제와 접촉시킴으로써 세포에서 선택적으로 유도될 수 있는 것인, 세포 요법 변형을 필요로 하는 피험체에서 세포 요법을 변형시키는 방법.

청구항 228

제226항 또는 제227항에 있어서, 세포가 자가 유래 세포인 것인 방법.

청구항 229

제226항 또는 제227항에 있어서, 세포가 동종이계 세포인 것인 방법.

청구항 230

제226항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 요법이 입양 세포 요법인 것인 방법.

청구항 231

제226항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 변형시키는 것이 세포 요법의 종료인 것인 방법.

청구항 232

제226항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 변형시키는 것이 세포 요법에서 제공된 세포의 일부의 고갈인 것인 방법.

청구항 233

제226항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 유도체의 억제제를 투여하여 세포 요법의 변형을 억제시킴으로써 세포 요법의 기능 및/또는 효능을 회복시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2016년 7월 15일 출원된 가출원 USSN 62/362,746, 2016년 10월 6일 출원된 가출원 USSN 62/405,180, 및 2017년 5월 8일 출원된 가출원 USSN USSN 62/503,127의 이익을 주장하며, 상기 가출원 각각의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록의 포함**

[0004] 2017년 7월 13일 작성되고, 그 크기가 55 KB인, 파일명 "POTH-008_001WO_SeqList"의 텍스트 파일의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0005] **본 개시내용의 분야**

[0006] 본 개시내용은 분자 생물학, 및 더욱 구체적으로, 키메라 항원 수용체, 하나 이상의 CAR을 함유하는 트랜스포존 뿐만 아니라, 상기의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 당업계에서는 종래의 항체 서열 또는 그의 단편을 사용하지 않고 면역 세포의 특이성을 지정하는 방법이 오랫동안 요구되어져 왔지만, 이는 충족되지 못했다. 본 개시내용은 우수한 키메라 항원 수용체를 제공한다.

발명의 내용

[0008] **요약**

[0009] 본 개시내용은 (a) 항원 인식 영역을 포함하는 엑토도메인으로서, 여기서, 항원 인식 영역은 적어도 하나의 센티린(Centyrin)을 포함하는 것인 엑토도메인; (b) 막관통 도메인, 및 (c) 적어도 하나의 공자극 도메인을 포함하는 엔도도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor)를 제공한다. 본 개시내용 전역에 걸쳐 사용되는 바, 센티린을 포함하는 CAR은 CARTyrin으로 지칭된다. 특정 실시양태에서, 항원 인식 영역은 2개의 센티린을 포함하여 이중특이적 또는 탠덤 CAR을 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원 인식 영역은 3개의 센티린을 포함하여 삼중특이적 CAR을 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 엑토도메인은 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 특정 실시양태에서, 엑토도메인은 항원 인식 영역과 막관통 도메인 사이에 힌지를 추가로 포함할 수 있다.

[0010] 본 개시내용은 (a) 항원 인식 영역을 포함하는 엑토도메인으로서, 여기서, 항원 인식 영역은 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 또는 항체 모방체를 포함하는 것인 엑토도메인; (b) 막관통 도메인, 및 (c) 적어도 하나의 공자극 도메인을 포함하는 엔도도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 항원 인식 영역은 2개의 스캐폴드 단백질 또는 항체 모방체를 포함하여 이중특이적 또는 탠덤 CAR을 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원 인식 영역은 3개의 단백질 스캐폴드 또는 항체 모방체를 포함하여 삼중특이적 CAR을 생성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 엑토도메인은 신호 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 특정 실시양태에서, 엑토도메인은 항원 인식 영역과 막관통 도메인 사이에 힌지를 추가로 포함할 수 있다.

[0011] 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 신호 펩티드는 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR 신호 펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 신호 펩티드는 인간 CD8α 신호 펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 인간 CD8α 신호 펩티드는 MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 3)를 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 인간 CD8α 신호 펩티드는 MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 3)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 3)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 인간 CD8α 신호 펩티드는 atggcactgccagtcaccgccctgctgctgcctctggctctgctgctgcacgcagctagacca(서열 번호 45)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0012] 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR 막관통 도메인을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 막관통 도메인은 인간 CD8α 막관통 도메인을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. CD8α 막관통 도메인은 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열 번호 4)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열 번호 4)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. CD8α 막관통 도메인은 atctacatttgggcaccactggccgggacctgtggagtgctgctgctgagcctggtcatcacactgtactgc(서열 번호 5)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0013] 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 엔도도메인은 인간 CD3ζ 엔도도메인을 포함할 수 있다.

[0014] 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 공자극 도메인은 인간 4-1BB, CD28, CD40, ICOS, MyD88, OX-40 세포내 세그먼트, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태

에서, 적어도 하나의 공자극 도메인은 CD28 및/또는 4-1BB 공자극 도메인을 포함할 수 있다. CD28 공자극 도메인은 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R (서열 번호 6)을 포함하는 아미노산 서열, 또는 RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R (서열 번호 6)을 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. CD28 공자극 도메인은 cgcgtgaagtttagtcgatcagcagatgccccagcttacaaacagggacagaaccagctgtataacgagctgaatctgggccgccga gaggaatatgacgtgctggataagcggagaggacgcgaccccgaaatgggaggcaagcccaggcgcaaaaaccctcaggaagg cctgtataacgagctgcagaaggacaaaatggcagaagcctattctgagatcggcatgaaggggagcgacggagaggcaaagg gcacgatgggctgtaccagggactgagcaccgccacaaaggacacctatgatgctctgcatatgcaggcactgcctccaagg (서열 번호 7)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 4-1BB 공자극 도메인은 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열 번호 8)을 포함하는 아미노산 서열, 또는 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열 번호 8)을 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 4-1BB 공자극 도메인은 aagagaggcaggaagaaactgctgtatattttcaaacagcccttcatgcgccccgtgcagactacccaggaggaagacgggtgctcc tgtcgattccctgaggaagaggaaggcgggtgtgagctg (서열 번호 9)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 4-1BB 공자극 도메인은 막관통 도메인과 CD28 공자극 도메인 사이에 위치할 수 있다.

[0015] 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 힌지는 인간 CD8α, IgG4, 및/또는 CD4 서열로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 CAR의 특정 실시양태에서, 힌지는 인간 CD8α 서열로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 힌지는 TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 10)를 포함하는 인간 CD8α 아미노산 서열, 또는 TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 10)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 인간 CD8α 힌지 아미노산 서열은 actaccacaccagcacctagaccaccaactccagctccaaccatcgcgagtcagcccctgagtctgagacctgaggcctgcaggcc agctgcaggaggagctgtgcacaccaggggcctggacttcgcctgcgac (서열 번호 11)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0016] 본 개시내용의 센티린은 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 센티린은 적어도 하나의 피브로넥틴 타입 III(FN3: fibronectin type III) 도메인의 공통 서열을 포함하는 단백질 스캐폴드로서, 여기서, 스캐폴드는 인간 MUC1에 결합할 수 있는 것인, 단백질 스캐폴드를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인은 인간 단백질로부터 유래된 것일 수 있다. 인간 단백질은 테나신(Tenascin)-C일 수 있다. 공통 서열은

[0017] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (서열 번호 1), 또는

[0018] MLPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYD LTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (서열 번호 13)을 포함할 수 있다. 공통 서열은 atgctgcctgcaccaaagaacctggtggtgtctcatgtgacagaggatagtgccagactgtcatggactgctcccgacgcagccttcg atagttttatcatcgtgtaccgggagaacatcgaaaccggcgaggccattgtcctgacagtgccagggtccgaacgctcttatgacctg acagatctgaagcccggaactgagtactatgtgcagatcgccggcgtcaaaggaggcaatatcagcttccctctgtccgcaatcttcac caca (서열 번호 14)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 공통 서열은 (a) 공통 서열의 13-16번 위치에 아미노산 잔기 TEDS(서열 번호 15)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 A-B 루프; (b) 공통 서열의 22-28번 위치에 아미노산 잔기 TAPDAAF(서열 번호

16)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 B-C 루프; (c) 공통 서열의 38-43번 위치에 아미노산 잔기 SEKVGE(서열 번호 17)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 C-D 루프; (d) 공통 서열의 51-54번 위치에 아미노산 잔기 GSER(서열 번호 18)을 포함하거나, 또는 그로 구성된 D-E 루프; (e) 공통 서열의 60-64번 위치에 아미노산 잔기 GLKPG(서열 번호 19)를 포함하거나, 또는 그로 구성된 E-F 루프; (f) 공통 서열의 75-81번 위치에 아미노산 잔기 KGGHRSN(서열 번호 20)을 포함하거나, 또는 그로 구성된 F-G 루프; 또는 (g) (a)-(f)의 임의의 조합 내의 하나 이상의 위치에서 변형될 수 있다. 본 개시내용의 센티린은 적어도 5개의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인, 적어도 10개의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인 또는 적어도 15개의 피브로넥틴 타입 III(FN3) 도메인의 공통 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하, 10^{-12} M 이하, 10^{-13} M 이하, 10^{-14} M 이하, 및 10^{-15} M 이하인 K_D로부터 선택되는 적어도 하나의 친화도로 항원에 결합할 수 있다. K_D는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정될 수 있다.

[0019] 본 개시내용은 항BCMA CARTyrin(본원에서 A08로 지칭)으로서,

MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQE
VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGG
SGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLR
RRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFP
GAVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPED
ESPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYV
ETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSGSGEG
RGSLLTCGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARP**MLPAPKNLVVSRITEDSAR**
LSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVVITG
VKGGRFSSPLVASFTTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT
YDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDF
PWPPLRNESRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSREL
KEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFV
TRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND

(서열 번호 21, 굵은체로 표시된 서열은 A08 센티린의 아미노산 서열을 포함한다)

[0020] 를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 항BCMA CARTyrin을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 A08 CARTyrin은

atgggggtccaggtcgagactatttcaccaggggatgggcgaacatttccaaaaaggggccagacttgcgtcgtgcattacaccggg
atgctggaggacgggaagaaagtggacagctccagggatcgcaacaagcccttcaagttcatgctgggaaagcaggaagtgatcc
gaggatgggaggaaggcgtggcacagatgtcagtcggccagcgggccaaactgaccattagccctgactacgcttatggagcaac
aggccacccagggatcattccccctcatgccaccctggtcttcgatgtggaactgctgaagctggagggaggaggaggatccggatt
tggggacgtgggggccctggagtctctgcgaggaaatgccgatctggcttacatcctgagcatggaaccctgcggccactgtctgatc
attaacaatgtgaacttctgcagagaaagcggactgcgaacacggactggctccaatattgactgtgagaagctgcggagaaggttct
ctagtctgcactttatggtcgaagtgaaaggggatctgaccgccaagaaaatggtgctggccctgctggagctggctcagcaggacc
atggagctctggattgctgcgtggtcgtgatcctgtcccacgggtgccaggcttctcatctgcagttccccggagcagtgtacggaaca
[0021] gacggctgtcctgtcagcgtggagaagatcgtcaacatcttcaacggcacttcttgccctagtctgggggggaaagccaaaactgttcttt

atccaggcctgtggcggggaacagaaagatcacggcttcgaggtggccagcaccagccctgaggacgaatcaccagggagcaac
cctgaaccagatgcaactccattccaggagggactgaggacctttgaccagctggatgctatctcaagcctgcccactcctagtgacat
tttcgtgtcttacagtaccttcccaggctttgtctcatggcgcgatcccaagtcagggagctggtacgtggagacactggacgacatctttt
gaacagtgggcccattcagaggacctgcagagcctgctgctgcgagtggcaaacgctgtctctgtgaagggcatctacaaacagatg
cccgggtgcttcaattttctgagaaagaaactgttctttaagacttccggatctggagagggaaggggaagcctgctgacctgtggaga
cgtggaggaaaacccaggaccaatggcactgccagtcaccgccctgctgctgcctctggctctgctgctgcacgcagctagaccaat
gctgcctgcaccaaagaacctggtggtgagccggatcacagaggactccgccagactgtcttggaccgcccctgacgccgccttcg
attcctttccaatccggtacatcgagacactgatctggggcgaggccatctggctggacgtgcccggctctgagaggagctacgatct
gacaggcctgaagcctggcaccgagtatgcagtggtcatcacaggagtgaagggcggcaggttcagctcccctctggtggcctctttt
accacaaccacaaccctgcccccagacctcccacacccgcccctaccatcgcgagtcagcccctgagtctgagacctgaggcctg
caggccagctgcaggaggagctgtgcacaccaggggcctggacttcgcctgcgacatctacatttgggcaccactggccgggacct
gtggagtgctgctgctgagcctggtcatcacactgtactgcaagagaggcaggaagaaactgctgtatattttcaaacagcccttcatg
cgccccgtgcagactacccaggaggaagacgggtgctcctgtcgattccctgaggaagaggaaggcgggtgtgagctgcgcgtga
agtttagtcgatcagcagatgccccagcttacaaacagggacagaaccagctgtataacgagctgaatctgggccgccgagaggaat
atgacgtgctggataagcggagaggacgcgaccccgaaatgggaggcaagcccaggcgcaaaaaccctcaggaaggcctgtata
acgagctgcagaaggacaaaatggcagaagcctattctgagatcggcatgaaggggagcgacggagaggcaaagggcacgatg
ggctgtaccagggactgagcaccgccacaaaggacacctatgatgctctgcatatgcaggcactgcctccaaggggaagtggagaa
ggacgaggatcactgctgacatgcggcgacgtggaggaaaaccctggcccaatggtcgggtctctgaattgtatcgtcgccgtgagt
cagaacatgggcattgggaagaatggcgatttcccatggccacctctgcgcaacgagtcccgatactttcagcggatgacaactacct
cctctgtggaagggaaacagaatctggtcatcatgggaaagaaaacttggttcagcattccagagaagaaccggcccctgaaaggca
gaatcaatctggtgctgtcccgagaactgaaggagccaccacagggagctcactttctgagccggtccctggacgatgcactgaagc
tgacagaacagcctgagctggccaacaaagtcgatatggtgtggatcgtcgggggaagttcagtgtataaggaggccatgaatcacc
ccggccatctgaaactgttcgtcacacggatcatgcaggactttgagagcgatactttctttcctgaaattgacctggagaagtacaaact
gctgcccgaatatcctggcgtgctgtccgatgtccaggaagagaaaggcatcaaatacaagttcgaggtctatgagaagaatgac
(서열 번호 22, 상기 서열은 또한 본원에서 P-BMCA-101의 오픈 리딩 프레임(ORF: open reading frame)으로서 지칭된다)

[0022] 를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0023] 본 개시내용은 본 개시내용의 CAR, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0024] 본 개시내용은 본 개시내용의 CAR을 포함하는 트랜스포존을 제공한다.

[0025] 본 개시내용의 트랜스포존은 트랜스포존을 발현하는 세포의 확인, 농축, 및/또는 단리를 위한 선별 유전자를 포함할 수 있다. 예시적인 선별 유전자는 세포 생존능 및 생존에 필수적인 임의의 유전자 생성물(예컨대, 전사체, 단백질, 효소)을 코딩한다. 예시적인 선별 유전자는 선별 유전자에 의해 코딩되는 유전자 생성물 부재하에서 세포의 감수성 대상이 되는 (또는 그가 세포에 치명적일 수 있는) 약물 시험감염에 대한 내성을 부여하는 데 필수적인 임의의 유전자 생성물(예컨대, 전사체, 단백질, 효소)을 코딩한다. 예시적인 선별 유전자는 선별 유전자의 부재하에서 세포 생존능 및/또는 생존에 필수적인 하나 이상의 영양소가 결핍된 세포 배지 중에서의 생존능 및/또는 생존에 필수적인 임의의 유전자 생성물(예컨대, 전사체, 단백질, 효소)을 코딩한다. 예시적인 선별 유전자로는 *neo*(네오마이신에 대한 내성 부여), DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제 코딩 및 메토트렉세이트에 대한 내성 부여), TYMS(티미딜레이트 신테타제 코딩), MGMT(O(6)-메틸구아닌-DNA 메틸트랜스퍼라제 코딩), 다중약물 내성 유전자(MDR1), ALDH1(알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리, 구성원 A1 코딩), FRANCF, RAD51C(RAD51 파라로그 C 코딩), GCS(글루코실세라미드 신타제 코딩), 및 NKX2.2(NK2 호메오박스 2 코딩)를 포함하나, 이에 제한되지 않다.

[0026] 본 개시내용의 트랜스포존은 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함하는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 다량체 리간드 결합 영역일 수 있다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 또한 "iC9 안전 스위치"로도 지칭될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스포존은 (a) 리간드

결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스포존은 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스포존은 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 리간드 결합 영역의 아미노산 서열은 서열의 36번 위치에 변형을 포함할 수 있다. 변형은 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)일 수 있다. 특정 실시양태에서, FKBP12 폴리펩티드는

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (서열 번호 23)

를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, FKBP12 폴리펩티드는

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG (서열 번호 24)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 가지는 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함할 수 있는 리간드 결합 영역에 특이적인 유도제는, 둘 모두가 합성 약물인, AP20187 및/또는 AP1903을 포함한다.

[0027] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 링커 영역은 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 아미노산, 또는 GGAGGAGGAGGATCC (서열 번호 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 링커를 코딩하는 핵산 서열은 제한 부위를 포함하지 않는다.

[0028] 본 개시내용의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는 서열의 87번 위치에 아르기닌(R)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는 서열의 282번 위치에 알라닌(A)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는

GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 27)

를 포함하는 아미노산 서

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTG
CAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCT
GCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACC
GCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCT
CTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGC
AGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGA
TCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACT
GTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGC
CAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAAC
TCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTG
CCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATG
GCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGA
ACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGC
TGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGA
AAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 28)

열, 또는 를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0029] 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGGS
GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 29)

를 포함하는 아미노산 서

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAACTGCTGAAGCTGGAGGGAG
GAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATG
CCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAA
CAATGTGAACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATAT
TGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTG
AAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAG
CAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCC
AGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGT
CAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGG
GGAAAGCCAAAACTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCAC
GGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCT
GAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGAT
GCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCC
AGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACT
GGACGACATCTTTGAACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCT
GCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTG
CTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 30)

열, 또는 를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0030] 본 개시내용의 트랜스포존은 예를 들어, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin 중 하나 이상의 것과 본 개시내용의 선별 유전자 사이에 위치하는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin 중 하나 이상의 것과 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 사이에 위치하는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은, 제1 자기 절단 펩티드는 예를 들어, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상류 또는 그의 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하고, 제2의 처음 자기 절단 펩티드는 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 하류 또는 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하는 것인, 적어도 2개의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다.

[0031] 적어도 하나의 자기 절단 펩티드는 예를 들어, T2A 펩티드, GSG-T2A 펩티드, E2A 펩티드, GSG-E2A 펩티드, F2A 펩티드, GSG-F2A 펩티드, P2A 펩티드, 또는 GSG-P2A 펩티드를 포함할 수 있다. T2A 펩티드는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열, GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 ggatctggagagggaaggggaagcctgctgacctgtggagacgtggaggaaaacccaggacca(서열 번호 33)를 포함하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. E2A 펩티드는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-E2A 펩티드는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. F2A 펩티드는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-F2A 펩티드는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열, 또는

GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. P2A 펩티드는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-P2A 펩티드는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

[0032] 본 개시내용의 트랜스포존은 제1 자기 절단 펩티드는 예를 들어, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin 중 하나 이상의 것의 상류 또는 그의 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하고, 제2의 처음 자기 절단 펩티드는 예를 들어, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin 중 하나 이상의 것의 하류에 위치하는 것인, 제1 및 제2 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있다. 제1 및/또는 제2 자기 절단 펩티드를 예를 들어, a T2A 펩티드, GSG-T2A 펩티드, E2A 펩티드, GSG-E2A 펩티드, F2A 펩티드, GSG-F2A 펩티드, P2A 펩티드, 또는 GSG-P2A 펩티드를 포함할 수 있다. T2A 펩티드는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 ggatctggagagggaaggggaagcctgctgacctgtggagacgtggaggaaaacccaggacca(서열 번호 33)를 포함하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. E2A 펩티드는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-E2A 펩티드는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. F2A 펩티드는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-F2A 펩티드는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. P2A 펩티드는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-P2A 펩티드는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

[0033] 본 개시내용은 본 개시내용의 트랜스포존을 포함하는 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 트랜스포사제 효소를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드를 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제 효소를 코딩하는 서열은 mRNA 서열일 수 있다.

[0034] 본 개시내용의 트랜스포존은 피기백(piggyBac) 트랜스포존을 포함할 수 있다. 본 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포존은 2개의 시스 조절 인슐레이터 요소가 측면에 위치하는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드 DN트랜스포존이다. 특정 실시양태에서, 트랜스포존은 피기백 트랜스포존이다. 본 개시내용의 트랜스포사제 효소는 피기백 트랜스포사제 또는 호환가능한 효소를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 및 특히, 트랜스포존이 피기백 트랜스포존인 상기 실시양태에서, 트랜스포사제는 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™(SPB: Super piggyBac™) 트랜스포사제이다. 특정 실시양태에서, 및 특히, 트랜스포사제가 슈퍼 피기백™(SPB) 트랜스포사제인 상기 실시양태에서, 트랜스포사제를 코딩하는 서열은 mRNA 서열이다.

[0035] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 피기백(PB) 트랜스포사제 효소는

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

(서열 번호 12)

와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 사이의 임의의 백분율로 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 그로 구성될 수 있다.

[0036] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열:

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

(서열 번호 12)

[0037] 의 30, 165, 282, 또는 538번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다.

[0038] 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 30, 165, 282, 또는 538번 위치 중 2개 이상의 위치에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 30, 165, 282, 또는 538번 위치 중 3개 이상의 위치에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 하기 위치 30, 165, 282, 및 538번 위치 각각에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 30번 위치에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 165번 위치에서의 아미노산 치환은 글리신(G)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 282번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 538번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환이다.

[0039] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스포사제 효소는 30번 위치에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)의 발린(V)으로의 치환이고, 165번 위치에서의 아미노산 치환은 글리신(G)의 세린(S)으로의 치환이고, 282번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이고, 538번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환으로의 치환인 것인, 서열 번호 12의 서열의 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스

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

(서열 번호 2)

포사제 효소는 와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 사이의 임의의 백분율로 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 그로 구성될 수 있다.

[0040] 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 3, 46, 82, 103, 119, 125, 177, 180, 185, 187, 200, 207, 209, 226, 235, 240, 241, 243, 258, 296, 298, 311, 315, 319, 327, 328, 340, 421, 436, 456, 470, 486, 503, 552, 570 및 591번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 특정 실시양태에서, 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 46, 119, 125, 177, 180, 185, 187, 200, 207, 209, 226, 235, 240, 241, 243, 296, 298, 311, 315, 319, 327, 328, 340, 421, 436, 456, 470, 485, 503, 552 및 570번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 3번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 아스파라긴(N)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 46번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 46번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 트레오닌(T)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 82번 위치에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)의 트립토판(W)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 103번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 119번 위치에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 125번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 125번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 177번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 177번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 히스티딘(H)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 180번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 류신(L)로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 180번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 180번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 185번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 187번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 200번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 트립토판(W)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 207번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 209번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 226번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 235번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 아르기닌(R)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 240번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 241번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 류신(L)로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 243번 위치에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에

서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 258번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 296번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 트립토판(W)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 296번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 티로신(Y)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 296번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 298번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 298번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 298번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 311번 위치에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 311번 위치에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)의 발린으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 315번 위치에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 319번 위치에서의 아미노산 치환은 트레오닌(T)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 327번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 아르기닌(R)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 328번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 340번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 340번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 421번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파르트산(D)의 히스티딘(H)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 436번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 456번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 티로신(Y)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 470번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 485번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 503번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 503번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 552번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 570번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 트레오닌(T)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 591번 위치에서의 아미노산 치환은 글루타민(Q)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 591번 위치에서의 아미노산 치환은 글루타민(Q)의 아르기닌(R)으로의 치환이다.

[0041] 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서,피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 상기의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570번 위치 중 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 상기의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570번 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 상기의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 103번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 194번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 372번 위치에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 375번 위치에서의 아미노산 치환은 리신(K)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 450번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파르트산(D)의 아스파라긴(N)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 509번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 570번 위치에서의 아미

노산 치환은 아스파라긴(N)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환을 포함할 수 있다. 피기백™ 트랜스포사제 효소가 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환을 포함할 수 있는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 또는 서열 번호 60의 372, 375 및 450번 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환, 서열 번호 12의 372번 위치에 아르기닌(R)의 알라닌(A)으로의 치환, 및 서열 번호 12의 375번 위치에 리신(K)의 알라닌(A)으로의 치환을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환, 서열 번호 12의 372번 위치에 아르기닌(R)의 알라닌(A)으로의 치환, 서열 번호 12의 375번 위치에 리신(K)의 알라닌(A)으로의 치환, 및 서열 번호 12의 450번 위치에 아스파르트산(D)의 아스파라긴(N)으로의 치환을 포함할 수 있다.

[0042] 본 개시내용은 본 개시내용의 CAR을 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 벡터는 재조합 벡터일 수 있다.

[0043] 본 개시내용의 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스 또는 그의 임의의 조합으로부터 단리 또는 유래된 서열을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스(AAV: adeno-associated virus)로부터 단리 또는 유래된 서열을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 재조합 AAV(rAAV: recombinant AAV)를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 예시적인 아데노 연관 바이러스 및 재조합 아데노 연관 바이러스는 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin을 코딩하는 서열 옆에 시스로 위치하는 2개 이상의 역위 말단 반복부(ITR: inverted terminal repeat) 서열을 포함한다. 본 개시내용의 예시적인 아데노 연관 바이러스 및 재조합 아데노 연관 바이러스는 모든 혈청형(예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, 및 AAV9)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 예시적인 아데노 연관 바이러스 및 재조합 아데노 연관 바이러스는 자기 상보적 AAV(scAAV: self-complementary AAV) 및 한 혈청형의 게놈 및 또 다른 혈청형의 캡시드를 함유하는 AAV 하이브리드(예컨대, AAV2/5, AAV-DJ 및 AAV-DJ8)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 예시적인 아데노 연관 바이러스 및 재조합 아데노 연관 바이러스는 rAAV-LK03을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 개시내용의 바이러스 벡터는 선별 유전자를 포함할 수 있다. 선별 유전자는 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩할 수 있다. 선별 유전자는 선별적 세포 배양 조건에 의해 시험감염되었을 때, 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩할 수 있다. 선별적 세포 배양 조건은 세포 생존능 또는 생존에 유해한 화합물을 포함할 수 있고, 여기서, 유전자 생성물은 상기 화합물에 대한 내성을 부여한다. 본 개시내용의 예시적인 선별 유전자는 *neo*(네오마이신에 대한 내성 부여), DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제 코딩 및 메토트렉세이트에 대한 내성 부여), TYMS(티미딜레이트 신테타제 코딩), MGMT(O(6)-메틸구아닌-DNA 메틸트랜스퍼라제 코딩), 다중약물 내성 유전자(MDR1), ALDH1(알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리, 구성원 A1 코딩), FRANCF, RAD51C(RAD51 파라로그 C 코딩), GCS(글루코실세라미드 신타제 코딩), 및 NKX2.2(NK2 호메오박스 2 코딩)를 포함하나, 이에 제한되지 않다.

[0045] 본 개시내용의 바이러스 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함하는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 다량체 리간드 결합 영역일 수 있다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 또한 "iC9 안전 스위치"로도 지칭될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 리간드 결합 영역의 아미노산 서열은 서열의 36번 위치에 변형을 포함할 수

있다. 변형은 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)일 수 있다. 특정 실시양태에서, FKBP12 폴리펩티드는 GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (서열 번호 23)를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, FKBP12 폴리펩티드는

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG (서열 번호 24)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 가지는 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함할 수 있는 리간드 결합 영역에 특이적인 유도제는, 둘 모두가 합성 약물인, AP20187 및/또는 AP1903을 포함한다.

[0046] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 링커 영역은 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 아미노산, 또는 GGAGGAGGAGGATCC (서열 번호 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 링커를 코딩하는 핵산 서열은 제한 부위를 포함하지 않는다.

[0047] 본 개시내용의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는 서열의 87번 위치에 아르기닌(R)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는 서열의 282번 위치에 알라닌(A)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는

GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 27)

를 포함하는 아미노산 서

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTG
CAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCT
GCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACC
GCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCT
CTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGC
AGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGA
TCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACT
GTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGC
CAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAAC
TCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTG
CCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATG
GCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGA
ACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGC
TGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGA
AAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 28)

열, 또는 를 포함하는 핵

산 서열에 의해 코딩된다.

[0048] 폴리펩티드가 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 것인, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGGS
GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 29)

를 포함하는 아미노산 서열, 또는

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAACTGCTGAAGCTGGAGGGAG
GAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATG
CCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAA
CAATGTGAACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATAT
TGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTG
AAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAG
CAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCC
AGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGT
CAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGG
GGAAAGCCAAAACTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCAC
GGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCT
GAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGAT
GCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCC
AGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACT
GGACGACATCTTTGAACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCT
GCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTG
CTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 30)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0049] 본 개시내용의 바이러스 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 자기 절단 펩티드는 CAR과 선별 유전자 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드는 CAR의 상류에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드는 CAR의 하류에 위치한다. 본 개시내용의 바이러스 벡터는 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin 중 하나 이상의 것과 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 사이에 위치하는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 바이러스 벡터는, 제1 자기 절단 펩티드는 예를 들어, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상류 또는 그의 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하고, 제2의 처음 자기 절단 펩티드는 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 하류 또는 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하는 것인, 적어도 2개의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다. 자기 절단 펩티드는 예를 들어, T2A 펩티드, GSG-T2A 펩티드, E2A 펩티드, GSG-E2A 펩티드, F2A 펩티드, GSG-F2A 펩티드, P2A 펩티드, 또는 GSG-P2A 펩티드를 포함할 수 있다. T2A 펩티드는

EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열, GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 ggatctggagagggaaggggaagcctgctgacctgtggagacgtggaggaaaacccaggacca(서열 번호 33)를 포함하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. E2A 펩티드는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-E2A 펩티드는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. F2A 펩티드는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-F2A 펩티드는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. P2A 펩티드는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-P2A 펩티드는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

[0050] 본 개시내용은 본 개시내용의 CAR을 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 벡터는 나노입자이다. 본 개시내용의 예시적인 나노입자 벡터로는 핵산(예컨대, RNA, DNA, 합성 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 그의 임의의 조합), 아미노산(L-아미노산, D-아미노산, 합성 아미노산, 변형된 아미노산, 또는 그의 임의의 조합), 중합체(예컨대, 폴리머좀), 미셀, 지질(예컨대, 리포솜), 유기 분자(예컨대, 탄소 원자, 시트, 섬유, 튜브), 무기 분자(예컨대, 인산칼슘 또는 금) 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 나노입자 벡터는 세포막을 통해 수동적으로 또는 능동적으로 수송될 수 있다.

[0051] 본 개시내용의 나노입자 벡터는 선별 유전자를 포함할 수 있다. 선별 유전자는 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩할 수 있다. 선별 유전자는 선별적 세포 배양 조건에 의해 시험감염되었을 때, 세포 생존능 및 생존에 필수적인 유전자 생성물을 코딩할 수 있다. 선별적 세포 배양 조건은 세포 생존능 또는 생존에 유해한 화합물을 포함할 수 있고, 여기서, 유전자 생성물은 상기 화합물에 대한 내성을 부여한다. 본 개시내용의 예시적인 선별 유전자는 *neo*(네오마이신에 대한 내성 부여), DHFR(디하이드로폴레이트 리덕타제 코딩 및 메토트렉세이트에 대한 내성 부여), TYMS(티미딜레이트 신테타제 코딩), MGMT(O(6)-메틸구아닌-DNA 메틸트랜스퍼라제 코딩), 다중약물 내성 유전자(MDR1), ALDH1(알데히드 데하이드로게나제 1 패밀리, 구성원 A1 코딩), FRANCF, RAD51C(RAD51 파라로그 C 코딩), GCS(글루코실세라미드 신타제 코딩), 및 NKX2.2(NK2 호메오박스 2 코딩)를 포함하나, 이에 제한되지 않다.

[0052] 본 개시내용의 나노입자 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함하는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 다량체 리간드 결합 영역일 수 있다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 또한 "iC9 안전 스위치"로도 지칭될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 나노입자 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 나노입자 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 나노입자 벡터는 (a) 리간드 결합 영역, (b) 링커, 및 (c) 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 리간드 결합 영역의 아미노산 서열은 서열의 36번 위치에 변형을 포함할 수 있다. 변형은 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)일 수 있다. 특정 실시양태에서,

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE (서열 번호 23)

FKBP12 폴리펩티드는 를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, FKBP12 폴리펩티드는

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG (서열 번호 24)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 가지는 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함할 수 있는 리간드 결합 영역에 특이적인 유도제는, 둘 모두가 합성 약물인, AP20187 및/또는 AP1903을 포함한다.

[0053] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 링커 영역은 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 아미노산, 또는 GGAGGAGGAGGATCC (서열 번호 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 특정 실시양태에서, 링커를 코딩하는 핵산 서열은 제한 부위를 포함하지 않는다.

[0054] 본 개시내용의 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는 서열의 87번 위치에 아르기닌(R)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는 서열의 282번 위치에 알라닌(A)을 포함하지 않는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 카스파제 폴리펩티드 또는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 절두된 카스파제 9 폴리펩티드는

GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 27)

를 포함하는 아미노산 서열, 또는

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTG
CAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCT
GCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACC
GCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCT
CTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGC
AGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGA
TCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACT
GTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGC
CAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAAC
TCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTG
CCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATG
GCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGA
ACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGC
TGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGA
AAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 28)

를 포함하는 핵

산 서열에 의해 코딩된다.

[0055] 폴리펩티드가 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 포함하는 것인, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 특정 실시양태에서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLEGGGGGS
GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 29)

를 포함하는 아미노산 서

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGATGTGGAACTGCTGAAGCTGGAGGGAG
GAGGAGGATCCGAATTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATG
CCGATCTGGCTTACATCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAA
CAATGTGAACTTCTGCAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATAT
TGACTGTGAGAAGCTGCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTG
AAAGGGGATCTGACCGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAG
CAGGACCATGGAGCTCTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCC
AGGCTTCTCATCTGCAGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGT
CAGCGTGGAGAAGATCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGG
GGAAAGCCAAAACTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCAC
GGCTTCGAGGTGGCCAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCT
GAACCAGATGCAACTCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGAT
GCTATCTCAAGCCTGCCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCC
AGGCTTTGTCTCATGGCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACT
GGACGACATCTTTGAACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCT
GCGAGTGGCAAACGCTGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCGGGTG
CTTCAATTTTCTGAGAAAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 30)

열, 또는 를 포함하는 핵

산 서열에 의해 코딩된다.

[0056] 본 개시내용의 나노입자 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 나노입자 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 자기 절단 펩티드는 CAR과 선별 유전자 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 나노입자 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드는 CAR의 상류에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드는 CAR의 하류에 위치한다. 일부 실시양태에서, 나노입자 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드는 CAR과 나노입자 사이에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드는 CAR의 하류에 위치한다. 일부 실시양태에서, 나노입자 벡터는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드를 포함할 수 있고, 여기서, 제1 자기 절단 펩티드는 CAR과 나노입자 사이에 위치하고, 제2 자기 절단 펩티드는 CAR의 하류에, 예를 들어, CAR과 선별 유전자 사이에 위치한다. 본 개시내용의 나노입자 벡터는 본 개시내용의 단백질 스캐폴드, 센티린 또는 CARTyrin 중 하나 이상의 것과 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 사이에 위치하는 적어도 하나의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 나노입자 벡터는 제1 자기 절단 펩티드는 예를 들어, 본 개시내용의 유도성

아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상류 또는 그의 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하고, 제2의 처음 자기 절단 펩티드는 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 하류 또는 상류 쪽으로 바로 앞에 위치하는 것인, 적어도 2개의 자기 절단 펩티드(들)를 포함할 수 있다. 자기 절단 펩티드는 예를 들어, T2A 펩티드, GSG-T2A 펩티드, E2A 펩티드, GSG-E2A 펩티드, F2A 펩티드, GSG-F2A 펩티드, P2A 펩티드, 또는 GSG-P2A 펩티드를 포함할 수 있다. T2A 펩티드는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 EGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 31)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열, GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열 번호 32)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-T2A 펩티드는 ggatctggagagggaaggggaagcctgctgacctgtggagacgtggaggaaaacccaggacca(서열 번호 33)를 포함하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. E2A 펩티드는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 QCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 34)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-E2A 펩티드는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP(서열 번호 35)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. F2A 펩티드는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 36)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-F2A 펩티드는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(서열 번호 37)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. P2A 펩티드는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 ATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 38)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. GSG-P2A 펩티드는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열, 또는 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(서열 번호 39)를 포함하는 아미노산 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%의 동일성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

[0057] 본 개시내용은 본 개시내용의 벡터를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0058] 본 개시내용은 본 개시내용의 CAR을 포함하는 세포를 제공한다. 본 개시내용은 본 개시내용의 트랜스포존을 포함하는 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR, 트랜스포존, 또는 벡터를 포함하는 세포는 세포 표면 상에 CAR을 발현할 수 있다. 세포는 임의 유형의 세포일 수 있다. 바람직하게, 세포는 면역 세포이다. 면역 세포는 T 세포, 자연 살해(NK: Natural Killer) 세포, 자연 살해(NK) 유사 세포(예컨대, 사이토카인 유도 살해(CIK: Cytokine Induced Killer) 세포), 조혈 전구 세포, 말초 혈액(PB: peripheral blood) 유래 T 세포 또는 제대혈(UCB: umbilical cord blood) 유래 T 세포일 수 있다. 바람직하게, 면역 세포는 T 세포이다. 세포는 인공 항원 제시 세포일 수 있고, 이는 임의적으로, 본 개시내용의 변형된 면역 세포 또는 T 세포를 자극시키고, 확장시키는 데 사용될 수 있다. 세포는 종양 세포일 수 있고, 이는 임의적으로, 인공 또는 변형된 항원 제시 세포로서 사용될 수 있다.

[0059] 입양 요법용으로 사용될 수 있는 본 개시내용의 변형된 세포는 자가 유래 또는 동종이계 세포일 수 있다.

[0060] 본 개시내용은 (a) 세포 집단을 수득하는 단계; (b) 세포 집단 내 적어도 하나의 세포의 세포막을 통해 키메라 항원 수용체(CAR)를 전달하는 데 충분한 조건하에서 세포 집단을 본 개시내용의 CAR 또는 상기 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 조성물에 접촉시켜 변형된 세포 집단을 생성하는 단계; (c) 트랜스포존의 통합에 적합한 조건하에서 변형된 세포 집단을 배양하는 단계; 및 (d) 세포 표면 상에 CAR을 발현하는 적어도 하나의 세포를 변형된 세포 집단으로부터 확장시키고/거나, 선별하는 단계를 포함하는, 세포의 표면 상에 CAR을 발현시키는 방법을 제공한다.

[0061] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 세포 집단은 백혈구 및/또는 CD4+ 및 CD8+ 백혈구를 포함할 수 있다. 세포 집단은 최적화된 비로 CD4+ 및 CD8+ 백혈구를 포함할 수 있다. 최적화된 비의 CD4+ 대 CD8+ 백혈구가 생체내에서는 자연적으로 존재하지 않는다. 세포 집단은 종양 세포를 포함할 수 있다.

[0062] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포존 또는 벡터는 CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0063] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 세포 집단 내 적어도 하나의 세포의 세포막을 통해 CAR을 코딩하는 서열을 전달하는 데 충분한 조건은 뉴클레오펙션을 포함한다.

[0064] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 세포 집단 내 적어도 하나의 세포의 세포막을 통해 CAR을 코딩하는 서열을 전달하는 데 충분한 조건은 명시된 전압에서의 1회 이상의 전기 펄스 적용, 완충제, 및 하나 인자의 보충 인자(들) 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 실시양태에서, 완충제는 PBS, HBSS, 옵티MEM(OptiMEM), BTX 프레스(BTXpress), 아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucleofector), 인간 T 세포 뉴클레오펙션 완충제 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 보충 인자(들)는 (a) 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합; (b) 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합; (c) 세포 배지; (d) 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제; 및 (e) 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약을 포함할 수 있다. 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합은 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN-감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합은 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염(Earle's Salts), 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgC12, Na2HPO4, NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, 트리스/HC1, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머(Poloxamer) 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313(Pop313), 크라운(Crown)-5, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 세포 배지는 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로(CellGro) DC 배지, CTS 옵티마이저(OpTimizer) T 세포 확장 SFM, 텍스MACS(TexMACS) 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF(ImmunoCult-XF) T 세포 확장 배지 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제로는 TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β: glycogen synthase kinase-3β)의 억제제(예컨대, TWS119), 바필로마이신(Bafilomycin), 클로로퀸(Chloroquine), 퀴나크린(Quinacrine), AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약으로는 pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0065] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열의 통합에 적합한 조건으로는 완충제 및 하나 이상의 보충 인자(들) 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스포존 또는 벡터는 본 개시내용의 CAR, 또는 CAR을 코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 완충제는 PBS, HBSS, 옵티MEM, BTX프레스, 아막사 뉴클레오펙터, 인간 T 세포 뉴클레오펙션 완충제 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 보충 인자(들)로는 (a) 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합; (b) 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합; (c) 세포 배지; (d) 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제; 및 (e) 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약을 포함할 수 있다. 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 또는 그의 임의의 조합으로는 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN-감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합은 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염, 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgC12, Na2HPO4,

NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313, 크라운-5, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 세포 배지는 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로(들) 또는 그의 조합의 억제제로는 TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 억제제(예컨대, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약으로는 pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0066] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 확장 및 선별 단계는 순차적으로 진행된다. 확장이 선별 이전에 진행될 수 있다. 확장이 선별 이후에 진행될 수 있고, 임의적으로, 추가(즉, 제2) 선별이 확장 이후에 진행될 수 있다.

[0067] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 확장 및 선별 단계가 동시에 진행될 수 있다.

[0068] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 확장은 변형된 세포 집단의 적어도 하나의 세포를 항원과 접촉시켜 CAR을 통해 적어도 하나의 세포를 자극시킴으로써 확장된 세포 집단을 생성할 수 있다. 항원은 기재 표면 상에 제공될 수 있다. 기재는 하나의 표면, 하나의 웰, 하나의 비드, 또는 그의 복수 형태, 및 매트릭스를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 임의 형태를 가질 수 있다. 기재는 상자성 또는 자성 성분을 추가로 포함할 수 있다. CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 항원은 기재 표면 상에 제공될 수 있고, 여기서, 기재는 자기 비드이고, 여기서, 자석은 변형 및 확장된 세포 집단으로부터 자기 비드를 제거 또는 분리시키는 데 사용될 수 있다. 항원은 세포, 또는 인공 항원 제시 세포 표면 상에 제공될 수 있다. 본 개시내용의 인공 항원 제시 세포로는 종양 세포 및 줄기 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0069] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 여기서, 트랜스포존 또는 벡터는 선별 유전자를 포함하고, 여기서, 선별 단계는 변형된 세포 집단의 적어도 하나의 세포를, 선별 유전자가 부여하는 내성의 대상이 되는 화합물과 접촉시켜 선별 유전자를 발현하는 세포는 선별에서 생존한 것으로 확인하고, 선별 유전자를 발현하지 못한 세포는 선별 단계에서 생존하지 못한 것으로 확인하는 것을 포함한다.

[0070] CAR을 발현시키는 본 방법의 특정 실시양태에서, 확장 및/또는 선별 단계는 10 내지 14일 기간(종점 포함) 동안 진행될 수 있다.

[0071] 본 개시내용은 본 개시내용의 방법의 변형, 확장 및 선별된 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0072] 본 개시내용은 본 개시내용의 조성물을 암 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 종양 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 암 치료를 필요로 하는 피험체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 종양 세포는 악성 종양 세포일 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단일 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단일 수 있다.

[0073] 본 개시내용은 본 개시내용의 조성물을 자가면역 병태 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 피험체의 자가면역 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 자가면역 병태 치료를 필요로 하는 피험체에서 자가면역 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 자가면역 세포는 피험체의 표적 세포 상의 자기 항원에 특이적으로 결합하는 림프구일 수 있다. 특정 실시양태에서, 자가면역 세포는 B 림프구(즉, B 세포)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 자가면역 세포는 T 림프구(즉, T 세포)일 수 있다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에

서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단일 수 있다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단일 수 있다.

[0074] 본 개시내용은 본 개시내용의 조성물을 감염 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 병원체를 포함하는 세포, 병원체와 소통하는 세포, 또는 병원체에 노출된 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 감염 치료를 필요로 하는 피험체에서 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 병원체와 소통하는 세포는 병원체와 공기 소통(예컨대, 병원체는 공기 매개형 또는 흡입형 병원체이다) 또는 유체 소통(예컨대, 병원체는 수성 또는 생물학적 유체 중 운반된다)하는 것일 수 있다. 숙주 세포의 감염을 유발하는 병원체는 박테리아, 바이러스, 효모, 또는 미생물일 수 있다. 병원체는 세포 또는 세포의 숙주 유기체(피험체)에서 바이러스성 감염, 면역결핍 병태, 염증성 병태 및 증식성 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 예시적인 병태를 유도할 수 있다. 특정 실시양태에서, 감염은 결핵, 소뇌증, 신경변성 또는 말라리아를 유발한다. 특정 실시양태에서, 감염은 피험체의 태아에서 소뇌증을 유발한다. 감염이 피험체의 태아에서 소뇌증을 유발하는 것을 포함하는 특정 실시양태에서, 병원체는 바이러스이고, 여기서, 바이러스는 지카(Zika) 바이러스이다. 특정 실시양태에서, 면역결핍 병태는 후천성 면역결핍 증후군(AIDS: acquired immune deficiency syndrome)이다. 특정 실시양태에서, 증식성 장애는 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 자궁경부암이고, 여기서, 병원체는 인간 유두종 바이러스(HPV: human papilloma virus)이다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단일 수 있다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단일 수 있다.

[0075] 본 개시내용은 본 개시내용의 조성물을 비만 세포병 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 비만 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 비만 세포병 치료를 필요로 하는 피험체에서 비만 세포병을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, CAR은 피험체의 비만 세포 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 비만 세포병은 비만 세포의 과도한 증식과 연관된 장애, 비정상적인 활성을 가지는 비만 세포와 연관된 장애, 및 비정상적인 비만 세포 개수 및 비정상적인 비만 세포 활성, 둘 모두와 연관된 장애를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 비만 세포의 과도한 증식과 연관된 장애의 예로는 비만 세포증, 피부 비만 세포증(예컨대, 색소성 두드러기 또는 반구진성 피부 비만 세포증), 전신 비만 세포증(비만 세포 백혈병 포함), 및 국소성 비만 세포 증식을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 비정상적인 활성을 가지는 비만 세포와 연관된 장애의 예로는 비만 세포 활성 증후군(MCAS: mast cell activation syndrome) 또는 비만 세포 활성 장애(MCAD: mast cell activation disorder), 알레르기 질환(아나필락시스 포함), 천식, 염증성 질환(예를 들어, 관절 조직의 자가면역 관련 염증, 관절염 증 포함), 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래일 수 있다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계일 수 있다.

[0076] 본 개시내용은 본 개시내용의 조성물을 변성 질환 치료를 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, CAR은 유해한 세포 또는 노화 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 변성 질환 치료를 필요로 하는 피험체에서 변성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, CAR은 피험체의 유해한 세포 또는 노화 세포 상의 항원에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 변성 질환은 신경변성 장애, 대사 장애, 혈관 장애 및 노화를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 신경변성 장애의 예로는 뉴런, 교세포 또는 소교세포 중 하나 이상의 것의 기능 또는 효능 상실과 연관된 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 신경변성 장애의 예로는 뉴런, 교세포 또는 소교세포 중 하나 이상의 것의 기능을 방해하거나, 또는 그의 효능을 감소시키는 신호전달 분자, 단백질, 또는 프리온 축적과 연관된 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 대사 장애의 예로는 미토콘드리아 장애, 전자전달계의 방해, 세포의 ATP 생산 방해, 뉴런, 교세포 또는 소교세포 중 하나 이상의 것의 하나 이상의 미토콘드리아의 기능 상실 또는 효능 감소와 연관된 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 대사 장애의 예로는 뉴런, 교세포 또는 소교세포로의 순환 혈류 상실 또는 혈류 감소와 연관된 장애(예컨대, 뇌졸중); (예를 들어, 세포에서 자유 라디칼을 방출하기에 충분한) 뉴런, 교세포 또는 소교세포에서 일시적인 또는 영구적인 저산소증 상태와 연관된 장애; 피험체의 수면 상태 동안 뉴런, 교세포 또는 소교세포의 노폐물 제거 효능을 감소시키는 데 충분한 상기 수면 상태 동안 뉴런, 교세포 또는 소교세포로의 순환 CNS 흐름 상실 또는 CNS 흐름 감소와 연관된 장애와 연관된 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 노화 장애의 예로는 뉴런,

교세포 또는 소교세포의 하나 이상의 염색체 상의 단축된 텔로미어 증가, 또는 텔로미어 단축과 연관된 장애; 뉴런, 교세포 또는 소교세포 중의 텔로미어의 기능 상실 또는 효능 감소와 연관된 장애; 또는 뉴런, 교세포 또는 소교세포에서의 DNA 수복 기전의 기능 상실 또는 효능 감소와 연관된 장애를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 유해한 세포 또는 노화 세포는 유해한 세포 또는 노화 세포를 포함하는 네트워크 중의 또 다른 세포의 기능을 방해하거나, 또는 그의 효능을 감소시키고, 유해한 세포 또는 노화 세포의 표적화된 제거는 네트워크의 기능을 개선시키거나, 또는 회복시키거나, 또는 그의 효능을 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 유해한 세포 또는 노화 세포는 제2 세포의 기능 또는 효능을 변환시킬 수 있고, 유해한 세포 또는 노화 세포의 표적화된 제거는 제2 세포의 변환을 막는다. 특정 실시양태에서, 변성 질환은 신경변성 장애이고, 유해한 세포 또는 노화 세포는 줄기 세포, 면역 세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포이다. 특정 실시양태에서, 변성 질환은 대사 장애이고, 유해한 세포 또는 노화 세포는 줄기 세포, 체세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포이다. 특정 실시양태에서, 변성 질환은 혈관 장애이고, 유해한 세포 또는 노화 세포는 줄기 세포, 체세포, 면역 세포, 내피 세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포이다. 특정 실시양태에서, 변성 질환은 노화이고, 유해한 세포 또는 노화 세포는 난모세포, 정자, 줄기 세포, 체세포, 면역 세포, 내피 세포, 뉴런, 교세포 또는 소교세포이다. 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 자가 유래 세포 또는 세포 집단일 수 있다. 특정 실시양태에서, 피험체에게 본 개시내용의 변형된 세포 또는 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 동종이계 세포 또는 세포 집단일 수 있다.

[0077] 본 개시내용은 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함하는 조성물의 트랜스포존 또는 벡터를 포함하는 세포를 포함하는 조성물을 세포 요법 변형을 필요로 하는 피험체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 아폽토시스는 세포를 유도제와 접촉시킴으로써 세포에서 선택적으로 유도될 수 있는 것인, 세포 요법 변형을 필요로 하는 피험체에서 세포 요법을 변형시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 세포는 자가 유래 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 동종이계 세포이다. 본 방법의 특정 실시양태에서, 세포 요법은 입양 세포 요법이다. 본 방법의 특정 실시양태에서, 세포 요법을 변형시키는 것은 세포 요법의 종료를 포함한다. 본 방법의 특정 실시양태에서, 세포 요법을 변형시키는 것은 세포 요법에서 제공된 세포의 일부의 고갈을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 방법은 유도체의 억제제를 투여하여 세포 요법의 변형을 억제시킴으로써 세포 요법의 기능 및/또는 효능을 회복시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0078] 본 개시내용의 세포 요법을 변형시키는 방법은 예를 들어, 회복 징후 또는 질환 중증도/진행 감소 징후, 질환 관해/정지 징후, 및/또는 유해 사례 발생에 대한 반응으로 요법을 종료하는 데, 또는 약화시키는 데 사용될 수 있다. 질환의 징후 또는 증상이 재출현하거나, 또는 중증도 증가 및/또는 유해 사례가 해소되었다면, 본 개시내용의 세포 요법은 유도제를 억제시킴으로써 재개될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 (CD8신호 펩티드, 센티린, CD8a 힌지 서열, 및 막횡단 서열, 및 CD3z 공자극 도메인을 포함하는) CARTyrin을 포함하는 트랜스포존을 포함하는, 7676개의 염기쌍의, 본 개시내용의 피기백 CARTyrin 구성체를 도시한 개략적 다이어그램이다.

도 2는 본 개시내용의 P-BCMA-101 구성체의 아미노산 서열의 개략적 다이어그램이다.

도 3a-b는 본 개시내용의 P-BCMA-101 구성체의 핵산 서열의 개략적 다이어그램이다.

도 4는 본 개시내용의 CARTyrin의 구성을 도시한 개략적 다이어그램, 및 센티린 및 항체의 특징을 대조한 표이다.

도 5a는 5 μg의 CARTyrin mRNA를 이용한 전기천공 이후의 CARTyrin 발현을 도시한 세포 분류 플롯 시리즈이다.

도 5b, 좌측 패널은 대조군 K562 세포주, 및 BCMA 발현 H929 세포주를 이용한 시험감염 이후의 CARTyrin 기능을 도시한 세포 분류 플롯 시리즈이고, 우측 패널은 (BCMA 발현 세포주 U266을 이용한 시험감염으로부터의 데이터가 추가된) 좌측 패널의 플롯의 정량화를 보여주는 그래프이다.

도 5c는 T 세포의 전기천공 동안 사용된 mRNA 양의 함수로서의 CARTyrin 활성을 도시한 그래프이다.

도 6은 마우스에서의 생체내 종양 시험감염 연구 타임라인을 도시한 개략적 다이어그램이다.

도 7은 A08 CARTyrin 처리된 마우스의 완전한 (100%) 생존율을 보여주는 한 쌍의 그래프이다. M 단백질의 존재

에 의해 종양 부하량을 사정하였다. 보호된 동물에 검출가능한 M 단백질은 없었다.

도 8은 본 개시내용의 예시적인 유도성 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 도시한 개략적 다이어그램이다.

도 9는 뉴클레오펙션 후 12일째의, 치료제(CARTyrin)를 단독으로, 또는 (피기백(PB) 트랜스포사제에 의해 세포 내로 도입된 iC9 구성체(또한 "안전 스위치"로도 공지)에 의해 코딩된) 본 개시내용의 유도성 카스파제 폴리펩티드와 함께 조합하여 발현하도록 변형된 세포에서의, 유도제(AP1903)의 투여량 증가의 함수로서 살아있는 세포가 있는 구역(게이팅된 우측 하단 사분면)에서 아폽토시스 세포로 채워진 구역(좌측 상단 사분면)으로 이동하는 세포의 존재도를 도시한 유세포 분석 플롯 시리즈이다.

도 10은 뉴클레오펙션 후 19일째의, 치료제(CARTyrin)를 단독으로, 또는 (피기백(PB) 트랜스포사제에 의해 세포 내로 도입된 iC9 구성체(또한 "안전 스위치"로도 공지)에 의해 코딩된) 본 개시내용의 유도성 카스파제 폴리펩티드와 함께 조합하여 발현하도록 변형된 세포에서의, 유도제(AP1903)의 투여량 증가의 함수로서 살아있는 세포가 있는 구역(게이팅된 우측 하단 사분면)에서 아폽토시스 세포로 채워진 구역(좌측 상단 사분면)으로 이동하는 세포의 존재도를 도시한 유세포 분석 플롯 시리즈이다.

도 11은 도 9(좌측 그래프) 또는 도 10(우측 그래프)에 제시된 집계 결과의 정량화를 도시한 그래프 쌍이다. 구체적으로, 상기 그래프는 12일째(도 9 및 좌측 그래프) 및 19일째(도 10 및 우측 그래프)에 각 변형된 세포 유형에 대한 iC9 스위치의 유도제(AP1903)의 농도의 함수로서의 세포 생존율(%)에 iC9 안전 스위치가 미치는 영향을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] **상세한 설명**

[0081] 본 개시내용은 적어도 하나의 센티린을 포함하는 키메라 항원 수용체를 제공한다. 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 1개 초과의 센티린을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이중특이적 CAR은 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하는 2개의 센티린을 포함할 수 있다.

[0082] 본 개시내용의 센티린은 항원에 특이적으로 결합한다. 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 센티린을 포함하는 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 세포(예컨대, 세포독성 면역 세포)의 특이성을 특이적인 항원 지향으로 지정하는 데 사용될 수 있다.

[0083] 본 개시내용의 센티린은

[0084] LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGEAINLTVPGSERSYDL TGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (서열 번호 1) 를 포함하는 공통 서열을 포함할 수 있다.

[0085] 본 개시내용의 키메라 항원 수용체는 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR의 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 힌지/스페이서 도메인은 인간 CD8α, IgG4, 및/또는 CD4의 힌지/스페이서/스토크를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 세포내 도메인 또는 엔도도메인은 인간 CD3ζ의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있고, 인간 4-1BB, CD28, CD40, ICOS, MyD88, OX-40 세포내 세그먼트, 또는 그의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 막관통 도메인은 인간 CD2, CD3δ, CD3ε, CD3γ, CD3ζ, CD4, CD8α, CD19, CD28, 4-1BB 또는 GM-CSFR 막관통 도메인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 본 개시내용은 하기 세포에 본 개시내용의 CAR 및/또는 CARTyrin을 도입함으로써 유전적으로 변형된 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포, 조혈 전구 세포, 말초 혈액(PB) 유래 T 세포(G-CSF 동원된 말초 혈액으로부터의 T 세포 포함), 하나 이상의 항원에 대한 특이성이 부여된 제대혈(UCB) 유래 T 세포를 제공한다. 본 개시내용의 세포는 본 개시내용의 CAR 또는 CARTyrin을 코딩하는 트랜스포존 및 본 개시내용의 트랜스포사제를 코딩하는 서열(바람직하게, 본 개시내용의 트랜스포사제를 코딩하는 서열은 mRNA 서열이다)을 포함하는 플라스미드의 전기이동에 의해 변형될 수 있다.

[0087] 본 개시내용의 트랜스포존은 에피솜에 유지될 수 있거나, 또는 재조합/변형된 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다. 트랜스포존은 비바이러스 유전자 전달 증강을 위해 트랜스포존 및 트랜스포사제를 이용하는 2 성분 피기백 시스템의 일부일 수 있다. 본 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포존은 2개의 시스 조절 인슐레이터 요소가 측면에 위치하는 항원 수용체를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드 DN트랜스포존이다. 특정 실시양태에서,

트랜스포존은 피기백 트랜스포존이다. 특정 실시양태에서, 및 특히, 트랜스포존이 피기백 트랜스포존인 상기 실시양태에서, 트랜스포사제는 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™(SPB) 트랜스포사제이다.

[0088] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포존은 2개의 시스 조절 인슐레이터 요소가 측면에 위치하는 항원 수용체를 코딩하는 서열을 포함하는 플라스미드 DN트랜스포존이다. 특정 실시양태에서, 트랜스포존은 피기백 트랜스포존이다. 특정 실시양태에서, 및 특히, 트랜스포존이 피기백 트랜스포존인 상기 실시양태에서, 트랜스포사제는 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™(SPB) 트랜스포사제이다. 특정 실시양태에서, 및 특히, 트랜스포사제가 슈퍼 피기백™(SPB) 트랜스포사제인 상기 실시양태에서, 트랜스포사제를 코딩하는 서열은 mRNA 서열이다.

[0089] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 피기백(PB) 트랜스포사제 효소는

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

(서열 번호 12)

와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 사이의 임의의 백분율로 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 그로 구성될 수 있다.

[0090] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열:

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

(서열 번호 12)

[0091] 의 30, 165, 282, 또는 538번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 그로 구성된 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다.

[0092] 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 30, 165, 282, 또는 538번 위치 중 2개 이상의 위치에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 30, 165, 282, 또는 538번 위치 중 3개 이상의 위치에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 하기 위치 30, 165, 282, 및 538번 위치 각각에 아미노산 치환을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 피기백™(PB) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 30번 위치에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 165번 위치에서의 아미노산 치환은 글리신(G)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 282번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12의 서열의 538번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환이다.

[0093] 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스포사제 효소이다.

특정 실시양태에서, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 트랜스포사제 효소는 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스포사제 효소이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스포사제 효소는 30번 위치에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)의 발린(V)으로의 치환이고, 165번 위치에서의 아미노산 치환은 글리신(G)의 세린(S)으로의 치환이고, 282번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이고, 538번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 리신(K)으로의 치환으로의 치환인 것인, 서열 번호 12의 서열의 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 그로 구성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 슈퍼 피기백™(sPBo) 트랜스

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

(서열 번호 2)

포사제 효소는 와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 사이의 임의의 백분율로 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 그로 구성될 수 있다.

[0094] 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 3, 46, 82, 103, 119, 125, 177, 180, 185, 187, 200, 207, 209, 226, 235, 240, 241, 243, 258, 296, 298, 311, 315, 319, 327, 328, 340, 421, 436, 456, 470, 486, 503, 552, 570 및 591번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 특정 실시양태에서, 피기백™ 또는 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 46, 119, 125, 177, 180, 185, 187, 200, 207, 209, 226, 235, 240, 241, 243, 296, 298, 311, 315, 319, 327, 328, 340, 421, 436, 456, 470, 485, 503, 552 및 570번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 3번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 아스파라긴(N)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 46번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 46번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 트레오닌(T)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 82번 위치에서의 아미노산 치환은 이소류신(I)의 트립토판(W)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 103번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 119번 위치에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 125번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 125번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 177번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 177번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 히스티딘(H)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 180번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 류신(L)로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 180번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 180번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 185번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 187번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 200번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 트립토판(W)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 207번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 209번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정

실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 226번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 235번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 아르기닌(R)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 240번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 241번 위치에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌(F)의 류신(L)로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 243번 위치에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 258번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 296번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 트립토판(W)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 296번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 티로신(Y)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 296번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 298번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 298번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 298번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 311번 위치에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 311번 위치에서의 아미노산 치환은 프롤린(P)의 발린으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 315번 위치에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 319번 위치에서의 아미노산 치환은 트레오닌(T)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 327번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 아르기닌(R)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 328번 위치에서의 아미노산 치환은 티로신(Y)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 340번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 340번 위치에서의 아미노산 치환은 시스테인(C)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 421번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파르트산(D)의 히스티딘(H)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 436번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 456번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 티로신(Y)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 470번 위치에서의 아미노산 치환은 류신(L)의 페닐알라닌(F)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 485번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 503번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 류신(L)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 503번 위치에서의 아미노산 치환은 메티오닌(M)의 이소류신(I)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 552번 위치에서의 아미노산 치환은 발린(V)의 리신(K)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 570번 위치에서의 아미노산 치환은 알라닌(A)의 트레오닌(T)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 591번 위치에서의 아미노산 치환은 글루타민(Q)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 591번 위치에서의 아미노산 치환은 글루타민(Q)의 아르기닌(R)으로의 치환이다.

[0095] 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서,피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570번 위치 중 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 상기의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570번 위치 중 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 상기의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 트랜스포사제가 30, 165, 282 및/또는 538번 위치에 상기 기술된 돌연변이를 포함하는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 서열의 103, 194, 372, 375, 450, 509 및 570번 위치에 아미노산 치환을 포함할 수 있거나, 슈퍼 피기백™ 트랜스포사제 효소는 상기의 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 103번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 프롤린(P)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 194번 위치에서의

아미노산 치환은 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 372번 위치에서의 아미노산 치환은 아르기닌(R)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 375번 위치에서의 아미노산 치환은 리신(K)의 알라닌(A)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 450번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파르트산(D)의 아스파라긴(N)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 509번 위치에서의 아미노산 치환은 세린(S)의 글리신(G)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 12 또는 서열 번호 2의 570번 위치에서의 아미노산 치환은 아스파라긴(N)의 세린(S)으로의 치환이다. 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환을 포함할 수 있다. 피기백™ 트랜스포사제 효소가 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환을 포함할 수 있는 것인 상기 실시양태를 비롯한, 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 서열의 또는 서열 번호 60의 372, 375 및 450번 위치에 아미노산 치환을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환, 서열 번호 12의 372번 위치에 아르기닌(R)의 알라닌(A)으로의 치환, 및 서열 번호 12의 375번 위치에 리신(K)의 알라닌(A)으로의 치환을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 피기백™ 트랜스포사제 효소는 서열 번호 12의 194번 위치에 메티오닌(M)의 발린(V)으로의 치환, 서열 번호 12의 372번 위치에 아르기닌(R)의 알라닌(A)으로의 치환, 서열 번호 12의 375번 위치에 리신(K)의 알라닌(A)으로의 치환, 및 서열 번호 12의 450번 위치에 아스파르트산(D)의 아스파라긴(N)으로의 치환을 포함할 수 있다.

[0096] ***스캐폴드 단백질***

[0097] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 피브로넥틴 타입 III(FN3) 반복 단백질, 코딩 또는 상보적 핵산, 벡터, 숙주 세포, 조성물, 조합물, 제제, 장치, 및 그의 제조 방법 및 사용 방법으로부터 유도될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 단백질 스캐폴드는 인간 테나신-C(이하 "테나신")로부터의 다중 FN3 도메인의 공통 서열로 구성된다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 단백질 스캐폴드는 15개의 FN3 도메인의 공통 서열이다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 다양한 분자, 예를 들어, 세포 표적 단백질에 결합하도록 디자인될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 항원의 야생형 및/또는 변이체 형태의 에피토프에 결합하도록 디자인될 수 있다.

[0098] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 추가 분자 또는 모이어티, 예를 들어, 항체의 Fc 영역, 알부민 결합 도메인, 또는 반감기에 영향을 주는 다른 모이어티를 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 단백질 스캐폴드를 코딩할 수 있는 핵산 분자에 결합될 수 있다.

[0099] 본 개시내용은, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드가 검출가능한 및/또는 회수가능한 양으로 발현되는 조건하에서 본원에 기술된 바와 같은 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 숙주 세포에서 다중 FN3 도메인의 공통 서열에 기반한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 발현시키기 위한 적어도 하나의 방법을 제공한다.

[0100] 본 개시내용은 (a) 본원에 기술된 바와 같은 다중 FN3 도메인의 공통 서열에 기반한 단백질 스캐폴드 및/또는 코딩 핵산; 및 (b) 적합한 및/또는 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 적어도 하나의 조성물을 제공한다.

[0101] 본 개시내용은 피브로넥틴 타입 III(FN3) 반복 단백질, 바람직하게, 다중 FN3 도메인의 공통 서열, 및 더욱 바람직하게, 인간 테나신으로부터의 다중 FN3 도메인의 공통 서열에 기반한 단백질 스캐폴드의 라이브러리를 생성하는 방법을 제공한다. 라이브러리는 스캐폴드, 예컨대, 루프 영역의 일부의 특정 위치에서의 아미노산, 분자 중의 아미노산의 개수를 (돌연변이에 의해) 변경시킴으로써 스캐폴드의 연속된 세대를 제조하여 형성된다. 라이브러리는 단일 루프의 아미노산 조성을 변경시킴으로써, 또는 다중 루프를, 또는 스캐폴드 분자의 추가 위치를 동시에 변경시킴으로써 생성될 수 있다. 따라서, 변경된 루프는 연장되거나, 단축될 수 있다. 상기 라이브러리는 각 위치에 모든 가능한 아미노산, 또는 디자인된 아미노산 서브세트를 포함하도록 생성될 수 있다. 라이브러리 구성원은 디스플레이, 예컨대, 시험관내 또는 CIS 디스플레이(DNA, RNA, 리보솜 디스플레이 등), 효모, 박테리아, 및 파지 디스플레이에 의한 스크리닝을 위해 사용될 수 있다.

[0102] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 예컨대, 환원 조건하에서의 안정성 및 고농도에서의 가용성과 같은, 증진된 생물물리적 특성을 제공하고; 이는 원핵생물계, 예컨대, E. 콜라이(*E. coli*)에서, 진핵생물계, 예컨대, 효모에서, 및 시험관내 전사/번역 시스템, 예컨대, 토끼 망상적혈구 용해물 시스템에서 발현 및 폴딩될 수 있다.

[0103] 본 개시내용은 표적 및 검출 결합제를 이용하여 본 발명의 스캐폴드 라이브러리를 패닝함으로써 특정 표적에 결

합하는 스캐폴드 분자를 생성하는 방법을 제공한다. 다른 관련된 측면에서, 본 개시내용은 원하는 활성을 가진, 예컨대, 특정 친화도로 표적 단백질에 결합할 수 있는 단백질 스캐폴드를 생성하는 데, 또는 친화성 성숙을 위해 사용될 수 있는 스크리닝 방법을 포함한다. 친화성 성숙은 시스템, 예컨대, 파지 디스플레이 또는 시험관내 디스플레이를 사용하여 반복 수행된 돌연변유발 및 선별 라운드에 의해 달성될 수 있다. 본 프로세스 동안 돌연변유발은 특이적인 스캐폴드 잔기로의 부위 지정 돌연변유발법, 오류 빈발성 PCR에 기인한 무작위 돌연변유발법, DNA 셔플링, 및/또는 상기 기술의 조합의 결과일 수 있다.

[0104] 본 개시내용은 제한 없이, 포유동물 유래 스캐폴드를 포함하는, 피브로넥틴 타입 III(FN3) 반복 단백질의 공통 서열에 기반한, 단리된, 재조합 및/또는 합성 단백질 스캐폴드 뿐만 아니라, 공통 FN3 서열에 기반한 단백질 스캐폴드를 코딩하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물 및 코딩 핵산 분자를 제공한다. 본 개시내용은 진단 및 치료 조성물, 방법 및 장치를 비롯한, 상기 핵산 및 단백질 스캐폴드 제조 방법 및 사용 방법을 추가로 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0105] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 예컨대, 국소적으로, 경구적으로, 또는 혈뇌 장벽을 통해 투여할 수 있는 능력, 다중 표적, 또는 동일 표적의 다중 에피토프에 결합하는 이중특이적 또는 탠덤 분자로 조작될 수 있는 포유동물 세포 발현 능력 대비 자원의 함수로서 단백질 발현을 증가시킬 수 있도록 하는, E. 콜라이에서의 발현 능력, 약물, 중합체, 및 프로브에 접합될 수 있는 능력, 고농도로 제제하될 수 있는 능력, 및 상기 분자를 이환된 조직 및 종양으로 효과적으로 침투시킬 수 있는 능력면에 있어서 종래 치료제에 비하여 이점을 제공한다.

[0106] 또한, 단백질 스캐폴드는 그의 폴드와 관련하여 항체의 가변 영역을 모방하는 항체 특성 다수를 가진다. 이러한 배향은 FN3 루프가 항체 상보성 결정 영역(CDR)과 유사하게 노출될 수 있게 한다. 이는 세포 표적에 결합할 수 있어야 하고, 루프는 특정 결합 또는 관련된 특성 개선을 위해 변경될 수 있고, 예컨대, 친화성 성숙이 이루어질 수 있다.

[0107] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드의 6개의 루프 중 3개는 토폴로지에 따르면, 항체의 상보성 결정 영역(CDR 1-3), 즉, 항원-결합 영역에 상응하는 반면, 남은 3개의 루프는 항체 CDR에 유사한 방식으로 표면 노출된다. 이들 루프는 도 2에 제시된 바와 같이, 서열 번호 1의 잔기 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64, 및 75-81에, 또는 그 주변에 스패닝되어 있다. 바람직하게, 22-28, 51-54, 및 75-81에, 또는 그 주변에 있는 루프 영역은 결합 친화성 및 친화성을 위해 변경된다. 이들 루프 영역 중 하나 이상의 것은 라이브러리를 형성하는 백본 부위로서 그의 서열을 유지하는 다른 루프 영역 및/또는 다른 가닥과 함께 무작위화되고, 강력한 결합제는 특정 단백질 표적에 대해 친화성이 높은 라이브러리로부터 선택될 수 있다. 루프 영역 중 하나 이상의 것은 단백질과 항체 CDR의 상호작용와 유사한 방식으로 표적 단백질과 상호작용할 수 있다.

[0108] 본 개시내용의 스캐폴드는 항체 모방체를 포함할 수 있다.

[0109] "항체 모방체"라는 용어는 표적 서열에 특이적으로 결합하고, 자연적으로 발생된 항체와 상이한 구조를 가지는 유기 화합물을 기술하는 것으로 의도된다. 항체 모방체는 단백질, 핵산 또는 소분자를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 항체 모방체가 특이적으로 결합하는 표적 서열은 항원일 수 있다. 항체 모방체는 우수한 가용성, 조직 침투, 열 및 효소에 대한 안정성(예컨대, 효소 분해에 대한 내성), 및 보다 더 낮은 생산 비용을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 항체에 비해 더 우수한 성질을 제공할 수 있다. 예시적인 항체 모방체로는 아피바디, 아플리린, 아피머, 아피틴, 알파바디, 안티칼린 및 아비머(결합활성 다량체로서도 공지되어 있다), DARPin(디자인된 안키린 반복 단백질: Designed Ankyrin Repeat Protein), 피노머(Fynomer), 쿠니츠(Kunitz) 도메인 펩티드 및 모노바디를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0110] 본 개시내용의 아피바디 분자는 임의의 디술피드 브릿지 없이 하나 이상의 알파 나선을 포함하거나, 또는 그로 구성된 단백질 스캐폴드를 포함한다. 바람직하게, 본 개시내용의 아피바디 분자는 3개의 알파 나선을 포함하거나, 또는 그로 구성된다. 예를 들어, 본 개시내용의 아피바디 분자는 면역글로불린 결합 도메인을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 아피바디 분자는 단백질 A의 Z 도메인을 포함할 수 있다.

[0111] 본 개시내용의 아필린 분자는 예를 들어, 감마-B 크리스탈린 또는 유비퀴틴의 노출된 아미노산의 변형에 의해 생성된 단백질 스캐폴드를 포함한다. 아필린 분자는 항원에 대한 항체의 친화성을 기능적으로 모방하나, 항체를 구조적으로 모방하지는 않는다. 아필린을 제조하는 데 사용된 임의의 단백질 스캐폴드에서, 적절하게 폴딩된 단백질 분자에서 용매 또는 가능한 결합 파트너에 접근될 수 있는 아미노산은 노출된 아미노산인 것으로 간주된다. 상기 노출된 아미노산 중 임의의 하나 이상의 것은 표적 서열 또는 항원에 특이적으로 결합하도록 변형될 수 있다.

[0112] 본 개시내용의 아피머 분자는 특이적인 표적 서열에 대하여 고친화성 결합 부위를 제공하는 펩티드 루프를 나타내도록 조작된 매우 안정적인 단백질을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함한다. 본 개시내용의 예시적인 아피머 분자는 시스타틴 단백질 또는 그의 3차 구조에 기반한 단백질 스캐폴드를 포함한다. 본 개시내용의 예시적인 아피머 분자는 역평행 베타 시트의 상부에 놓인 알파 나선을 포함하는 공통된 3차 구조를 공유할 수 있다.

[0113] 본 개시내용의 아피틴 분자는 예를 들어, DNA 결합 단백질(예컨대, DNA 결합 단백질 Sac7d)로부터 유래될 수 있는 구조를 가진 인공 단백질 스캐폴드를 포함한다. 본 개시내용의 아피틴은 항원의 전체 또는 부분일 수 있는 표적 서열에 선택적으로 결합한다. 본 개시내용의 예시적인 아피틴은 DNA 결합 단백질의 결합 표면 상의 하나 이상의 아미노산 서열을 무작위화하고, 생성된 단백질에 대하여 리보솜 디스플레이 및 선별을 수행함으로써 제조된다. 본 개시내용의 아피틴의 표적 서열은 예를 들어, 펩티드, 단백질, 바이러스 또는 박테리아의 게놈 또는 표면에서 발견될 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 아피틴 분자는 효소의 특이적인 억제제로서 사용될 수 있다. 본 개시내용의 아피틴 분자는 내열성 단백질 또는 그의 유도체를 포함할 수 있다.

[0114] 본 개시내용의 알파바디 분자는 또한 세포 침투 알파바디(CPAB: Cell-Penetrating Alphabody)로서 지칭될 수 있다. 본 개시내용의 알파바디 분자는 다양한 표적 서열(항원 포함)에 결합하는 작은 단백질(전형적으로, 10 kDa 미만)을 포함한다. 알파바디 분자는 세포내 표적 서열에 도달하고, 결합할 수 있다. 구조적으로, 본 개시내용의 알파바디 분자는 (자연적으로 발생된 코일드-코일 구조와 유사한) 단일 쇄 알파 나선을 형성하는 인공 서열을 포함한다. 본 개시내용의 알파바디 분자는 표적 단백질에 특이적으로 결합하도록 변형된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함할 수 있다. 분자의 결합 특이성과 관계없이, 본 개시내용의 알파바디 분자는 정확한 폴딩 및 열안정성을 유지한다.

[0115] 본 개시내용의 안티칼린 분자는 단백질 또는 소분자에서 표적 서열 또는 부위에 결합하는 인공 단백질을 포함한다. 본 개시내용의 안티칼린 분자는 인간 리포칼린으로부터 유래된 인공 단백질을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 안티칼린 분자는 예를 들면, 단일클론 항체 또는 그의 단편 대신 사용될 수 있다. 안티칼린 분자는 단일클론 항체 또는 그의 단편보다 더 우수한 조직 침투 및 열안정성을 나타낼 수 있다. 본 개시내용의 예시적인 안티칼린 분자는 대략 20 kDa의 질량을 가진, 약 180개의 아미노산을 포함할 수 있다. 구조적으로, 본 개시내용의 안티칼린 분자는 루프 및 부착된 알파 나선에 의해 쌍별로 연결된 역평행 베타 가닥을 포함하는 배럴 구조를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 안티칼린 분자는 루프 및 부착된 알파 나선에 의해 쌍별로 연결된 8개의 역평행 베타 가닥을 포함하는 배럴 구조를 포함한다.

[0116] 본 개시내용의 아비머 분자는 (항원일 수도 있는) 표적 서열에 특이적으로 결합하는 인공 단백질을 포함한다. 본 개시내용의 아비머는 동일한 표적 또는 상이한 표적 내의 다수의 결합 부위들을 인식할 수 있다. 본 개시내용의 아비머가 1개 초과의 표적을 인식할 때, 아비머는 이중특이적 항체의 기능을 모방한다. 인공 단백질 아비머는 각각 대략 30-35개의 아미노산을 가진 2개 이상의 펩티드 서열들을 포함할 수 있다. 이 펩티드들은 하나 이상의 링커 펩티드를 통해 연결될 수 있다. 아비머의 하나 이상의 펩티드의 아미노산 서열은 막 수용체의 A 도메인으로부터 유래될 수 있다. 아비머는 임의적으로 디술피드 결합 및/또는 칼슘을 포함할 수 있는 단단한 구조를 가진다. 본 개시내용의 아비머는 항체에 비해 더 큰 열안정성을 나타낼 수 있다.

[0117] 본 개시내용의 DARPin(디자인된 안키린 반복 단백질)은 표적 서열에 대한 높은 특이성 및 높은 친화성을 가진 유전적으로 조작된, 재조합 또는 키메라 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 DARPin은 안키린 단백질로부터 유래되고, 임의적으로 안키린 단백질의 적어도 3개의 반복부 모티프(반복 구조 유니트로서도 지칭됨)를 포함한다. 안키린 단백질은 고친화성 단백질-단백질 상호작용을 매개한다. 본 개시내용의 DARPin은 큰 표적 상호작용 표면을 포함한다.

[0118] 본 개시내용의 피노머는 인간 Fyn SH3 도메인으로부터 유래되고, 항체와 동등한 친화도 및 동등한 특이성으로 표적 서열 및 분자에 결합하도록 조작된 작은 결합 단백질(약 7 kDa)을 포함한다.

[0119] 본 개시내용의 쿠니츠 도메인은 쿠니츠 도메인을 포함하는 단백질 스캐폴드를 포함한다. 쿠니츠 도메인은 프로테아제 활성을 억제하기 위한 활성 부위를 포함한다. 구조적으로, 본 개시내용의 쿠니츠 도메인은 디술피드가 풍부한 알파+베타 폴드를 포함한다. 이 구조는 소 췌장 트립신 억제제로 예시된다. 쿠니츠 도메인 펩티드는 특정 단백질 구조를 인식하고, 경쟁 프로테아제 억제제로서 사용된다. 본 개시내용의 쿠니츠 도메인은 (인간 지단백질 연관 응고 억제제(LACI: lipoprotein-associated coagulation inhibitor)로부터 유래된) 에칼란티드(Ecallantide)를 포함할 수 있다.

[0120] 본 개시내용의 모노바디는 단일 쇄 항체와 크기가 유사한 (약 94개의 아미노산을 포함하고, 질량이 약 10

kDa인) 작은 단백질이다. 이 유전적으로 조작된 단백질은 항원을 비롯한 표적 서열에 특이적으로 결합한다. 본 개시내용의 모노바디는 하나 이상의 상이한 단백질 또는 표적 서열을 특이적으로 표적화할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 모노바디는 인간 피브로넥틴의 구조를 모방하고, 더욱 바람직하게는 피브로넥틴의 10번째 세포외 타입 III 도메인 도메인의 구조를 모방하는 단백질 스캐폴드를 포함한다. 피브로넥틴의 10번째 세포외 타입 III 도메인 뿐만 아니라, 그의 모노바디 모방체도 각 면에서 배럴, 및 항체의 3개의 상보성 결정 영역(CDR)에 상응하는 3개의 노출된 루프를 형성하는 7개의 베타 시트들을 포함한다. 항체의 가변 도메인의 구조와 대조적으로, 모노바디에는 금속 이온에 대한 임의의 결합 부위 뿐만 아니라, 중심 이황화 결합도 결여한다. 다중특이적 모노바디는 루프 BC 및 FG를 변형시킴으로써 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 모노바디는 애드넥틴을 포함할 수 있다.

[0121] 상기 방법은 증상, 효과, 또는 기전의 상기 조정, 치료, 경감, 예방, 또는 감소를 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 유효량의, 적어도 하나의 스캐폴드 단백질을 포함하는 조성물 또는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 유효량은 본원에서 기술되거나, 또는 당업계에 공지된 바와 같이 공지된 방법을 사용하여 수행되고, 결정되는 바와 같이, 단일 (예컨대, 볼루스), 다회 또는 연속 투여당 약 0.001 내지 500 mg/kg인 양을 포함할 수 있거나, 또는 혈청 농도를 달성하도록 단일, 다회 또는 연속 투여당 0.01-5,000 ㎍/ml (혈청) 농도, 또는 그 안의 임의의 유효 범위 또는 값을 포함할 수 있다.

[0122] ***스캐폴드 단백질의 제조 및 생성***

[0123] 본 개시내용의 적어도 하나의 스캐폴드 단백질은 임의적으로, 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 세포주, 혼합된 세포주, 무한증식 세포 또는 무한증식 세포의 클론 집단에 의해 생산될 수 있다. 예컨대, 문헌 [Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001)]; [Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]; [Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]; [Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)]; [Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)]을 참조한다.

[0124] 스캐폴드 단백질로부터의 아미노산은 면역원성을 감소시키기 위해, 또는 결합, 친화성, 온-속도, 오프-속도, 결합활성, 친화성, 반감기, 안정성, 가용성, 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소, 증진 또는 변형시키기 위해 당업계에 공지된 바와 같이 변경, 부가 및/또는 결실될 수 있다.

[0125] 임의적으로, 스캐폴드 단백질은 항원에 대한 고친화성 및 다른 바람직한 생물학적 특성은 그대로 보유하면서 조작될 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 스캐폴드 단백질은 임의적으로 모체 및 조작된 서열의 3차원 모델을 사용하여 모체 서열 및 다양한 개념적 조작 생성물의 분석 프로세스에 의해 제조될 수 있다. 3차원 모델은 보편적으로 이용가능하고, 당업자가 잘 알고 있는 것이다. 선별된 후보 서열의 개연성이 있는 3차원 입체형태 구조를 예시하고, 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하며, 이는 가능한 면역원성도 측정할 수 있다(예컨대, Xencor, Inc.(미국 캘리포니아주 몬로비아 소재)의 Immunofilter 프로그램). 이러한 디스플레이 검사를 통해 후보 서열의 작용에서의 잔기의 예상 역할을 분석할 수 있고, 즉, 후보 스캐폴드 단백질이 그의 항원에 결합할 수 있는 능력에 영향을 주는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 모체 및 참조 서열로부터 잔기가 선택 및 조합될 수 있고, 이로써, 원하는 특징, 예컨대, 표적 항원(들)에 대한 친화성이 달성된다. 상기 방법에 대한 대안적으로, 또는 그 방법 이외에도, 다른 적합한 조작 방법이 사용될 수 있다.

[0126] ***스캐폴드 단백질의 스크리닝***

[0127] 유사 단백질 또는 단편에의 특이적인 결합을 위한 단백질 스캐폴드를 스크리닝하는 것은 뉴클레오티드(DNA 또는 RNA 디스플레이) 또는 펩티드 디스플레이 라이브러리, 예를 들어, 시험관내 디스플레이를 사용하여 알맞게 달성될 수 있다. 상기 방법은 큰 펩티드 콜렉션을 원하는 기능 또는 구조를 가지는 개별 구성원에 대하여 스크리닝하는 것을 포함한다. 디스플레이된 뉴클레오티드 또는 펩티드 서열의 길이는 3 내지 5,000개 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 길이, 빈번하게는, 5-100개의 아미노산 길이, 및 대개는 약 8 내지 25개의 아미노산 길이이다. 펩티드 라이브러리를 생성하는 직접적인 화학적 합성 방법 이외에도, 수개의 재조합 DNA 방법이 기술되어 있다. 한 유형은 박테리오파지 또는 세포 표면 상에 펩티드 서열을 디스플레이하는 것을 포함한다. 각 박테리오파지 또는 세포는 특정 디스플레이된 펩티드 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 상기 방법은 PCT 특허 공개 번호 91/17271, 91/18980, 91/19818, 및 93/08278에 기술되어 있다.

[0128] 펩티드 라이브러리를 생성하는 다른 시스템은 시험관내 화학적 합성 및 재조합 방법, 둘 모두의 측면을 가진다. PCT 특허 공개 번호 92/05258, 92/14843, 및 96/19256을 참조한다. 미국 특허 번호 5,658,754; 및 5,643,768 또한 참조한다. 펩티드 디스플레이 라이브러리, 벡터, 및 스크리닝 키트는 인비트로겐(Invitrogen: 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재), 및 케임브리지 안티바디 테크놀러지즈(Cambridge Antibody Technologies: 영국 케임브리지셔 소재)와 같은 공급업체로부터 상업적으로 이용가능하다. 예컨대, 미국 특허 번호 4,704,692, 4,939,666, 4,946,778, 5,260,203, 5,455,030, 5,518,889, 5,534,621, 5,656,730, 5,763,733, 5,767,260, 5856456(Enzon에게로 양도); 5,223,409, 5,403,484, 5,571,698, 5,837,500(Dyax에게로 양도), 5,427,908, 5,580,717(Affymax에게로 양도); 5,885,793(Cambridge Antibody Technologies에게로 양도); 5,750,373(Genentech에게로 양도), 5,618,920, 5,595,898, 5,576,195, 5,698,435, 5,693,493, 5,698,417(Xoma), 문헌 [Colligan, 상기 문헌 동일]; [Ausubel, 상기 문헌 동일]; 또는 [Sambrook, 상기 문헌 동일]을 참조한다.

[0129] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 광범위한 친화도(KD)로 인간 또는 다른 포유동물 단백질에 결합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 임의적으로 고친화도로, 예를 들어, 당업자에 의해 실시되는 바와 같이, 표면 플라스몬 공명 또는 키넥사(Kinexa) 방법에 의해 측정된 바와 같이, 약 10-7 M 이하, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 0.1-9.9 (또는 그 안의 임의의 범위 또는 값) X 10-8, 10-9, 10-10, 10-11, 10-12, 10-13, 10-14, 10-15 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값인 KD로 표적 단백질에 결합할 수 있다.

[0130] 항원에 대한 단백질 스캐폴드의 친화도 또는 결합활성은 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험을 통해 측정될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984)]; [Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)]; 및 여기 기술된 방법 참조). 특정 단백질 스캐폴드-항원 상호작용에 대해 측정된 친화도는 상이한 조건(예컨대, 염 농도, pH)하에서 측정되었다면 달라질 수 있다. 따라서, 친화도 및 다른 항원 결합 파라미터(예컨대, KD, K온, K오프) 측정은 바람직하게는 단백질 스캐폴드 및 항원의 표준화된 용액, 및 표준화된 완충제, 예컨대, 본원에 기술된 완충제를 이용하여 진행된다.

[0131] 어떤 단백질, 항체, 및 다른 길항제가 표적 단백질에의 결합에 대해 본 발명의 단백질 스캐폴드와 경쟁하는지, 및/또는 에피토프 영역을 공유하는지 측정하기 위해 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 이용하여 경쟁 어세이가 수행될 수 있다. 당업계의 숙련가가 쉽게 알 수 있는 상기 어세이는 단백질 상의 제한된 개수의 결합 부위에 대하여 길항제 또는 리간드 사이의 경쟁을 평가한다. 단백질 및/또는 항체를 경쟁 이전 또는 이후에 고정화시키거나, 또는 불용화시키고, 표적 단백질에 결합된 샘플을 예를 들어, 경사분리에 의해(단백질/항체가 미리 불용화된 경우), 또는 원심분리에 의해(경쟁 반응 후, 단백질/항체가 침전된 경우) 비결합 샘플로부터 분리시킨다. 또한, 경쟁 결합은 기능이, 단백질 스캐폴드이 표적 단백질에 결합함으로써, 또는 결합하지 못함으로써 변경되었는지 여부, 예컨대, 단백질 스캐폴드 분자가 예를 들어, 표지의 효소 활성을 억제시키는지 또는 강화시키는지 여부에 의해 측정될 수 있다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, ELISA 및 다른 기능 어세이가 사용될 수 있다.

[0132] ***핵산 분자***

[0133] 단백질 스캐폴드를 코딩하는 본 개시내용의 핵산 분자 RNA 형태, 예컨대, mRNA, hnRNA, tRNA 또는 임의의 다른 형태, 또는 클로닝에 의해 수득되거나, 또는 합성에 의해 제조된 cDNA 및 게놈 DNA, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는 DNA 형태일 수 있다. DNA는 삼중 가닥, 이중 가닥, 또는 단일 가닥, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다. DNA 또는 RNA의 적어도 하나의 가닥 중 임의 일부분은 센스 가닥으로도 공지된 코딩 가닥일 수 있거나, 이는 안티센스 가닥으로도 공지된 비코딩 가닥일 수 있다.

[0134] 본 개시내용의 단리된 핵산 분자는 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 중 적어도 하나의 명시된 일부분과 같은, 임의적으로, 하나 이상의 인트론과 함께, 오픈 리딩 프레임(ORF: open reading frame)을 포함하는 핵산 분자; 표적 단백질에 결합하는 단백질 스캐폴드 또는 루프 영역에 대한 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자; 및 본원에 기술된 바와 같이 및/또는 당업계에 공지된 바와 같이, 상기 기술된 것과 실질적으로는 상이하지만, 유전자 코드의 축퇴성에 기인하여, 여전히 그대로 단백질 스캐폴드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 물론, 유전자 코드도 당업계에 널리 공지되어 있다. 따라서, 당업자는 본 발명의 특정 단백질 스캐폴드를 코딩하는 상기와 같은 축퇴성 핵산 변이체를 통상적으로 생성할 수 있을 것이다. 예컨대, 문헌 [Ausubel, et al., 상기 문헌 동일]을 참조할 수 있고, 상기 핵산 변이체가 본 발명에 포함된다.

[0135] 본원에 명시된 바와 같이, 단백질 스캐폴드를 코딩하는 핵산을 포함하는 본 개시내용의 핵산 분자는 단독으로 단백질 스캐폴드 단편의 아미노산 서열을 코딩하는 것; 전체 단백질 스캐폴드 또는 그의 일부에 대한 코딩 서열; 단백질 스캐폴드, 단편 또는 일부 뿐만 아니라, 추가 서열에 대한 코딩 서열, 예컨대, 비코딩 5' 및 3' 서열, 예컨대, 전사, mRNA 프로세싱에서 중요한 역할을 하는 전사되고, 번역되지 않는 서열(스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호 포함)(예컨대, mRNA의 리보솜 결합 및 안정성)을 포함하나, 이에 제한되지 않는 추가의 비코딩 서열과 함께, 상기 언급된 추가 코딩 서열, 예컨대, 적어도 하나의 인트론을 포함 또는 포함하지 않는, 적어도 하나의 신호 리더 또는 융합 펩티드의 코딩 서열; 예컨대, 추가의 관능성을 제공하는 것과 같은, 추가 아미노산을 코딩하는 추가의 코딩 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 단백질 스캐폴드의 서열은 마커 서열, 예컨대, 단백질 스캐폴드 단편 또는 일부를 포함하는 융합된 단백질 스캐폴드의 정제를 촉진시키는 펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0136] ***본원에 기술된 바와 같은 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드***

[0137] 본 개시내용은 선택적 하이브리드화 조건하에서 본원에 기술된 바와 같은 폴리뉴클레오티드에 하이브리드화하는 단리된 핵산을 제공한다. 따라서, 본 실시양태의 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 핵산을 단리, 검출 및/또는 정량화하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 기탁된 라이브러리 내의 일부의 또는 전장의 클론을 확인, 단리 또는 증폭시키는 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 인간 또는 포유동물 핵산 라이브러리로부터의 단리되거나, 또는 다르게는 그로부터의 cDNA에 상보적인 게놈 또는 cDNA 서열이다.

[0138] 바람직하게, cDNA 라이브러리는 적어도 80% 전장의 서열, 바람직하게, 적어도 85% 또는 90% 전장의 서열, 및 더욱 바람직하게, 적어도 95% 전장의 서열을 포함한다. cDNA 라이브러리는 희귀 서열의 출현을 증가시키기 위해 정규화될 수 있다. 상보적인 서열 대비 서열 동일성이 감소된 서열을 사용하는 경우, 전적으로 그러한 것은 아니지만, 전형적으로 낮은 또는 중간 정도로 엄격한 하이브리드화 조건이 사용된다. 중간 정도 내지 고도로 엄격한 조건은 임의적으로 더 높은 동일성을 가진 서열에 대해 사용될 수 있다. 낮은 엄격한 조건을 통해 서열 동일성이 약 70%인 서열이 선택적으로 하이브리드화될 수 있고, 그러한 조건은 이종상동성 또는 직렬상동성 서열을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0139] 임의적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 단백질 스캐폴드 중 적어도 일부를 코딩할 것이다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에의 선택적 하이브리드화를 위해 사용될 수 있는 핵산을 포함한다. 예컨대, 문헌 [Ausubel, 상기 문헌 동일]; [Colligan, 상기 문헌 동일](상기 문헌은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조한다.

[0140] ***핵산의 구성***

[0141] 본 개시내용의 단리된 핵산은 당업계에 널리 공지된 바와 같은, (a) 재조합 방법, (b) 합성 기술, (c) 정제 기술, 및/또는 (d) 그의 조합을 사용하여 제조될 수 있다.

[0142] 핵산은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 이외의 서열을 알맞게 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 하나 이상의 엔도뉴클레아제 제한 부위를 포함하는 다중 클로닝 부위가 핵산 내로 삽입될 수 있다. 또한, 본 개시내용의 번역된 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해 번역가능한 서열이 삽입될 수 있다. 예를 들어, 헥사-히스티딘 마커 서열은 본 개시내용의 단백질을 정제하는 데 알맞은 수단을 제공한다. 코딩 서열을 배제한, 본 개시내용의 핵산으로는 임의적으로 본 개시내용의 폴리뉴클레오드의 클로닝 및/또는 발현을 위한 벡터, 어댑터, 또는 링커가 있다.

[0143] 클로닝 및/또는 발현에서의 그의 기능을 최적화시키기 위해, 폴리뉴클레오티드의 단리를 돕기 위해, 또는 폴리뉴클레오티드의 세포 내로의 도입을 개선시키기 위해 추가 서열이 상기 클로닝 및/또는 발현 서열에 부가될 수 있다. 클로닝 벡터, 발현 벡터, 어댑터, 및 링커의 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다(예컨대, 문헌 [Ausubel, 상기 문헌 동일]; 또는 [Sambrook, 상기 문헌 동일] 참조).

[0144] ***핵산을 구성하기 위한 재조합 방법***

[0145] 본 개시내용의 단리된 핵산 조성물, 예컨대, RNA, cDNA, 게놈 DNA, 또는 그의 임의의 조합은 당업자에게 공지된 임의의 다수의 클로닝 방법을 사용하여 생물학적 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 엄격한 조건하에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 선택적으로 하이브리드화하는 올리고뉴클레오티드 프로브는 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리 중의 원하는 서열을 확인하는 데 사용된다. RNA의 단리, 및 cDNA 및 게놈 라이브러리의

구성은 당업계의 숙련가에게 널리 공지되어 있다(예컨대, 문헌 [Ausubel, 상기 문헌 동일]; 또는 [Sambrook, 상기 문헌 동일] 참조).

[0146] ***핵산 스크리닝 및 단리 방법***

[0147] cDNA 또는 게놈 라이브러리는 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 서열에 기초하여 프로브를 사용하여 스크리닝될 수 있다. 프로브는 게놈 DNA 또는 cDNA 서열과 하이브리드화시켜 동일한 또는 상이한 유기체에서 상동성 유전자를 단리시키는 데 사용될 수 있다. 당업자는 어세이에서 다양한 엄격도의 하이브리드화가 사용될 수 있으며; 하이브리드화 또는 세척 매질이 엄격할 수 있다. 하이브리드화 조건의 엄격도가 높을수록, 이중체 형성을 위해서는 프로브와 표적 사이의 상보성 정도가 더욱 커야 한다. 엄격도는 온도, 이온 강도, pH 및 부분 변성 용매, 예컨대, 포름아미드의 존재 중 하나 이상의 것에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 하이브리드화의 엄격성은 예를 들어, 포름아미드의 농도를 0% 내지 50% 범위 내로 조작함으로써 반응물 용액의 극성을 변화시킴으로써 알맞게 변화된다. 검출가능한 결합을 위해 요구되는 상보성 정도(서열 동일성)는 하이브리드화 매질 및/또는 세척 매질의 엄격도에 따라 달라질 것이다. 상보성 정도는 최적으로는 100%, 또는 70-100%, 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값이 될 것이다. 그러나, 하이브리드화 및/또는 세척 매질의 엄격성을 감소시킴으로써 프로브와 프라이머에서의 최소 서열 변이가 상쇄될 수 있다는 점을 이해하여야 한다.

[0148] RNA 또는 DNA의 증폭 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, 본원에 제공된 교시 및 가이던스에 기초하여, 과도한 실험 없이 본 개시내용에 따라 사용될 수 있다.

[0149] 공지된 DNA 또는 RNA 증폭 방법으로는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 관련된 증폭 프로세스(예컨대, 미국 특허 번호 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188(Mullis, et al.); 4,795,699 및 4,921,794(Tabor, et al.); 5,142,033(Innis); 5,122,464(Wilson, et al.); 5,091,310(Innis); 5,066,584(Gyllensten, et al.); 4,889,818(Gelfand, et al.); 4,994,370(Silver, et al.); 4,766,067(Biswas); 4,656,134(Ringold) 참조) 및 이중 가닥 DNA 합성을 위한 주형으로서 표적 서열에 대한 안티센스 RNA를 사용하여 RNA 매개 증폭(미국 특허 번호 5,130,238(Malek, et al.), 상표명 NASBA)(상기 참고문헌의 전체 내용이 본원에서 참조로 포함된다)포함하나, 이에 제한되지 않는다(예컨대, 문헌 [Ausubel, 상기 문헌 동일]; 또는 [Sambrook, 상기 문헌 동일] 참조).

[0150] 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술은 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 서열 및 관련 유전자를 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리로부터 직접적으로 증폭시키는 데 사용될 수 있다. PCR 및 다른 시험관내 증폭 방법은 또한 발현시키고자 하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 클로닝하는 데, 샘플 중 원하는 mRNA의 존재를 검출하기 위한 프로브로서 사용하기 위한 핵산을 제조하는 데, 핵산 서열분석을 위해, 또는 다른 목적을 위해 유용할 수 있다. 시험관내 증폭 방법을 통해 기술자에게 지시하는 데 충분한 기술의 예는 문헌 [Berger, 상기 문헌 동일], [Sambrook, 상기 문헌 동일], 및 [Ausubel, 상기 문헌 동일] 뿐만 아니라, 미국 특허 번호 4,683,202 (1987)(Mullis, et al.); 및 [Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990)]에서도 살펴볼 수 있다. 게놈 PCR 증폭용으로서 상업적으로 이용가능한 키트는 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 어드밴티지-GC 게노믹 PCR 키트(Advantage-GC Genomic PCR Kit)(Clontech)를 참조한다. 추가로, 예컨대, T4 유전자 32 단백질(Boehringer Mannheim)은 긴 PCR 생성물의 수율을 개선시키는 데 사용될 수 있다.

[0151] ***핵산을 구성하기 위한 합성 방법***

[0152] 본 개시내용의 단리된 핵산은 공지된 방법에 의한 직접적인 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다(예컨대, 문헌 [Ausubel, et al., 상기 문헌 동일] 참조). 화학적 합성은 일반적으로 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 제조하고, 이는 상보적인 서열과의 하이브리드화에 의해, 또는 주형으로서 단일 가닥을 사용하는 DNA 폴리머라제를 이용하는 중합화에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. 당업자는 DNA의 화학적 합성이 약 100개 이상의 염기로 이루어진 서열로 제한될 수 있지만, 더욱 긴 서열도 더 짧은 서열의 라이게이션에 의해 수득될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0153] ***재조합 발현 카세트***

[0154] 본 개시내용은 본 개시내용의 핵산을 포함하는 재조합 발현 카세트를 추가로 제공한다. 본 개시내용의 핵산 서열, 예를 들어, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 cDNA 또는 게놈 서열은 적어도 하나의 원하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있는 재조합 발현 카세트를 구성하는 데 사용될 수 있다. 재조합 발현 카세트는 전형적으로 의도된 숙주 세포에서의 폴리뉴클레오티드의 전사를 지시하는 전사 개시 조절 서열에 작동가능하게 연결된

본 개시내용의 폴리뉴클레오티드를 포함할 것이다. 본 개시내용의 핵산의 발현을 지시하는 데 이종성 및 비이종성(즉, 내인성) 프로모터, 둘 모두가 사용될 수 있다.

[0155] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 발현을 상향 또는 하향 조절하기 위해 프로모터, 인핸서, 또는 다른 요소로서 작용하는 단리된 핵산이 비이종성 형태의 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드의 적절한 위치(상류, 하류 또는 인트론내) 도입될 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 생체내 또는 시험관내에서 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 변경될 수 있다.

[0156] ***벡터 및 숙주 세포***

[0157] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 단리된 핵산 분자를 포함하는 벡터, 재조합 벡터로 유전적으로 조작된 숙주 세포, 및 당업계에 널리 공지된 바와 같은 재조합 기술에 의한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 제조에 관한 것이다. 예컨대, 문헌 [Sambrook, et al., 상기 문헌 동일]; [Ausubel, et al., 상기 문헌 동일](상기 각 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조한다.

[0158] 예를 들어, PB-EF1a 벡터가 사용될 수 있다. 벡터는 하기 뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0159] tgtacatagattaaccctagaaagataatcatattgtgacgtacgttaaagataatcatgcgtaaaattgacgcatgtgttttatcggtctgta
tatcgaggtttatttattaatttgaatagatattaagttttattatatttacacttacatactaataataaattcaacaaacaatttatttatgtttattt
atttattaaaaaaaaacaaaaactcaaaatttcttctataaagtaacaaaacttttatcgaatacctgcagcccgggggatgcagagggac
agcccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctcccccgctaggggggcagcagcgagccgcccgggggctccgctccg
gtccggcgctccccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcct
ctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctgggggggatacggggaaaagttgactgtgcctttcgatcgaaccatggaca
gttagctttgcaaagatggataaagttttaaacagagaggaatctttgcagctaatggaccttctaggtcttgaaaggagtgggaattggc
tccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcct
agagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataa
gtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggc
ctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgg
gtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgt
gcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgcttttttct
ggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtc
ccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgc
tctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaa
agatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccaca
caaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttct
cgagcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaagtta
ggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagt
ttttttcttccatttcaggtgtcgtgagaattctaatacgactcactatagggtgtgctgtctcatcattttggcaaagattggccaccaagctt

gtcctgcaggagggtcgacgcctctagacgggcggccgctccggatccacgggtaccgatcacatatgcctttaattaaacactagtt
ctatagtgtcacctaaattccctttagtgagggttaatggccgtaggccgccagaattgggtccagacatgataagatacattgatgagtt
tggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaat
aaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttttcggactctaggacctgcgcatg
cgcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttca
gaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgctgccggctcggggatgcgggggggagcgccggga
ccggagcggagccccgggcggctcgctgctgcccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggc
tgtccctctcaccgcggtggagctccagcttttgttcgaattggggccccccctcgagggtatcgatgatatctataacaagaaaatatat
atataataagttatcacgtaagtagaacatgaaataacaatataattatcgtatgagttaaatcttaaaagtcacgtaaaagataatcatgcg
tcattttgactcacgcggtcgttatagttcaaaatcagtgacacttaccgcattgacaagcacgcctcacgggagctccaagcggcgact
gagatgtcctaaatgcacagcgacggattcgcgctatttagaaagagagagcaatatttcaagaatgcatgcgtcaattttacgcagact
atctttctagggttaatctagctagccttaagggcgcctattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagc
tgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcg
gtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaa
catgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttct
gcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaa
ggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcacc
gcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgata
gttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactg
agatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcg
gaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcg
tcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggcc
ttttgctcacatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaa
cttggtctgacagtcagaagaactcgtcaagaaggcgatagaaggcgatgcgctgcgaatcgggagcggcgataccgtaaagcac
gaggaagcggtcagcccattcgccgccaagctcttcagcaatatcacgggtagccaacgctatgtcctgatagcggtccgccacacc
cagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcggccattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcgccatgggtcacgacgag
atcctcgccgtcgggcatgctcgccttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagcccctgatgctcttcgtccagatcatcctgat
cgacaagaccggcttccatccgagtacgtgctcgctcgatgcgatgtttcgcttggtggtcgaatgggcaggtagccggatcaagcgt
atgcagccgccgcattgcatcagccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgccccggcacttc
gcccaatagcagccagtcccttcccgcttcagtgacaacgtcgagcacagctgcgcaaggaacgcccgtcgtggccagccacgata
gccgcgctgcctcgtcttgcagttcattcagggcaccggacaggtcggtcttgacaaaaagaaccgggcgcccctgcgctgacagcc
ggaacacggcggcatcagagcagccgattgtctgttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccacccaagcggccggagaacct
gcgtgcaatccatcttgttcaatcataatattattgaagcatttatcagggttcgtctcgtcccggtctcctcccaatgcatgtcaatattggc
cattagccatattattcattggttatatagcataaatcaatattggctattggccattgcatacgttgtatctatatcataata

(서열 번호 40)

[0160]

[0161] 폴리뉴클레오티드는 임의적으로 숙주에서의 증식을 위해 선별가능한 마커를 함유하는 벡터에 연결될 수 있다. 일반적으로, 플라스미드 벡터는 침전물, 예컨대, 인산칼슘 침전물에, 또는 하전된 지질과의 복합체에 도입된다. 벡터가 바이러스인 경우, 이는 시험관내에서 적절한 패키징 세포주를 사용하여 패키징된 후, 숙주 세포 내로 형질도입될 수 있다.

[0162] DNA 삽입체는 적절한 프로모터에 작동적으로 연결되어야 한다. 발현 구성체는 전사 개시 부위, 종결 부위, 및 전사된 영역에서, 번역을 위한 리보솜 결합 부위를 추가로 함유할 것이다. 구성체에 의해 발현된 성숙한 전사체의 코딩 부분은 바람직하게 처음에 번역 개시 코돈 및 번역시키고자 하는 mRNA의 단부에 적절하게 위치하는 종료 코돈(예컨대, UAA, UGA 또는 UAG)을 포함하고, 여기서, 포유동물 또는 진핵 세포 발현을 위해서는 UAA 및 UAG가 바람직하다.

[0163] 발현 벡터는 바람직하게, 그러나, 임의적으로, 적어도 하나의 선별가능한 마커를 포함할 것이다. 상기 마커로는 예컨대, 진핵 세포 배양의 경우, 암피실린, 제오신(*Sh ble* 유전자), 퓨로마이신(*pac* 유전자), 히그로마이신 B(*hygB* 유전자), G418/게네티신(Geneticin)(*neo* 유전자), 미코페놀산, 또는 글루타민신테타제(GS, 미국 특허 번호 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739), 블라스티시딘(*bsd* 유전자) 내성 유전자 뿐만 아니라, E. 콜라이 및 다른 박테리아 또는 원핵생물에서의 배양의 경우, 암피실린, 제오신(*Sh ble* 유전자), 퓨로마이신(*pac* 유전자), 히

그로마이신 B(*hygB* 유전자), G418/게네티신(*neo* 유전자), 카나마이신, 스펙티노마이신, 스트렙토마이신, 카르베니실린, 블레오마이신, 에리트로마이신, 폴리믹신 B, 또는 테트라사이클린 내성 유전자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다(상기 특허는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). 상기 기술된 숙주 세포에 적절한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다. 적합한 벡터는 당업자에게 쉽게 자명해질 것이다. 벡터 구성체의 숙주 세포 내로의 도입은 인산칼슘 형질감염, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 양이온성 지질 매개 형질감염, 전기천공, 형질도입, 감염 또는 다른 공지된 방법에 의해 이루어질 수 있다. 상기 방법은 당업계에, 예컨대, 문헌 [Sambrook, 상기 문헌 동일, Chapters 1-4 and 16-18]; [Ausubel, 상기 문헌 동일, Chapters 1, 9, 13, 15, 16]에 기술되어 있다.

[0164] 발현 벡터는 바람직하게, 임의적으로, 본 개시내용의 조성물 및 방법에 의해 변형된 세포의 단리를 위해 적어도 하나의 선별가능한 세포 표면 마커를 포함할 것이다. 본 개시내용의 선별가능한 세포 표면 마커는 세포 또는 세포의 서브세트를 또 다른 정의된 세포의 서브세트와 구별하는 표면 단백질, 당단백질, 또는 단백질 군을 포함한다. 바람직하게, 선별가능한 세포 표면 마커는 본 개시내용의 조성물 또는 방법에 의해 변형된 상기 세포를 본 개시내용의 조성물 또는 방법에 의해 변형되지 않은 상기 세포로부터 구별한다. 상기 세포 표면 마커로는 예컨대, "세포 표면 항원무리(cluster of designation)" 또는 "분류 결정기" 단백질(이는 대개 "CD(classification determinant)"로 약칭된다), 예컨대, 절두된 또는 전장 형태의 CD19, CD271, CD34, CD22, CD20, CD33, CD52, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 세포 표면 마커는 자살 유전자 마커 RQR8을 추가로 포함한다(문헌 [Philip B et al. Blood. 2014 Aug 21; 124(8):1277-87]).

[0165] 발현 벡터는 바람직하게, 임의적으로, 본 개시내용의 조성물 및 방법에 의해 변형된 세포의 단리를 위해 적어도 하나의 선별가능한 약물 내성 마커를 포함할 것이다. 본 개시내용의 선별가능한 약물 내성 마커로는 야생형 또는 돌연변이체 Neo, DHFR, TYMS, FRANCF, RAD51C, GCS, MDR1, ALDH1, NKX2.2, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0166] 본 개시내용의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 예컨대, 융합 단백질과 같은 변형된 형태로 발현될 수 있고, 분비 신호 뿐만 아니라, 추가의 이종성 기능성 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 정제 동안, 또는 차후의 취급 및 보관 동안, 숙주 세포에서의 안정성 및 지속성을 개선시키기 위해, 추가 아미노산, 특히, 하전된 아미노산 영역이 단백질 스캐폴드의 N 말단에 부가될 수 있다. 또한, 정제를 촉진시키기 위해 펩티드 모이어티가 본 개시내용의 단백질 스캐폴드에 부가될 수 있다. 상기 영역은 단백질 스캐폴드 또는 그의 적어도 하나의 단편이 최종적으로 제조되기 이전에 제거될 수 있다. 상기 방법은 다수의 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대, 문헌 [Sambrook, 상기 문헌 동일, Chapters 17.29-17.42 and 18.1-18.74]; [Ausubel, 상기 문헌 동일, Chapters 16, 17 and 18]에 기술되어 있다.

[0167] 당업계의 숙련가는 본 개시내용의 단백질을 코딩하는 핵산의 발현을 위해 이용가능한 다수의 발현 시스템에 대해 정통하다. 대안적으로, 본 개시내용의 핵산은 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 코딩하는 내인성 DNA를 함유하는 숙주 세포에서 (조작에 의해) 작동시킴으로써 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 상기 방법은 예컨대, 미국 특허 번호 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, 및 5,733,761(상기 특허들은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 당업계에 널리 공지되었다.

[0168] 단백질 스캐폴드, 그의 명시된 일부분 또는 변이체 제조를 위해 유용한 세포 배양물의 예로는 당업계에 공지되어 있는 바와 같은 박테리아, 효모, 및 포유동물 세포가 있다. 포유동물 세포 현탁액 또는 생물반응기 또한 사용될 수 있지만, 포유동물 세포 시스템은 대개 단층 세포 형태일 것이다. 당업계에서 글리코실화된 단백질을 발현할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 개발되었고, 이는 COS-1(예컨대, ATCC CRL 1650), COS-7(예컨대, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21(예컨대, ATCC CRL-10), CHO(예컨대, ATCC CRL 1610) 및 BSC-1(예컨대, ATCC CRL-26) 세포주, Cos-7 세포, CHO 세포, hep G2 세포, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 세포, HeLa 세포 등을 포함하며, 이는 예를 들어, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(ATCC: American Type Culture Collection: 미국 버지니아주 소재)(www.atcc.org)으로부터 쉽게 이용할 수 있다. 바람직한 숙주 세포로는 림프계 기원의 세포, 예컨대, 골수종 및 림프종 세포를 포함한다. 특히 바람직한 숙주 세포는 P3X63Ag8.653 세포(ATCC 수탁 번호 CRL-1580) 및 SP2/0-Ag14 세포(ATCC 수탁 번호 CRL-1851)이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 재조합 세포는 P3X63Ab8.653 또는 SP2/0-Ag14 세포이다.

[0169] 상기 세포에 대한 발현 벡터는 하기 발현 제어 서열, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 복제 기점; 프로모터(예컨대, 후기 또는 조기 SV40 프로모터, CMV 프로모터(미국 특허 번호 5,168,062; 5,385,839), HSV tk 프로모터, pgk(포스포글리세레이트 키나제) 프로모터, EF-1 알파 프로모터(미국 특허 번호 5,266,491), 적어도 하나의 인

간 프로모터; 인핸서, 및/또는 프로세싱 정보 부위, 예컨대, 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위(예컨대, SV40 큰 T Ag 폴리 A 부가 부위), 및 전사 종결인자 서열 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다. 예컨대, 문헌 [Ausubel et al., 상기 문헌 동일]; [Sambrook, et al., 상기 문헌 동일]을 참조한다. 본 발명의 핵산 또는 단백질 제조에 유용한 다른 세포는 공지되어 있고/거나, 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션의 세포주 및 하이브리도마 카탈로그(www.atcc.org) 또는 다른 공지된 또는 상업적 공급처로부터 이용가능하다.

[0170] 진핵 숙주 세포가 사용될 때, 전형적으로는 폴리아데닐화 또는 전사 종결인자 서열이 벡터 내로 도입된다. 종결인자 서열의 예로는 소 성장 호르몬 유전자로부터의 폴리아데닐화 서열이 있다. 전사체의 정확한 스플라이싱을 위한 서열 또한 포함될 수 있다. 스플라이싱 서열의 예로는 SV40으로부터의 VP1 인트론이 있다(문헌 [Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)]). 추가로, 당업계에 공지된 바와 같이, 숙주 세포에서 복제를 제어하는 유전자 서열이 벡터 내로 도입될 수 있다.

[0171] ***단백질 스캐폴드의 정제***

[0172] 단백질 스캐폴드는 단백질 A 정제, 황산암모늄 또는 에탄올 침전, 산 추출, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 널리 공지된 방법에 의해 재조합 세포 배양물로부터 회수 및 정제될 수 있다. 고성능 액체 크로마토그래피("HPLC": High performance liquid chromatography) 또한 정제를 위해 사용될 수 있다. 예컨대, 문헌 [Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)], 예컨대, 상기 문헌의 챕터 1, 4, 6, 8, 9, 10(각각이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조한다.

[0173] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 자연적으로 정제된 생성물, 화학적 합성 방법의 생성물, 및 예를 들어, E. 콜라이, 효모, 고등 식물, 곤충, 및 포유동물 세포를 비롯한, 원핵성 또는 진핵성 숙주로부터 재조합 기술에 의해 제조된 생성물을 포함한다. 재조합 제조 방법에서 사용되는 숙주에 의존하여, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 글리코실화될 수 있거나, 또는 비글리코실화될 수 있다. 상기 방법은 다수의 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대, 문헌 [Sambrook, 상기 문헌 동일, Sections 17.37-17.42]; [Ausubel, 상기 문헌 동일, Chapters 10, 12, 13, 16, 18 and 20], [Colligan, Protein Science, 상기 문헌 동일, Chapters 12-14](상기 문헌은 모두 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0174] ***아미노산 코드***

[0175] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 구성하는 아미노산은 대개 약칭된다. 아미노산 명칭은 당업계에서 잘 이해되고 있는 바와 같이, 그의 1 문자 코드, 그의 3 문자 코드, 명칭, 또는 3 뉴클레오티드 코돈(들)에 의해 아미노산을 표기함으로써 표시될 수 있다(문헌 [Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994] 참조). 본 개시내용의 단백질 스캐폴드는 본원에서 언급된 바와 같이, 천연 돌연변이 또는 인간 조작으로부터 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다. 기능에 필수적인, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드 중의 아미노산은 당업계에 공지된 방법, 예컨대, 부위 지정 돌연변유발법, 또는 알라닌-스캐닝 돌연변유발법에 의해 확인할 수 있다(예컨대, 문헌 [Ausubel, 상기 문헌 동일, Chapters 8, 15]; [Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)]). 후자의 방법은 분자내 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 이어서, 생성된 돌연변이체 분자를 생물학적 활성, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 적어도 하나의 중화 활성에 대하여 시험한다. 단백질 스캐폴드 결합에 중요한 부위 또한 구조적 분석에 의해, 예컨대, 결정화, 핵 자기 공명 또는 광친화성 표지화에 의해 확인할 수 있다(문헌 [Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992)] 및 [de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)]).

[0176] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명은 본 개시내용의 적어도 하나의 생물학적 활성 단백질 스캐폴드를 포함한다. 생물학적 활성 단백질 스캐폴드는 천연(비합성), 내인성 또는 관련된 및 공지된 단백질 스캐폴드의 고유 활성(specific activity)의 적어도 20%, 30%, 또는 40%, 및, 바람직하게, 적어도 50%, 60%, 또는 70%, 및 가장 바람직하게, 적어도 80%, 90%, 또는 95%-99% 이상인 고유 활성을 가진다. 효소 활성 및 기질 특이성을 검정하고, 척도를 정량화하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0177] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 유기 모이어티의 공유적 부착에 의해 변형된, 본원에 기술된 바와 같은 단백질 스캐폴드 및 단편에 관한 것이다. 상기 변형으로 약동학적 특성이 개선된(예컨대, 생체내 혈청 반감기가 증가된) 단백질 스캐폴드 단편이 생성될 수 있다. 유기 모이어티는 선형 또는 분지형 친수성 중합체 기, 지방산 기, 또는 지방산 에스테르 기일 수 이다. 특정 실시양태에서, 친수성 중합체 기의 분자량은 약 800 내지 약

120,000 달톤일 수 있고, 이는 폴리알칸 글리콜(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG: polyethylene glycol), 폴리프로필렌 글리콜(PPG: polypropylene glycol), 탄수화물 중합체, 아미노산 중합체 또는 폴리비닐 피롤리돈일 수 있고, 및 지방산 또는 지방산 에스테르 기는 약 8 내지 약 40개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0178] 본 개시내용의 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 항체에 직접 또는 간접적으로 공유 결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드 또는 단편에 결합하는 각 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체 기, 지방산 기 또는 지방산 에스테르 기일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "지방산"이라는 용어는 모노카복실산 및 디카복실산을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "친수성 중합체 기"라는 용어는 옥탄보다 물 중에서 더욱 큰 가용성을 가지는 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 폴리리신은 옥탄보다 물 중에서 더욱 큰 가용성을 가진다. 따라서, 폴리리신의 공유적 부착에 의해 변형된 단백질 스캐폴드가 본 개시내용에 의해 포함된다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 데 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 예를 들어, 폴리알칸 글리콜(예컨대, PEG, 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜(mPEG: monomethoxy-polyethylene glycol), PPG 등), 탄수화물(예컨대, 덱스트란, 셀룰로스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체(예컨대, 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리아스파테이트 등), 폴리알칸 옥시드(예컨대, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게, 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 친수성 중합체의 개별 분자 엔티티로서의 분자량은 약 800 내지 약 150,000 달톤이다. 예를 들어, PEG5000 및 PEG20,000(여기서, 아래에 적힌 숫자는 중합체의 평균 분자량(달톤)이다)이 사용될 수 있다. 친수성 중합체 기는 1 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환되는 친수성 중합체는 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 아민 기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카복실레이트에 커플링될 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카복실레이트(예컨대, N,N-카보닐 디이미다졸로 활성화된 것)는 중합체 상의 하이드록실 기에 커플링될 수 있다.

[0179] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 데 적합한 지방산 및 지방산 에스테르는 포화된 것일 수 있거나, 또는 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드를 변형시키는 데 적합한 지방산으로는 예를 들어, n-도데카노에이트(C12, 라우레이트), n-테트라데카노에이트(C14, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트(C18, 스테아레이트), n-에이코사노에이트(C20, 아라키데이트), n-도코사노에이트(C22, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트(C30), n-테트라콘타노에이트(C40), 시스-Δ9-옥타데카노에이트(C18, 올레에이트), 모든 시스-Δ5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트(C20, 아라키도네이트), 옥탄디오산, 테트라데칸디오산, 옥타데칸디오산, 도코산디오산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르로는 선형 또는 분지형 저급 알킬 기를 포함하는 디카복실산의 모노에스테르를 포함한다. 저급 알킬 기는 1 내지 약 12개, 바람직하게, 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0180] 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 적합한 방법을 사용하여, 예컨대, 개질제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "개질제"라는 용어는 활성화 기를 포함하는 적합한 유기 기(예컨대, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 지칭한다. "활성화 기"는 적절한 조건하에서 제2 화학기와 반응하여 개질제와 제2 화학기 사이에 공유 결합을 형성할 수 있는 화학 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민 반응성 활성화 기로는 친전자성 기, 예컨대, 토실레이트, 메실레이트, 할로(클로로, 브로모, 플루오로, 아이오도), N-하이드록시숙신이미딜 에스테르(NHS: N-hydroxysuccinimidyl ester) 등을 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화 기로는 예를 들어, 말레이미드, 아이오도아세틸, 아크릴로일, 피리딜 디술피드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올(TNB-티올) 등을 포함한다. 알데히드 작용기는 아민 함유 분자 또는 하이드라지드 함유 분자에 커플링될 수 있고, 아지드 기는 3가 인 기와 반응하여 포스포라미데이트 또는 포스포리미드 연결을 포함한다. 활성화 기를 분자 내로 도입시키는 데 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)] 참조). 활성화 기는 유기 기(예컨대, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접, 또는 링커 모이어티, 예를 들어, 2가 C1-C12 기(여기서, 하나 이상의 탄소 원자는 헤테로원자, 예컨대, 산소, 질소 또는 황에 의해 대체될 수 있다)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티는 예를 들어, 테트라에틸렌 글리콜, -(CH2)3-, -NH-(CH2)6-NH-, -(CH2)2-NH- 및 -CH2-O-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-CH-NH-를 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 개질제는 예를 들어, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드(EDC) 존재하에서 모노-Boc-알킬디아민(예컨대, 모노-Boc-에틸렌디아민, 모노-Boc-디아미노헥산)을 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. Boc 보호기는 기술된 바와 같이, 트리플루오로아세트산(TFA: trifluoroacetic acid)으로 처리하여 또 다른 카복실레이트에 커플링될 수 있는 1급 아민을 노출시킴으로써 생성물로부터 제거될 수 있거나, 또는 말레산 무수물과 반응될 수 있고, 생성된 생성물은 폐환화되어 지방산의 활성화된 말레이미도

유도체를 생성할 수 있다(예를 들어, WO 92/16221(Thompson, et al.)(상기 특허의 전체 교시내용은 본원에서 참조로 포함된다)).

[0181] 본 개시내용의 변형된 단백질 스캐폴드는 단백질 스캐폴드 또는 단편을 개질제와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 유기 모이어티는 아민 반응성 개질제, 예를 들어, PEG의 NHS 에스테르를 사용하여 비부위 특이적인 방식으로 단백질 스캐폴드에 결합될 수 있다. 본 개시내용의 단백질 스캐폴드의 특이적 부위에 결합된 유기 모이어티를 포함하는 변형된 단백질 스캐폴드 및 단편은 적합한 방법, 예컨대, 역 단백질분해(문헌 [Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992)]; [Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994)]; [Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997)]; [Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996)]; [Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)]), 및 문헌 [Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)]에 기술된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0182] ***추가의 치료 활성 성분을 포함하는 단백질 스캐폴드 조성물***

[0183] 본 개시내용의 단백질 스캐폴드 화합물, 조성물 또는 조합물은 임의의 적합한 보조제, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 희석제, 결합제, 안정제, 완충제, 염, 친유성 용매, 보존제, 애주번트 등 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 보조제가 바람직하다. 상기 멸균 용액의, 및 그를 제조하는 방법의 비제한적인 예가 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 문헌 [Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990]과 같이, 당업계에 널리 공지되어 있다. 당업계에 널리 공지되어 있는 바와 같이, 또는 본원에 기술된 바와 같이, 단백질 스캐폴드, 단편 또는 변이체 조성물의 투여 모드, 가용성 및/또는 안정성에 적합한 약학적으로 허용되는 담체가 통상적으로 선택될 수 있다.

[0184] 본 조성물에서 유용한 약학적 부형제 및 첨가제로는 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물(예컨대, 단당류, 이당류, 삼당류, 사당류, 및 올리고당을 비롯한 당; 유도체화된 당, 예컨대, 알디톨, 알돈산, 에스테르화된 당 등; 및 다당류 또는 당 중합체)을 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 이는 단독으로 또는 조합하여 1-99.99중량% 또는 1-99.99부피%를 포함하는, 단일로 또는 조합으로 존재할 수 있다. 예시적인 단백질 부형제로는 혈청 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민(HSA: human serum albumin), 재조합 인간 알부민(rHA: recombinant human albumin), 젤라틴, 카세인 등을 포함한다. 완충화 능력으로도 작용할 수 있는 대표적인 아미노산/단백질 성분으로는 알라닌, 글리신, 아르기닌, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 리신, 류신, 이소류신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함한다. 한 바람직한 아미노산은 글리신이다.

[0185] 본 발명에서 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제로는 예를 들어, 단당류, 예컨대, 프럭토스, 말톳, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예컨대, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예컨대, 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예컨대, 만니톨, 크실리톨, 말티톨, 락티톨, 크실리톨 소르비톨(글루시톨), 미오이노시톨 등을 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 바람직한 탄수화물 부형제는 만니톨, 트레할로스, 및 라피노스이다.

[0186] 단백질 스캐폴드 조성물은 또한 완충제 또는 pH 조절제를 포함할 수 있고; 전형적으로, 완충제는 유기 산 또는 유기 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제로는 유기 산 염, 예컨대, 시트르산 염, 아스코르브산 염, 글루콘산 염, 탄산 염, 타르타르산 염, 숙신 염, 아세트산 염, 또는 프탈산 염; 트리스, 트로메타민 하이드로클로라이드, 또는 인산염 완충제를 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 바람직한 완충제는 유기 산 염, 예컨대, 시트레이트이다.

[0187] 추가로, 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 중합체 부형제/첨가제, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈, 피콜(중합체 당), 덱스트레이트(예컨대, 사이클로덱스트린, 예컨대, 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 향미제, 항미생물제, 감미제, 항산화제, 정전기 방지제, 계면활성제(예컨대, 폴리소르베이트, 예컨대, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80"), 지질(예컨대, 인지질, 지방산), 스테로이드(예컨대, 콜레스테롤), 및 킬레이팅제(예컨대, EDTA)를 포함할 수 있다.

[0188] 본 발명에 따른 단백질 스캐폴드, 일부분 또는 변이체 조성물에서 사용하기에 적합한 상기 및 추가의 공지된 약학적 부형제 및/또는 첨가제는 예컨대, 문헌 ["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995)]에, 및 ["Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998)]에(상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)열거되어 있는 바와 같이, 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 담체 또는 부형제 물질은 탄수화물(예컨대, 당류 및 알디톨) 및 완충제

(예컨대, 시트레이트) 또는 중합체 작용제이다. 예시적인 담체 분자는 뮤코다당류, 히알루론산이며, 이는 관절내 전달에 유용할 수 있다.

[0189] ***생성물로부터의 T 세포 단리***

[0190] 백혈구분리반출술 생성물 또는 혈액은 폐쇄 시스템 및 표준 방법(예컨대, COBE Spectra Apheresis System)을 사용하여 임상 현장에서 피험체로부터 수집될 수 있다. 바람직하게, 생성물은 표준 병원 또는 제도적 백혈구분리반출술 절차에 따라 표준 백혈구분리반출술 수집용 백에 수집된다. 예를 들어, 본 개시내용의 방법의 바람직한 실시양태에서, 보통 백혈구분리반출술 동안에 사용되는 것 이상의 추가의 항응고제 또는 혈액 첨가제(헤파린 등)는 포함되지 않는다.

[0191] 대안적으로, 백혈구(WBC: white blood cell)/말초 혈액 단핵 세포(PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell)(Biosafe Sepax 2(Closed/Automated) 사용) 또는 T 세포(CliniMACS® Prodigy (Closed/Automated) 사용)는 전혈로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 그러나, 특정 피험체(예컨대, 암 진단을 받았고/거나, 치료받은 피험체)에서, WBC/PBMC 수율은 백혈구분리반출술에 의해 단리되었을 때보다 전혈로부터 단리되었을 때, 유의적으로 더 낮을 수 있다.

[0192] 본 개시내용의 임의의 대상에 대하여 백혈구분리반출술 절차 및/또는 직접적인 세포 단리 절차가 사용될 수 있다.

[0193] 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 절연 처리된 용기에 패킹되어야 하고, 임상 프로토콜에서의 사용에 대해 승인받은 표준 병원 또는 제도적 채혈 절차에 따라 제어식 실온(+19℃ 내지 +25℃)에서 유지되어야 한다. 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 냉동되지 않아야 한다.

[0194] 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 세포 농도는 수송 동안 $0.2x10^9$개의 세포/mL를 초과하지 않아야 한다. 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 강렬한 혼합은 방지되어야 한다.

[0195] 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물이 예컨대, 밤새도록 보관되어야 한다면, 이는 제어식 실온(상기와 동일)에서 유지되어야 한다. 보관하는 동안, 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 농도는 $0.2x10^9$개의 세포/mL를 초과하지 않아야 한다.

[0196] 바람직하게, 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 세포는 자가 유래 혈장에서 보관되어야 한다. 특정 실시양태에서, 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물의 세포 농도가 $0.2x10^9$개의 세포/mL보다 높다면, 생성물은 자가 유래 혈장으로 희석되어야 한다.

[0197] 바람직하게, 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 표지화 및 분리 절차 시작으로부터 24시간을 경과한 것이 아니어야 한다. 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물은 폐쇄 및/또는 자동화 시스템(예컨대, CliniMACS Prodigy)을 사용하여 세포 표지화를 위해 프로세싱 및/또는 제조될 수 있다.

[0198] 자동화 시스템은 가능하게는 세포 생성물(예컨대, 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물)의 피콜레이션(ficolation), 및/또는 세척에 의해 추가의 버피 코트 단리를 수행할 수 있다.

[0199] 폐쇄 및/또는 자동화 시스템은 (예를 들어, 예를 들어, 백혈구분리반출술 생성물, 혈액, WBC/PBMC 조성물 및/또는 T 세포 조성물로부터의) T 세포 단리를 위해 세포를 제조하고, 표지화하는 데 사용될 수 있다.

[0200] WBC/PBMC는 직접적으로 뉴클레오펙션될 수 있지만(이는 더욱 용이하고, 이를 통해 추가 단계를 면할 수 있다), 본 개시내용의 방법은 뉴클레오펙션 이전에 먼저 T 세포를 단리시키는 것을 포함할 수 있다. PBMC를 직접적으로 뉴클레오펙션시키는 더욱 용이한 전략법을 위해서는 CAR 신호전달을 통해 매개되는 CAR+ 세포의 선택적 확장이 요구되는제, 이는 T 세포를 기능적으로 고갈시킴으로써 생성물의 생체내 효율을 직접 감소시키는 것으로서, 그 단독으로는 열등한 확장 방법임을 입증하고 있는 것이다. 생성물은 T 세포, NK 세포, NKT 세포, 단핵구, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는, CAR+ 세포의 이종성 조성물일 수 있고, 이는 환자마다의 생성물의 변동성을 증가시키고, 투약 및 CRS 관리를 더욱 어렵게 만든다. T 세포가 종양 억제 및 사멸에서 1차 이펙터인 것으로 사료되는 바, 자가 유래 생성물의 제조를 위해 T 세포를 단리시키는 것이 더욱 이종성인 다른 조성물에 비해 상당한

이점을 발휘할 수 있다.

[0201] T 세포는 직접적으로 1원 표지화 절차로 표지화된 세포의 농축 또는 표지화된 세포의 고갈에 의해, 또는 간접적으로 2 단계 표지화 절차로 단리될 수 있다. 본 개시내용의 특정 농축 전략법에 따라, T 세포는 세포 수집 백에 수집될 수 있고, 비표지화된 세포(비표적 세포)는 음성 분획 백에 수집될 수 있다. 본 개시내용의 농축 전략법과 달리, 각각 비표지화된 세포(표적 세포)는 세포 수집 백에 수집되고, 표지화된 세포(비표적 세포)는 음성 분획 백에 또는 비표적 세포 백에 수집된다. 선별 시약은 항체 코팅된 비드를 포함할 수 있지만, 그에 제한되지 않는다. 항체 코팅된 비드는 변형 및/또는 확장 단계 이전에 제거될 수 있거나, 또는 변형 및/또는 확장 단계 이전에 세포 상에 유지될 수 있다. 하기의 세포 마커의 비제한적인 예들 중 하나 이상의 것이 T 세포를 단리시키는 데 사용될 수 있다: CD3, CD4, CD8, CD25, 항비오틴, CD1c, CD3/CD19, CD3/CD56, CD14, CD19, CD34, CD45RA, CD56, CD62L, CD133, CD137, CD271, CD304, IFN 감마, TCR 알파/베타, 및/또는 그의 임의의 조합. T 세포를 단리시키는 방법은 T 세포를 단리시키는 데 사용될 수 있는 하기의 세포 마커의 비제한적인 예들 중 하나 이상의 것에 특이적으로 결합하고/거나, 그를 검출가능하게 표지화하는 하나 이상의 시약을 포함할 수 있다: CD3, CD4, CD8, CD25, 항비오틴, CD1c, CD3/CD19, CD3/CD56, CD14, CD19, CD34, CD45RA, CD56, CD62L, CD133, CD137, CD271, CD304, IFN 감마, TCR 알파/베타, 및/또는 그의 임의의 조합. 이들 시약은 "우수제조관리기준("GMP": "Good Manufacturing Practices") 등급일 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수 있다. 시약은 써모 다이나비즈(Thermo DynaBeads) 및 밀테니이 클리니MACS(Miltenyi CliniMACS) 제품을 포함할 수 있지만, 그에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 T 세포를 단리시키는 방법은 표지화 및/또는 단리 단계의 다회 반복을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 T 세포를 단리시키는 방법 중 임의 지점에서, 원치않는 세포 및/또는 원치않는 세포 유형에 대해 양성적으로 또는 음성적으로 선별함으로써 본 개시내용의 T 세포 생성물 조성물로부터 원치않는 세포 및/또는 원치않는 세포 유형을 고갈시킬 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 생성물 조성물은 CD4, CD8, 및/또는 또 다른 T 세포 마커(들)를 발현할 수 있는 추가의 세포 유형을 함유할 수 있다.

[0202] 본 개시내용의 T 세포 뉴클레오펙션 방법은 예를 들어, 뉴클레오펙션 이후에 단리 단계, 또는 TCR 신호전달을 통한 선택적 확장 단계를 포함하는, WBC/PBMC의 집단 또는 조성물 중의 T 세포의 뉴클레오펙션 프로세스에 의해 T 세포 단리 단계를 소거시킬 수 있다.

[0203] 특정 세포 집단은 T 세포 농축 및/또는 분류 이전 또는 이후의 양성적 또는 음성적 선별에 의해 고갈될 수 있다. 세포 생성물 조성물로부터 고갈될 수 있는 세포 조성물의 예로는 골수양 세포, CD25+ 조절 T 세포(T Reg), 수지상 세포, 대식세포, 적혈구, 비만 세포, 감마-델타 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해(NK) 유사 세포(예컨대, 사이토카인 유도 살해(CIK) 세포), 유도 자연 살해(iNK: induced natural killer) T 세포, NK T 세포, B 세포, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0204] 본 개시내용의 T 세포 생성물 조성물은 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함할 수 있다. CD4+ 및 CD8+ T 세포는 단리 또는 선별 절차 동안 별개의 수집 백 내로 단리될 수 있다. CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 추가로 별개로 처리될 수 있거나, 특정 비로 재구성(동일한 조성물로의 조합) 후에 처리될 수 있다.

[0205] 재구성될 수 있는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 특정 비는 사용되는 확장 기술의 유형 및 효능, 세포 배지, 및/또는 T 세포 생성물 조성물의 확장을 위해 사용된 성장 상태에 의존할 수 있다. 가능한 CD4+:CD8+ 비의 예로는 50%:50%, 60%:40%, 40%:60% 75%:25% 및 25%:75%를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0206] CD8+ T 세포는 종양 세포 사멸에 대해 강력한 효능을 보이는 바, CD4+ T 세포는 CD8+ T 세포 증식능 및 기능을 지원하는 데 요구되는 사이토카인을 다수 제공한다. 정상적인 기증자로부터 단리된 T 세포는 주로 CD4+이기 때문에, T 세포 생성물 조성물은 다르게는 생체내 존재하는 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 개선시키기 위해 CD4+:CD8+ 비와 관련하여 시험관내에서 인공적으로 조정된다. 자가 유래 T 세포 생성물 조성물의 생체외 확장을 위해 최적화된 비 또한 사용될 수 있다. T 세포 생성물 조성물의 인공적으로 조정된 CD4+:CD8+ 비를 고려해 볼 때, 본 개시내용의 생성물 조성물은 유의적으로 상이할 수 있고, 이는 임의의 자연적으로 발생된 T 세포 집단보다 유의적으로 더욱 큰 이점을 제공할 수 있다는 점에 주의하는 것이 중요하다.

[0207] 바람직한 T 세포 단리 방법은 본래 그대로의 범용 T 세포를 수득하기 위한 음성적 선별 전략법을 포함할 수 있고, 이는 조작되지 않고, 자연적으로 발생된 종류/비의 T 세포를 함유하는 T 세포를 포함한다는 것을 의미한다.

[0208] 양성적 또는 음성적 선별을 위해 사용될 수 있는 시약으로는 자기 세포 분리 비드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 자기 세포 분리 비드는 본 개시내용의 T 세포 단리 방법에서 다음 단계를 수행하기 이전에, CD4+ T 세포 집단, CD8+ T 세포 집단, 또는 CD4+ 및 CD8+ T 세포, 둘 모두의 혼합된 집단으로부터 제거되거나, 또는 고갈

될 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수도 있다.

[0209] T 세포 조성물 및 T 세포 생성물 조성물은 냉동보존, 표준 T 세포 배양 배지 중 보관, 및/또는 유전자 변형을 위해 제조될 수 있다.

[0210] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극을 받지 않은 T 세포 조성물, 휴지 T 세포 조성물 또는 그의 임의의 일부는 높은 회수, 생존능, 표현형, 및/또는 기능적 능력을 가진 인간 세포를 보관 및 회수하는 데 최적화된 표준 냉동보존 방법을 사용하여 냉동보존될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 냉동보존 배지 및/또는 프로토콜이 사용될 수 있다. 본 개시내용의 냉동보존 방법은 동결 관련 독성을 감소시키기 위해 DMSO 무함유 냉동보존제(예컨대, CryoSOfree™ DMSO-free Cryopreservation Medium)를 포함할 수 있다.

[0211] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극을 받지 않은 T 세포 조성물, 휴지 T 세포 조성물 또는 그의 임의의 일부는 배양 배지 중에 보관될 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 세포 보관, 세포 유전자 변형, 세포 표현형 및/또는 세포 확장을 위해 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 하나 이상의 항생제를 포함할 수 있다. 세포 배양 배지 내에 항생제를 포함하는 것은 뉴클레오펙션을 통한 유전자 변형 이후의 형질감염 효능 및/또는 세포 수율을 감소시킬 수 있기 때문에, 특이적인 항생제(또는 그의 조합) 및 그의 각각의 농도(들)는 뉴클레오펙션을 통한 유전자 변형 이후의 최적의 형질감염 효능 및/또는 세포 수율을 위해 변경될 수 있다.

[0212] 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 혈청을 포함할 수 있고, 추가로, 혈청 조성 및 농도는 최적의 세포 결과물을 위해 변경될 수 있다. 비록 FBS/FCS가 본 개시내용의 T 세포 배양 배지에서의 사용을 위해 고려되기는 하지만, 이는 이종단백질을 도입시킬 수 있기 때문에, T 세포 배양을 위해서는 인간 AB 혈청이 FBS/FCS보다 바람직하다. 배양물 중의 T 세포 조성물의 투여 대상이 되는 것으로 의도되는 피험체의 혈액으로부터 단리될 수 있고, 따라서, 본 개시내용의 T 세포 배양 배지는 자가 유래 혈청을 포함할 수 있다. 무혈청 배지 또는 혈청 대체물질 또한 본 개시내용의 T 세포 배양 배지에서 사용될 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 배양 배지 및 방법의 특정 실시양태에서, 생존능이 더욱 크고/거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션이 이루어지고/거나, 뉴클레오펙션 이후 더욱 큰 생존능을 보이고/거나, 더욱 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는, 더욱 건강한 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 무혈청 배지 또는 혈청 대체물질이 배지를 이종혈청으로 보충하는 것보다 이점을 제공할 수 있다.

[0213] T 세포 배양 배지는 상업적으로 이용가능한 세포 성장 배지를 포함할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 세포 성장 배지의 예로는 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0214] T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극을 받지 않은 T 세포 조성물, 휴지 T 세포 조성물 또는 그의 임의의 일부는 유전자 변형을 위해 제조될 수 있다. 유전자 변형을 위한 T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극을 받지 않은 T 세포 조성물, 휴지 T 세포 조성물 또는 그의 임의의 일부의 제조는 세포 세척 및/또는 원하는 뉴클레오펙션 완충제 중의 재현탁을 포함할 수 있다. 뉴클레오펙션에 의한 유전자 변형을 위해 냉동보존된 T 세포 조성물을 해동시키고, 제조할 수 있다. 표준 또는 공지된 프로토콜에 따라 냉동보존된 세포를 해동시킬 수 있다. 냉동보존된 세포의 해동 및 제조는 생존능이 더욱 크고/거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션이 이루어지고/거나, 뉴클레오펙션 이후 더욱 큰 생존능을 보이고/거나, 더욱 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득하기 위해 최적화될 수 있다. 예를 들어, 그리폴스 알부테인(Grifols Albutein)(25% 인간 알부민)이 해동 및/또는 제조 프로세스에서 사용될 수 있다.

[0215] ***자가 유래 T 세포 생성물 조성물의 유전자 변형***

[0216] 예를 들어, 뉴클레오펙션 기술, 예컨대, 전기천공을 이용하여 T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극을 받지 않은 T 세포 조성물, 휴지 T 세포 조성물 또는 그의 임의의 일부를 유전적으로 변형될 수 있다. 뉴클레오펙션되는 세포의 총 개수, 뉴클레오펙션 반응물의 총 부피, 및 샘플 제조의 정확한 타이밍은 생존능이 더욱 크고/거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션이 이루어지고/거나, 뉴클레오펙션 이후 더욱 큰 생존능을 보이고/거나, 더욱 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득하기 위해 최적화될 수 있다.

[0217] 뉴클레오펙션 및/또는 전기천공은 예를 들어, 론자 아막사(Lonza Amaxa), 맥스사이트 펄스애질(MaxCyte PulseAgile), 하버드 에퍼레이터스 BTX(Harvard Apparatus BTX), 및/또는 인비트로겐 네온(Invitrogen Neon)을

사용하여 달성될 수 있다. 뉴클레오펙션을 위해서는 플라스틱 중합체 전극을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 비금속 전극 시스템이 바람직할 수 있다.

[0218] 뉴클레오펙션에 의한 유전자 변형 이전에, T 세포 조성물, T 세포 생성물 조성물, 자극을 받지 않은 T 세포 조성물, 휴지 T 세포 조성물 또는 그의 임의의 일부를 뉴클레오펙션 완충제 중에 재현탁시킬 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는 상업적으로 이용가능한 뉴클레오펙션 완충제를 포함한다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는 생존능이 더욱 크고/거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션이 이루어지고/거나, 뉴클레오펙션 이후 더욱 큰 생존능을 보이고/거나, 더욱 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득하기 위해 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는 PBS, HBSS, 옵티MEM, BTX프레스, 아막사 뉴클레오펙터, 인간 T 세포 뉴클레오펙션 완충제 및 그의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 완충제는 생존능이 더욱 크고/거나, 더 높은 효율로 뉴클레오펙션이 이루어지고/거나, 뉴클레오펙션 이후 더욱 큰 생존능을 보이고/거나, 더욱 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득하기 위해 하나 이상의 보충 인자를 포함할 수 있다. 예시적인 보충 인자로는 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 인터류킨 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 사이토카인, 케모카인, 및 인터류킨으로는 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN 감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 염, 미네랄, 및 대사산물로는 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염, 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgCl2, Na2HPO4, NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313, 크라운-5, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 배지, 예컨대, PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로 및 그의 조합의 억제제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 억제제로는 TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 억제제(예컨대, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 세포 전달을 증진시키고/거나, 핵 전달 또는 수송을 증진시키고/거나, 핵산의 핵 내로의 촉진된 수송을 증진시키고/거나, 에피염색체 핵산의 분해를 증진시키고/거나, DNA 매개 독성을 감소시키는 방식으로 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약의 예로는 pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소, 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0219] 트랜스포존 및 트랜스포사제를 포함하는 전위 시약은 (임의적으로, 뉴클레오펙션 반응물 바이알 또는 큐벳 내에 함유된) 뉴클레오펙션 완충제에 세포를 첨가하기 이전, 그와 동시에, 또는 그 이후에 본 개시내용의 뉴클레오펙션 반응물에 첨가될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 플라스미드 DNA, 선형화된 플라스미드 DNA, PCR 생성물, DOGGYBONE™ DNA, mRNA 주형, 단일 또는 이중 가닥 DNA, 단백질-핵산 조합 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 하나 이상의 TTAA 부위(들), 하나 이상의 역위 말단 반복부(들)(ITR), 하나 이상의 긴 말단 반복부(들)(LTR: long terminal repeat), 하나 이상의 인슐레이터(들), 하나 이상의 프로모터(들), 하나 이상의 전장 또는 절두된 유전자(들), 하나 이상의 폴리A 신호(들), 하나 이상의 자기 절단 2A 펩티드 절단 부위(들), 하나 이상의 내부 리보솜 유입 부위(들)(IRES: internal ribosome entry site), 하나 이

상의 인핸서(들), 하나 이상의 조절인자(들), 하나 이상의 복제 기점(들), 및 그의 임의의 조합을 코딩하는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0220] 본 개시내용의 트랜스포존은 하나 이상의 전장 또는 절두된 유전자(들)를 코딩하는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존에 의해 도입된 전장 및/또는 절두된 유전자(들)는 신호 펩티드, 센티린, 단일 쇄 가변 단편(scFv: single chain variable fragment), 힌지, 막관통 도메인, 공자극 도메인, 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 T 세포 수용체(CAR-T), CARTyrin(센티린을 포함하는 CAR-T), 수용체, 리간드, 사이토카인, 약물 내성 유전자, 종양 항원, 동종항원 또는 자기항원, 효소, 단백질, 펩티드, 폴리펩티드, 형광 단백질, 뮤테인 또는 그의 임의의 조합 중 하나 이상의 것을 코딩할 수 있다.

[0221] 본 개시내용의 트랜스포존은 물, TAE, TBE, PBS, HBSS, 배지, 본 개시내용의 보충 인자, 또는 그의 임의의 조합 중에서 제조될 수 있다.

[0222] 본 개시내용의 트랜스포존은 임상 안전성을 최적화시키고/거나, 제조가능성을 개선시키도록 디자인될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본 개시내용의 트랜스포존은 불필요한 서열 또는 영역을 제거하고/거나, 비항생제 선별 마커를 포함함으로써 임상 안전성을 최적화시키고/거나, 제조가능성을 개선시키도록 디자인될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존은 GMP 등급일 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수 있다.

[0223] 본 개시내용의 트랜스포사제 효소는 플라스미드 DNA, mRNA, 단백질, 단백질-핵산 조합 또는 그의 임의의 조합의 하나 이상의 서열에 의해 코딩될 수 있다.

[0224] 본 개시내용의 트랜스포사제 효소는 물, TAE, TBE, PBS, HBSS, 배지, 본 개시내용의 보충 인자, 또는 그의 임의의 조합 중에서 제조될 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포사제 효소는 또는 그를 전달하는 서열/구성체는 GMP 등급일 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수 있다.

[0225] 본 개시내용의 트랜스포존 및 트랜스포사제 효소는 임의 수단에 의해 세포레 전달될 수 있다.

[0226] 비록 본 개시내용의 조성물 및 방법이 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제를 플라스미드 DNA(pDNA: plasmid DNA)에 의해 세포에 전달하는 것을 포함하지만, 전달을 위해 플라스미드를 사용함으로써 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제를 세포의 염색체 DNA 내로 통합시킬 수 있고, 이로써 연속된 트랜스포사제 발현이 이루어질 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제 효소는 염색체 통합을 위한 임의의 가능성을 제거하기 위해 mRNA로서 또는 단백질로서 세포에 전달될 수 있다.

[0227] 본 개시내용의 트랜스포존 및 트랜스포사제는 단독으로 또는 서로 조합하여 함께 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제의 뉴클레오펙션 반응물 내로의 도입 이전에 미리 인큐베이션될 수 있다. 트랜스포존 및 트랜스포사제, 각각의 절대량 뿐만 아니라, 상대적인 양, 예컨대, 트랜스포존 대 트랜스포사제의 비는 최적화될 수 있다.

[0228] 임의적으로, 바이알 또는 큐벳에서의 뉴클레오펙션 반응물 제조 후, 반응물을 뉴클레오펙터 장치 내로 로딩하고, 제조사의 프로토콜에 따라 전기 펄스 전달을 위해 활성화시킬 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제(또는 본 개시내용의 트랜스포존 및/또는 트랜스포사제를 코딩하는 서열)를 세포에 전달하기 위해 사용되는 전기 펄스 조건은 생존능이 증진되고/거나, 뉴클레오펙션율이 더 높고/거나, 뉴클레오펙션 이후 생존능이 더욱 크고/거나, 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득하기 위해 최적화될 수 있다. 아막사 뉴클레오펙터 기술을 사용할 때, 아막사 2B 또는 4D 뉴클레오펙터용의 각각의 다양한 뉴클레오펙션 프로그램이 고려된다.

[0229] 본 개시내용의 뉴클레오펙션 반응 후, 세포는 세포 배지에 온화하게 첨가될 수 있다. 예를 들어, T 세포에 대해 뉴클레오펙션 반응이 수행될 때, T 세포는 T 세포 배지에 첨가될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지는 임의의 하나 이상의 상업적으로 이용가능한 배지를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 생존능이 증진되고/거나, 뉴클레오펙션율이 더 높고/거나, 뉴클레오펙션 이후 생존능이 더욱 크고/거나, 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득하기 위해 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지 및 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 생존능, 뉴클레오펙션율, 뉴클레오펙션 이후의 생존능, 세포 표현형, 및/또는 확장 기술 추가시 더욱 큰/더욱 빠른 확장을 증진시키기 위해 본 개시내용의 하나 이상의 보충 인자를 포함할 수 있다. 예시적인 보충 인자로는 재조합 인간 사이토카인, 케모카인,

인터류킨 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 사이토카인, 케모카인, 및 인터류킨으로는 IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN 감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 염, 미네랄, 대사산물 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 염, 미네랄, 및 대사산물로는 HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염, 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgC12, Na2HPO4, NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313, 크라운-5, 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 배지, 예컨대, PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 하나 이상의 아폽토시스 경로 및 그의 조합의 억제제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 억제제로는 TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 억제제(예컨대, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 보충 인자로는 세포 전달을 증진시키고/거나, 핵 전달 또는 수송을 증진시키고/거나, 핵산의 핵 내로의 촉진된 수송을 증진시키고/거나, 에피염색체(epi-chromosomal) 핵산의 분해를 증진시키고/거나, DNA 매개 독성을 감소시키는 방식으로 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 하나 이상의 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약의 예로는 pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소, 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0230] 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 실온에서 사용될 수 있거나, 또는 예를 들어, 32℃ 내지 37℃(종점 포함)로 미리 가온될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 본 개시내용의 트랜스포존 또는 그의 일부의 세포 생존능 및/또는 발현을 유지 또는 증진시키는 임의의 온도로 미리 가온될 수 있다.

[0231] 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 조직 배양 플라스크 또는 디쉬, G-렉스(G-Rex) 플라스크, 바이오리액터(Bioreactor) 또는 세포 배양 백, 또는 임의의 다른 표준 용기에 함유될 수 있다. 본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 세포 배지(본 개시내용의 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배지 포함)는 정치 상태 그대로 유지될 수 있거나, 또는 대안적으로, 동요(예컨대, 로킹, 와동, 또는 진탕)시킬 수 있다.

[0232] 뉴클레오펙션 후의 세포 배양물은 유전적으로 변형된 세포를 포함할 수 있다. 뉴클레오펙션 후의 T 세포 배양물은 유전적으로 변형된 T 세포를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포를 정의된 기간 동안 휴지시키거나, 또는 확장을 위해 예를 들어, T 세포 익스팬더 기술을 추가하여 자극시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포를 정의된 기간 동안 휴지시키거나, 또는 확장을 위해 예를 들어, T 셀 익스팬더 기술을 추가하여 즉시 자극시킬 수 있다. 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포를 순응할 수 있는 충분한 시간, 전위가 이루어질 수 있는 시간, 및/또는 양성적 또는 음성적 선별을 위한 시간을 허용하기 위해 휴지시킬 수 있고, 이로써, 생존능이 증진되고/거나, 뉴클레오펙션율이 더 높고/거나, 뉴클레오펙션 이후 생존능이 더욱 크고/거나, 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득할 수 있다. 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포를 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24시간 이상 동안 휴지시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포를 예를 들어, 밤새도록 휴지시킬 수 있다. 특정 측면에서, 밤새

도록은 약 12시간이다. 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포를 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 동안 휴지시킬 수 있다.

[0233] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포는 뉴클레오펙션 반응 후, 및 익스팬더 기술 추가 이전에 선별될 수 있다. 유전적으로 변형된 세포의 최적의 선별을 위해, 세포를 변형된 세포의 확인(예컨대, 변형된 세포의 변형되지 않은 세포로부터의 구별)을 촉진시키기 위하여 적어도 2-14일 동안 뉴클레오펙션 후의 세포 배지에서 휴지시킬 수 있다.

[0234] 본 개시내용의 트랜스포존이 성공적으로 뉴클레오펙션되었을 때, 변형된 세포에서는 빠르면 뉴클레오펙션 후 24시간 경과 시점에도 본 개시내용의 CAR/CARTyrin 및 선별 마커의 발현이 검출가능할 수 있다. 트랜스포존의 에피염색체 발현에 기인하여, 선별 마커만의 단독 발현은 변형된 T 세포(트랜스포존이 성공적으로 통합된 세포)를 변형되지 않은 T 세포(트랜스포존이 성공적으로 통합되지 못한 세포)로부터의 구별하지 못할 수도 있다. 트랜스포존의 에피염색체 발현이 변형된 세포의 선별 마커에 의한 검출을 불명료하게 만들 때, 뉴클레오펙션된 세포(변형된 세포 및 변형되지 않은 세포, 둘 모두)를 일정 기간(예컨대, 2-14일) 동안 휴지시켜 세포가 에피염색체 트랜스포존 발현을 중단하거나, 또는 모든 에피염색체 트랜스포존 발현을 상실할 수 있도록 할 수 있다. 이러한 연장된 휴지 기간 후, 오직 변형된 T 세포만이 선별 마커 발현에 대하여 양성인 상태 그대로 유지되어야 한다. 상기 연장된 휴지 기간의 길이는 각 뉴클레오펙션 반응 및 선별 프로세스에 대해 최적화될 수 있다. 트랜스포존의 에피염색체 발현이 변형된 세포의 선별 마커에 의한 검출을 불명료하게 만들 때, 선별은 상기 연장된 휴지 기간 없이 수행될 수 있지만, 추가의 선별 단계가 더 후반의 추후 시점에(예컨대, 확장 단계 동안 또는 그 이후에) 포함될 수 있다.

[0235] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포의 선별은 임의 수단에 의해 수행될 수 있다. 본 개시내용의 방법의 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포의 선별은 특이적인 선별 마커를 발현하는 세포를 단리시킴으로써 수행될 수 있다. 본 개시내용의 선별 마커는 트랜스포존 중의 하나 이상의 서열에 의해 코딩될 수 있다. 본 개시내용의 선별 마커는 성공적인 전위의 결과로서 변형된 세포에 의해 발현될 수 있다(즉, 트랜스포존 중의 하나 이상의 서열에 의해 코딩되지 않을 수 있다). 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포는 뉴클레오펙션 후의 세포 배지의 유해한 화합물에 대한 내성을 부여하는 선별 마커를 함유한다. 유해한 화합물은 예를 들어, 변형된 세포에 선별 마커에 의해 부여되는 내성 부재시 세포 사멸을 일으키게 되는 항생제 또는 약물을 포함할 수 있다. 예시적인 선별 마커로는 하기 유전자: neo, DHFR, TYMS, ALDH, MDR1, MGMT, FANCF, RAD51C, GCS, 및 NKX2.2 중 하나 이상의 것의 야생형(WT: wild type) 또는 돌연변이체 형태를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 선별 마커로는 표면 발현된 선별 마커를 포함하나, 이에 제한되지 않거나, 또는 표면 발현된 태그는 각가 Ab 코팅된 자기 비드 기술 또는 칼럼 선별에 의해 표적화될 수 있다. 효율적인 칼럼 선별, 세척, 및 용출을 위해 예컨대, 단백질 정제에서 사용되는 것과 같은, 절단가능한 태그가 본 개시내용의 선별 마커에 첨가될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 선별 마커는 자연적으로는 변형된 세포(변형된 T 세포 포함)에 의해 발현되지 않고, 그러므로, (예를 들어, 세포 분류 기술에 의한) 변형된 세포의 물리적 단리에서 유용할 수 있다. 본 개시내용의 예시적인 선별 마커는 자연적으로는 변형된 세포(변형된 T 세포 포함)에 의해 발현되지 않고, CD271, CD19 CD52, CD34, RQR8, CD22, CD20, CD33의 전장, 돌연변이화된, 또는 절두된 형태, 및 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0236] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포는 뉴클레오펙션 반응 이후에 선택적으로 확장될 수 있다. 특정 실시양태에서, CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포는 CAR/CARTyrin 자극에 의해 선택적으로 확장될 수 있다. CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포를, 표적으로 커버된 시약(예컨대, 표적을 발현하는 종양 세포주 또는 정상적인 세포주, 또는 표적으로 커버된 익스팬더 비드)과의 접촉에 의해 자극시킬 수 있다. 대안적으로, CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포를, 방사선 조사된 종양 세포, 방사선 조사된 동종이계 정상적인 세포, 방사선 조사된 자가 유래 PBMC와의 접촉에 의해 자극시킬 수 있다. 자극을 위해 사용되는 표적 발현 세포에 의한 본 개시내용의 세포 생성물 조성물의 오염을 최소화하기 위해, 예를 들어, 세포 생성물 조성물이 피험체에게 직접적으로 투여될 수 있을 때, 자극은 CAR/CARTyrin 표적 단백질로 코팅된 익스팬더 비드를 사용하여 수행될 수 있다. CAR/CARTyrin 자극에 의한, CAR/CARTyrin을 포함하는 변형된 T 세포의 선택적 확장은 변형된 T 세포를 기능적으로 고갈시키는 것을 막기 위해 최적화될 수 있다.

[0237] 본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 세포를 냉동보존시킬 수 있거나, 정의된 기간 동안 휴지시킬 수 있거나, 또는 세포 익스팬더 기술 추가에 의한 확장을 위해 자극시킬 수 있다. 본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 세포를 냉동보존시킬 수 있거나, 정의된 기간 동안 휴지시킬 수 있거나, 또는 세포 익스팬더 기술 추가에 의한 확장을 위해 즉시 자극시킬 수 있다. 선별된 유전적으로 변형된 세포가 T 세포일 때, T 세포를 T 세포 익

스팬더 기술 추가에 의한 확장을 위해 자극시킬 수 있다. 본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 세포를 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24시간 이상 동안 휴지시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 세포를 예를 들어, 밤새도록 휴지시킬 수 있다. 특정 측면에서, 밤새도록은 약 12시간이다. 본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 세포를 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 동안 휴지시킬 수 있다. 본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 세포를 임의 기간 동안 휴지시킴으로써 생존능이 증진되고/거나, 뉴클레오펙션 율이 더 높고/거나, 뉴클레오펙션 이후 생존능이 더욱 크고/거나, 바람직한 세포 표현형을 나타내고/거나, 확장 기술 추가시 더욱 크게/더욱 빠르게 확장되는 세포를 수득할 수 있다.

[0238] 선별된 유전적으로 변형된 세포(본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 T 세포 포함)를 임의의 표준 냉동보존 방법을 사용하여 냉동보존시킬 수 있고, 상기 냉동보존 방법은 회수율, 생존능, 표현형, 및/또는 기능적 능력이 높은 인간 세포를 보관 및/또는 회수하기 위해 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 냉동보존 방법은 상업적으로 이용가능한 냉동보존 배지 및/또는 프로토콜을 포함할 수 있다.

[0239] 선별된 유전적으로 변형된 세포(본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 T 세포 포함)의 전위율은 임의 수단에 의해 사정될 수 있다. 예를 들어, 익스팬더 기술을 적용하기 이전에, 선별된 유전적으로 변형된 세포(본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 T 세포 포함)에 의한 트랜스포존의 발현은 형광 활성화 세포 분류(FACS: fluorescence-activated cell sorting)에 의해 측정될 수 있다. 선별된 유전적으로 변형된 세포(본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 T 세포 포함)의 전위율 측정은 트랜스포존(예컨대, CAR)을 발현하는 선별된 세포의 백분율(%)을 측정하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, T 세포의 순도, 트랜스포존 발현(예컨대, CAR 발현)의 평균 형광 강도(MFI: Mean Fluorescence Intensity (MFI), CAR 리간드를 발현하는 표적 세포의 탈과립화 및/또는 사멸을 매개할 수 있는 (트랜스포존에서 전달된) CAR의 능력, 및/또는 선별된 유전적으로 변형된 세포(본 개시내용의 선별된 유전적으로 변형된 T 세포 포함)의 표현형은 임의 수단에 의해 사정될 수 있다.

[0240] 본 개시내용의 세포 생성물 조성물은 특정의 출시 기준을 충족시킬 때, 피험체에게로의 투여를 위해 출시될 수 있다. 예시적인 출시 기준은 세포 표면 상에 검출가능한 수준으로 CAR을 발현하는 변형된, 선별된, 및/또는 확장된 T 세포의 특정 백분율(%)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0241] ***자가 유래 T 세포 생성물 조성물의 유전자 변형***

[0242] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포(유전적으로 변형된 T 세포 포함)를 익스팬더 기술을 이용하여 확장시킬 수 있다. 본 개시내용의 익스팬더 기술은 상업적으로 이용가능한 익스팬더 기술을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 예시적인 익스팬더 기술은 TCR을 통해 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키는 것을 포함한다. 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키기 위한 모든 수단이 고려되지만, 우수한 수준의 사멸 능력을 가지는 생성물을 수득할 수 있는, TCR을 통해 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키는 것이 바람직한 방법이다.

[0243] TCR을 통해 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키기 위해, 써모 익스팬더 다이나비즈(Thermo Expander DynaBeads)는 비드 대 T 세포 비가 3:1인 비로 사용될 수 있다. 익스팬더 비드가 생분해성 비드가 아닐 경우, 비드는 익스팬더 조성물로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 비드는 약 5일 후에 익스팬더 조성물로부터 제거될 수 있다. TCR을 통해 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키기 위해, 밀테니이 T 세포 활성화/확장 시약이 사용될 수 있다. TCR을 통해 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키기 위해, 스템셀 테크놀러지즈' 이뮤노컬트(StemCell Technologies' ImmunoCult) 인간 CD3/CD28 또는 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성인자 시약이 사용될 수 있다. 상기 기술이 바람직할 수 있는데, 그 이유는 가용성 사량체 항체 복합체가 일정 기간 후에 분해되고, 프로세스로부터의 제거가 필요하지 않을 수 있기 때문이다.

[0244] 인공 항원 제시 세포(APC: antigen presenting cell)는 표적 항원을 공동 발현하도록 조작될 수 있고, 이는 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 데 사용될 수 있다. 인공 APC는 종양 세포주(예를 들어, 무한증식 골수성 백혈병 세포주 K562 포함)를 포함할 수 있거나, 또는 그로부터 유래될 수 있고, 다중 공자극 분자 또는 기술(예컨대, CD28, 4-1BBL, CD64, mbIL-21, mbIL-15, CAR 표적 분자 등)을 공동 발현하도록 조작될 수 있다. 본 개시내용의 인공 APC는 공자극 분자와 함께 조합되고, 비바람직한 표현형 및 기능적 능력, 즉, 말기 분화된 이펙터 T 세포의 발생 또는 출현을 막을 수 있도록 조건은 최적화될 수 있다.

[0245] 방사선 조사된 PBMC(자기 또는 동종)는 일부 표적 항원, 예컨대, CD19를 발현할 수 있고, 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 방사선 조사된 종양 세포는 일부 표적 항원을 발현할 수 있고, 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 데 사용될 수 있다.

[0246] 플레이트 결합된 및/또는 가용성 항CD3, 항CD2 및/또는 항CD28 자극은 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 데 사용될 수 있다.

[0247] 항원 코팅된 비드는 표적 단백질을 제시할 수 있고, 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, CAR/CARTyrin 표적 단백질로 코팅된 익스팬더 비드는 본 개시내용의 TCR 및/또는 CAR을 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 데 사용될 수 있다.

[0248] 확장 방법은 TCR 또는 CAR/CARTyrin을 통해, 및 표면 발현된 CD2, CD3, CD28, 4-1BB, 및/또는 유전적으로 변형된 T 세포 상의 다른 마커를 통해 본 개시내용의 세포 또는 T 세포를 자극시키는 것으로 관심 방향이 이동될 수 있다.

[0249] 확장 기술은 뉴클레오펙션 후 즉시, 뉴클레오펙션 후 대략 24시간째까지 본 개시내용의 세포에 적용될 수 있다. 각종의 세포 배지가 확장 방법 동안 사용될 수 있지만, 본 개시내용의 바람직한 T 세포 확장 배지를 통해 예를 들어, 더욱 큰 생존능, 세포 표현형, 전체 확장, 또는 더욱 큰 생체내 잔류, 생착 및/또는 CAR 매개 사멸 능력을 보이는 세포를 수득할 수 있다. 본 개시내용의 세포 배지는 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포의 확장, 표현형 및 기능을 개선/증진시키기 위해 최적화될 수 있다. 확장된 T 세포의 바람직한 표현형은 T 줄기 세포 기억, T 중심, 및 T 이펙터 기억 세포의 혼합물을 포함할 수 있다. 익스팬더 다이나비즈를 통해 진료소에서 우수한 성능을 이끌 수 있는 중심 기억 T 세포를 주로 수득할 수 있다.

[0250] 본 개시내용의 예시적인 T 세포 확장 배지는 부분적으로 또는 전체적으로 PBS, HBSS, 옵티MEM, DMEM, RPMI 1640, AIM-V, X-VIVO 15, 셀그로 DC 배지, CTS 옵티마이저 T 세포 확장 SFM, 텍스MACS 배지, PRIME-XV T 세포 확장 배지, 이뮤노컬트-XF T 세포 확장 배지, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지는 하나 이상의 보충 인자를 추가로 포함할 수 있다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지 중에 포함될 수 있는 보충 인자는 생존능, 세포 표현형, 전체 확장을 증진시키거나, 또는 생체내 잔류, 생착 및/또는 CAR 매개 사멸 능력을 증가시킨다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지 중에 포함될 수 있는 보충 인자로는 재조합 인간 사이토카인, 케모카인, 및/또는 인터류킨, 예컨대, IL2, IL7, IL12, IL15, IL21, IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, CXCL8, IL9, IL10, IL11, IL13, IL14, IL16, IL17, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL25, IL26, IL27, IL28, IL29, IL30, IL31, IL32, IL33, IL35, IL36, GM-CSF, IFN 감마, IL-1 알파/IL-1F1, IL-1 베타/IL-1F2, IL-12 p70, IL-12/IL-35 p35, IL-13, IL-17/IL-17A, IL-17A/F 이종이량체, IL-17F, IL-18/IL-1F4, IL-23, IL-24, IL-32, IL-32 베타, IL-32 감마, IL-33, LAP(TGF-베타 1), 림포톡신-알파/TNF-베타, TGF-베타, TNF-알파, TRANCE/TNFSF11/RANK L, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지 중에 포함될 수 있는 보충 인자로는 염, 미네랄, 및/또는 대사산물, 예컨대, HEPES, 니코틴아미드, 헤파린, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM 비필수 아미노산 용액, 아스코르브산, 뉴클레오시드, FBS/FCS, 인간 혈청, 혈청 대체물질, 항생제, pH 조절제, 얼스 염, 2-메트캅토에탄올, 인간 트랜스페린, 재조합 인간 인슐린, 인간 혈청 알부민, 뉴클레오펙터 PLUS 보충물, KCL, MgC12, Na2HPO4, NAH2PO4, 소듐 락토비오네이트, 만니톨, 숙신산나트륨, 염화나트륨, CINa, 글루코스, Ca(NO3)2, Tris/HCl, K2HPO4, KH2PO4, 폴리에틸렌이민, 폴리-에틸렌-글리콜, 폴록사머 188, 폴록사머 181, 폴록사머 407, 폴리-비닐피롤리돈, 팝313, 크라운-5 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 T 세포 확장 배지 중에 포함될 수 있는 보충 인자로는 세포 DNA 감지, 물질대사, 분화, 신호 전달, 및/또는 아폽토시스 경로의 억제제, 예컨대, TLR9의 억제제, MyD88의 억제제, IRAK의 억제제, TRAF6의 억제제, TRAF3의 억제제, IRF-7의 억제제, NF-KB의 억제제, 타입 1 인터페론의 억제제, 염증 유발성 사이토카인의 억제제, cGAS의 억제제, STING의 억제제, Sec5의 억제제, TBK1의 억제제, IRF-3의 억제제, RNA pol III의 억제제, RIG-1의 억제제, IPS-1의 억제제, FADD의 억제제, RIP1의 억제제, TRAF3의 억제제, AIM2의 억제제, ASC의 억제제, 카스파제1의 억제제, 프로-IL1B의 억제제, PI3K의 억제제, Akt의 억제제, Wnt3A의 억제제, 글리코겐 신타제 키나제-3β(GSK-3β)의 억제제(예컨대, TWS119), 바필로마이신, 클로로퀸, 퀴나크린, AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0251] 본 개시내용의 T 세포 확장 배지 중에 포함될 수 있는 보충 인자로는 세포 전달을 증진시키고/거나, 핵 전달 또

는 수송을 증진시키고/거나, 핵산의 핵 내로의 촉진된 수송을 증진시키고/거나, 에피염색체 핵산의 분해를 증진시키고/거나, DNA 매개 독성을 감소시키는 방식으로 핵산을 변형시키거나, 또는 안정화시키는 시약, 예컨대, pH 개질제, DNA-결합 단백질, 지질, 인지질, CaPO4, NLS 서열을 포함 또는 포함하지 않는 순 중성 전하 DNA 결합 펩티드, TREX1 효소, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0252] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포는 확장 프로세스 동안 선별가능한 약물 또는 화합물 사용에 의해 선별될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스포존이 유전적으로 변형된 세포에게 배양 배지에 첨가된 약물에 대한 내성을 부여하는 선별 마커를 코딩할 수 있을 때, 선별은 확장 프로세스 동안 이루어질 수 있고, 선별이 이루어질 수 있도록 하기 위해서는 대략 1-14일 동안의 배양 기간이 필요할 수 있다. 본 개시내용의 트랜스포존에 의해 코딩되는 선별 마커로서 사용될 수 있는 약물 내성 유전자의 예로는 유전자 neo, DHFR, TYMS, ALDH, MDR1, MGMT, FANCF, RAD51C, GCS, NKX2.2의 야생형(WT) 또는 돌연변이체 형태, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 배양 배지에 첨가될 수 있는, 선별 마커가 부여하는 내성의 대상이 될 수 있는 상응하는 약물 또는 화합물의 예로는 G418, 퓨로마이신(Puromycin), 암피실린(Ampicillin), 카나마이신(Kanamycin), 메토트렉세이트(Methotrexate), 멜팔란(Mephalan), 테모졸로미(Temozolomide), 빈크리스틴(Vincristine), 에토포시드(Etoposide), 독소루비신(Doxorubicin), 벤다무스틴(Bendamustine), 플루다라빈(Fludarabine), 아레디아(Aredia) (파미드로네이트 디소듐(Pamidronate Disodium)), 베세눔(Becenum)(카르무스틴(Carmustine)), BiCNU(카르무스틴), 보르테조밉(Bortezomib), 카르필조밉(Carfilzomib), 카르무브리스(Carmubris)(카르무스틴), 카르무스틴, 클라펜(Clafen)(사이클로포스파미드(Cyclophosphamide)), 사이클로포스파미드, 사이톡산(Cytoxan)(사이클로포스파미드), 다라투무맙(Daratumumab), 다잘렉스(Darzalex)(다라투무맙), 독실(Doxil)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포솜), 독소루비신 하이드로클로라이드 리포솜, 독스-SL(Dox-SL)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포솜), 엘로투주맙(Elotuzumab), 엠플리시티(Empliciti)(엘로투주맙), 에바세트(Evacet)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포솜), 파리닥(Farydak)(파노비노스타트(Panobinostat)), 익사조밉 시트레이트(Ixazomib Citrate), 키프롤리스(Kyprolis)(카르필조밉(Carfilzomib)), 레날리도미드(Lenalidomide), 리포독스(LipoDox)(독소루비신 하이드로클로라이드 리포솜), 모조빌(Mozobil)(플레릭사포르(Plerixafor)), 네오사르(Neosar)(사이클로포스파미드), 닌라로(Ninlaro)(익사조밉 시트레이트), 파미드로네이트 디소듐, 파노비노스타트, 플레릭사포르, 포말리도미드(Pomalidomide), 포말리스트(Pomalyst)(포말리도미드), 레블리미드(Revlimid)(레날리도미드), 시노비르(Synovir)(탈리도미드(Thalidomide)), 탈리도미드, 탈로미드(Thalomid)(탈리도미드), 벨케이드(Velcade)(보르테조밉(Bortezomib)), 졸레드론산(Zoledronic Acid), 조메타(Zometa)(졸레드론산), 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0253] 본 개시내용의 T 세포 확장 프로세스는 WAVE 바이오리액터 중의 세포 배양 백, G-렉스 플라스크에서, 또는 임의의 다른 적합한 용기 및/또는 반응기에서 진행될 수 있다.

[0254] 본 개시내용의 세포 또는 T 세포는 정치 상태 그대로 유지될 수 있거나, 로킹, 와동, 또는 진탕될 수 있다.

[0255] 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 프로세스는 배양 지속 기간, 세포 농도, T 세포 배지 첨가/제거 스케줄, 세포 크기, 세포 총 개수, 세포 표현형, 세포 집단 순도, 성장 세포 집단 중 유전적으로 변형된 세포의 백분율(%), 보충제 사용 및 그의 조성, 익스팬더 기술의 추가/소거, 또는 그의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는 특정 조건을 최적화시킬 수 있다.

[0256] 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 프로세스는 생성된 확장된 세포 집단의 제제화 이전에 미리 정의되 종점까지 계속 진행될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 프로세스는 미리 정의된 시간량: 적어도, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24시간; 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30일; 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12주; 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개월, 또는 적어도 1년 동안 계속 진행될 수 있다. 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 프로세스는 생성된 배양물이 미리 결정된 전체 세포 밀도: 부피당(㎕, ml, L) 1, 10, 100, 1000, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 1010개의 세포, 또는 그 사이의 임의의 밀도에 도달할 때까지 계속 진행될 수 있다. 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 프로세스는 생성된 배양물의 유전적으로 변형된 세포가 본 개시내용의 트랜스포존의 미리 결정된 발현 수준: 임계 발현 수준(생성된 유전적으로 변형된 세포가 임상적으로 유효하다는 것을 나타내는 최소, 최대 또는 평균 발현 수준)의 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%, 또는 그 사이의 임의의 백분율의 수준을 보일 때까지 계속 진행될 수 있다. 본 개시내용의 세포 또는 T 세포 확장 프로세스는 생성된 배양물의 유전적으로 변형된 세포의 비율 대 변형되지 않은 세포의 비율이 미리 결정된 임계값: 적어도 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 2:1, 4:1,

5:1, 6:1 ,7:1, 8:1, 9:1, 10:1 또는 그 사이의 임의의 비에 도달할 때까지 계속 진행될 수 있다.

[0257] ***출시를 위한 유전적으로 변형된 자가 유래 T 세포의 분석***

[0258] 본 개시내용의 확장 프로세스 동안 또는 그 이후에 유전적으로 변형된 세포의 백분율(%)을 사정할 수 있다. 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포에 의한 트랜스포존의 세포 발현은 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, FACS는 본 개시내용의 CAR을 발현하는 세포 또는 T 세포의 백분율(%)을 측정하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 유전적으로 변형된 세포 또는 T 세포의 순도, 본 개시내용의 유전적으로 변형된 세포 또는 T 세포에 의해 발현된 CAR의 평균 형광 강도(MFI), CAR 리간드를 발현하는 표적 세포의 탈과립화 및/또는 사멸을 매개할 수 있는 CAR의 능력, 및/또는 CAR+ T 세포의 표현형은 사정될 수 있다.

[0259] 피험체에게로의 투여용으로 의도되는 본 개시내용의 조성물은, 조성물은 안전하여야 하고, 제약품으로서 제제화하는 데 및/또는 피험체에게 투여하는 데 유효하여야 한다는 것을 명시하는 하나 이상의 "출시 기준"을 충족시켜야 하는 것이 요구될 수 있다. 출시 기준은 본 개시내용의 조성물(예컨대, 본 개시내용의 T 세포 생성물)이 그의 세포 표면 상에 검출가능한 수준으로 본 개시내용의 CAR을 발현하는 T 세포를 특정 백분율(%)로 포함하여야 한다는 요건을 포함할 수 있다.

[0260] 확장 프로세스는 특정 기준(예컨대, 특정의 세포 총 개수 달성, 특정의 기억 세포 집단 달성, 특정 크기의 집단 달성)이 충족될 때까지 계속 진행될 수 있다.

[0261] 특정 기준은 확장 프로세스가 종료되어야 할 시점을 시사한다. 예를 들어, 세포는 일단 세포 크기가 300 fL에 도달하고 나면, 제제화되거나, 재활성화되거나, 또는 냉동보존되어야 한다(그렇지 않으면, 상기 임계값을 초과하는 크기에 도달한 세포는 죽기 시작할 수 있다). 일단 세포 집단의 평균 세포 크기가 300 fL 미만에 도달하고 나면 즉시 냉동보존하는 것이 해동 및 배양시 더욱 우수한 세포 회수율을 얻을 수 있는데, 그 이유는 세포가 냉동보존 이전에 완전한 휴지 상태에 도달하지 않았기 때문이다(완전한 휴지 크기는 대략 180 fL이다). 확장 이전에, 본 개시내용의 T 세포의 세포 크기는 약 180 fL일 수 있지만, 확장 후 3일째의 세포 크기는 대략 900 fL까지 4배 초과의 크기가 될 수 있다. 다음 6-12일에 걸쳐, T 세포 집단의 세포 크기는 180 fL의 완전한 휴지로 천천히 감소하게 될 것이다.

[0262] 제제화를 위해 세포 집단을 제조하는 프로세스는 세포 집단의 세포를 농축시키는 단계, 세포를 세척하는 단계, 및/또는 추가로 약물 내성을 통해 세포를 선별하는 단계 또는 특정 표면 발현된 마커에 대해 자기 비드 분류를 수행하는 단계를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 제제화를 위해 세포 집단을 제조하는 프로세스는 최종 생성물의 안전성 및 순도를 확인하기 위한 분류 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 환자로부터의 종양 세포를 본 개시내용의 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키는 데 사용하거나, 또는 제제화를 위해 제조되는 유전적으로 변형된 T 세포를 자극시키기 위해 유전적으로 변형시키는 경우라면, 환자로부터의 종양 세포는 최종 생성물에 포함되지 않는 것이 중요하다.

[0263] ***세포 생성물 주입 및/또는 주입을 위한 냉동보존***

[0264] 본 개시내용의 약학 제제는 주입, 냉동보존, 및/또는 보관을 위해 백 내로 분배될 수 있다.

[0265] 본 개시내용의 약학 제제는 표준 프로토콜, 및 임의적으로, 주입가능한 냉동보존 배지를 사용하여 냉동보존될 수 있다. 예를 들어, 동결 관련 독성을 감소시키는 데 DMSO 무함유 냉동보존제(예컨대, CryoSOfree™ DMSO-free Cryopreservation Medium)가 사용될 수 있다. 본 개시내용의 냉동보존된 약학 제제는 추후의 환자에게로의 주입을 위해 보관될 수 있다. 효과적인 치료는 본 개시내용의 약학 제제의 다회 투여를 필요로 할 수 있고, 그러므로, 약학 제제는 냉동보관될 수 있지만, 개별 용량의 해동을 위해 분리될 수 있는 미리 분취된 "용량"으로 패키징될 수 있다.

[0266] 본 개시내용의 약학 제제는 실온에서 보관될 수 있다. 효과적인 치료는 본 개시내용의 약학 제제의 다회 투여를 필요로 할 수 있고, 그러므로, 약학 제제는 함께 보관될 수 있지만, 개별 용량의 투여를 위해 분리될 수 있는 미리 분취된 "용량"으로 패키징될 수 있다.

[0267] 본 개시내용의 약학 제제는 동종이계 요법의 경우에서 향후에 예를 들어, 병태의 완화 및 재발 후에 투여를 필요로 할 수 있는 동일한 환자에게로의 투약을 위한 추가의 용량 생성을 위한 후속되는 재확장 및/또는 선별을 위해 보관될 수 있다.

[0268] ***제제***

[0269] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 약학적으로 허용되는 제제 중에 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하고, 바람직하게, 약학적 또는 수의학적 용도에 적합한, 염수 또는 선택된 염과 함께 포스페이트 완충제 뿐만 아니라, 보존액, 및 보존제를 함유하는 제제 뿐만 아니라, 다회 사용 보존 제제를 포함하는 안정적인 제제를 제공한다. 보존 제제는 적어도 하나의 공지된 보존제를 함유하거나, 또는 임의적으로, 수성 희석제 중 적어도 하나의 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 페닐머큐릭 니트라이트, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 염화마그네슘(예컨대, 6수화물), 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 소듐 데히드로아세테이트 및 티메로살, 중합체, 또는 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다. 당업계에 공지된 바와 같이 임의의 적합한 농도 또는 혼합물, 예컨대, 약 0.0015%, 또는 그 안의 임의의 범위, 값, 또는 분율이 사용될 수 있다. 비제한적인 예로, 보존제를 포함하지 않거나, 약 0.1-2% m-크레졸(예컨대, 0.2, 0.3. 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 약 0.1-3% 벤질 알콜(예컨대, 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 약 0.001-0.5% 티메로살(예컨대, 0.005, 0.01), 약 0.001-2.0% 페놀(예컨대, 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005-1.0% 알킬파라벤(들)(예컨대, 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%) 등을 포함한다.

[0270] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명은 패키징 물질, 및 임의적으로, 수성 희석제 중 미리 정해진 완충제 및/또는 보존제와 함께 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 용액을 포함하는 적어도 하나의 바이알을 포함하는 제조 물품으로서, 여기서, 상기 패키징 물질은 상기 용액이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72시간 이상인 기간 동안에 걸쳐 유지될 수 있음을 표기한 라벨을 포함하는 것인, 제조 물품을 제공한다. 본 발명은, 패키징 물질, 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는 제1 바이알, 및 미리 정해진 완충제 또는 보존제의 수성 희석제를 포함하는 제2 바이알을 포함하는 제조 물품으로서, 여기서, 상기 패키징 물질은 환자에게 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제 중에서 재구성하여 24시간 이상의 기간 동안 유지될 수 있는 용액을 형성하도록 설명하는 라벨을 포함하는 것인, 제조 물품을 추가로 포함한다.

[0271] 본 발명에 따라 사용되는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 본원에 기술된 바와 같이, 또는 당업계에 공지된 바와 같이, 포유동물 세포 또는 트랜스제닉 제제를 비롯한, 재조합 수단에 의해 제조될 수 있거나, 다른 생물학적 공급원으로부터 정제될 수 있다.

[0272] 비록 더 낮은 및 더 높은 농도도 작동가능하지만, 본 발명의 생성물 중의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 범위는 습식/건식 시스템일 경우, 재구성시 농도가 약 1.0 ㎍/ml 내지 약 1,000 mg/ml가 되도록 하는 양을 포함하고, 이는 의도되는 전달 비히클에 의존하고, 예컨대, 용액 제제는 경피용 패치, 폐, 점막, 또는 삼투성 또는 마이크로펌프 방법과 상이할 것이다.

[0273] 바람직하게, 수성 희석제는 임의적으로 약학적으로 허용되는 보존제를 추가로 포함한다. 바람직한 보존제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤 (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 소듐 데히드로아세테이트 및 티메로살, 또는 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 포함한다. 제제에서 사용되는 보존제의 농도는 항미생물 효과를 발휘하는 데 충분한 농도이다. 상기 농도는 선택된 보존제의 의존하고, 이는 당업자에 의해 쉽게 결정된다.

[0274] 다른 부형제, 예컨대, 등장제, 완충제, 항산화제, 및 보존제 증진제가 임의적으로 사용될 수 있고, 바람직하게 희석제에 첨가될 수 있다. 등장제, 예컨대, 글리세린은 보편적으로 공지된 농도로 사용된다. 생리적으로 용인되는 완충제는 바람직하게 pH 조절을 개선시키기 위해 첨가된다. 제제는 다양한 범위의 pH, 예컨대, 약 pH 4 내지 약 pH 10을 포함할 수 있고, 바람직한 범위는 약 pH 5 내지 약 pH 9, 및 가장 바람직한 범위는 약 6.0 내지 약 8.0이다. 바람직하게, 본 발명의 제제의 pH는 약 6.8 내지 약 7.8이다. 바람직한 완충제로는 포스페이트 완충제, 가장 바람직하게, 인산나트륨, 특히, 포스페이트 완충처리된 염수(PBS: phosphate buffered saline)를 포함한다.

[0275] 다른 첨가제, 예컨대, 약학적으로 허용되는 가용화제, 예컨대, 트윈(Tween) 20(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트), 트윈 40(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레에이트), 플루로닉(Pluronic) F68(폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체), 및 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 또는 비이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉® 폴리올, 다른 블록 공중합체, 및 킬레이터, 예컨대, EDTA 및 EGTA는 응집을 감소시키기 위해 임의적으로 제제 또는 조성물에 첨가될 수 있다. 이들 첨가제는 제제를 투여하기 위해 펌프 또는 플라스틱 용기가 사용되는 경우에 특히 유용하다. 약학적으로 허용되는 계면활성제의 존재가 응집되는 단백질의 성향을

완화시킨다.

[0276] 본 발명의 제제는 수성 희석제 중 적어도 하나의 단백질 스캐폴드, 및 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알콜, 알킬파라벤, (메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 소듐 데히드로아세테이트 및 티메로살 또는 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 보존제를 혼합하는 단계를 포함하는 프로세스로 제조될 수 있다. 수성 희석제 중에서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 및 보존제를 혼합하는 것은 종래 용해 및 혼합 방법을 사용하여 수행된다. 적합한 제제를 제조하기 위해, 예를 들어, 완충처리된 용액 중 계량된 양의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 원하는 농도의 단백질 및 보존제를 제공하기에 충분한 양으로 완충처리된 용액 중 원하는 보존제와 조합한다. 상기 프로세스의 변형은 당업계에 공지된 숙련가에 의해 인지될 것이다. 예를 들어, 성분 첨가 순서, 추가 첨가제 사용 여부, 제제가 제조되는 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단을 위해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0277] 청구된 제제는 투명 액제로서, 또는 수성 희석제 중 물, 보존제 및/또는 부형제, 바람직하게, 포스페이트 완충제 및/또는 염수 및 선택된 염을 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 요구되는 이중 바이알은 다회에 걸쳐 재사용될 수 있고, 단일 또는 다회 사이클의 환자 치료에 충분할 수 있고, 따라서, 현재 이용가능한 것보다 더욱 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.

[0278] 청구된 본 제조 물품은 즉시 내지 24시간 이상 범위의 기간 동안에 걸쳐 투여하는 데 유용하다. 따라서, 청구된 본 제조 물품은 환자에게 상당한 이점을 제공한다. 본 발명의 제제는 임의적으로 약 2℃ 내지 약 40℃ 온도에서 보관될 수 있고, 장기간 동안 단백질의 생물학적 활성을 유지할 수 있으며, 이로써, 패키지 라벨은 본 용액이 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 또는 96시간 이상 동안에 걸쳐 유지 및/또는 사용될 수 있다고 표기할 수 있다. 보존 희석제가 사용될 때, 상기 라벨은 최대 1-2개월, 6개월, 및 1년 6개월, 및/또는 2년 사용될 수 있다는 것도 포함할 수 있다.

[0279] 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 용액은 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제 중에서 혼합하는 프로세스에 의해 제조될 수 있다. 혼합은 종래 용해 및 혼합 방법을 사용하여 수행된다. 적합한 희석제를 제조하기 위해, 예를 들어, 물 또는 완충제 중 계량된 양의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 원하는 농도의 단백질, 및 임의적으로, 보존제 또는 완충제를 제공하기에 충분한 양으로 조합한다. 상기 프로세스의 변형은 당업계에 공지된 숙련가에 의해 인지될 것이다. 예를 들어, 성분 첨가 순서, 추가 첨가제 사용 여부, 제제가 제조되는 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단을 위해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0280] 청구된 생성물은 투명 액제로서, 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 요구되는 이중 바이알은 다회에 걸쳐 재사용될 수 있고, 단일 또는 다회 사이클의 환자 치료에 충분할 수 있고, 따라서, 현재 이용가능한 것보다 더욱 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.

[0281] 청구된 생성물은 투명 액제로서, 또는 수성 희석제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알을 약국, 진료소, 또는 다른 상기와 같은 기관 및 시설에 제공함으로써 환자에게 간접적으로 제공될 수 있다. 이러한 경우, 투명 액제의 크기는 최대 1 ℓ 또는 심지어 더 큰 크기일 수 있되, 단, 큰 저장소로부터 더욱 작은 분량의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 용액이 더 작은 바이알로 옮기기 위해 1회 또는 다회에 걸쳐 검색될 수 있고, 약국 또는 진료소에 의해 그의 고객 및/또는 환자에게 제공될 수 있다면 그러하다.

[0282] 단일 바이알 시스템을 포함하는 승인받은 장치로는 용액 전달용 펜 주사이 장치, 예컨대, BD 펜즈(BD Pens), BD 오토젝터(BD Autojector)®, 휴마젝트(Humaject)®, 노보펜(NovoPen)®, B-D®펜(B-D®Pen), 오토펜(AutoPen)®, 및 옵티펜(OptiPen)®, 게노트로핀펜(GenotropinPen)®, 게노트로놈 펜(Genotronorm Pen)®, 휴마트로 펜(Humatro Pen)®, 레코-펜(Reco-Pen)®, 로페론 펜(Roferon Pen)®, 바이오젝터(Biojector)®, I젝트(Iject)®, J-팁 니들-프리 인젝터(J-tip Needle-Free Injector)®, 인트라젝트(Intraject)®, 메디-젝트(Medi-Ject)®, 예컨대, 벡톤디킨슨(Becton Dickinson: 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, www.bectondickenson.com), 디세트로닉(Disetronic: 스위스 부르크도르프, www.disetronic.com); 바이오젝트(Bioject: 미국 오레곤주 포틀랜드 소재, www.bioject.com); 내셔널 메디컬 프로덕츠(National Medical Products), 웨스턴 메디컬(Weston Medical: 영국 피터버러 소재, www.weston-medical.com), 메디-젝트 코포레이션(Medi-Ject Corp: 미국 미네소타주 미니애폴리스 소재, www.mediject.com)에 의해 제조되거나, 또는 그에 의해 개발된 것과 같은 장치, 및 유사하게 적합한 장치를 포함한다. 이중 바이알 시스템을 포함하는 승인받은

장치로는 예컨대, 휴마트로펜(HumatroPen)®과 같은, 재구성 용액 전달을 위한 카트리지 중에서 동결건조된 약물을 재구성하기 위한 펜 주사기 시스템을 포함한다. 적합한 다른 장치의 예는 미리 충전된 시린지, 자동 주사기, 바늘이 없는 주사기 및 바늘이 없는 IV 주입 세트를 포함한다.

[0283] 청구된 본 생성물은 패키징 물질을 포함한다. 패키징 물질은 규제 기관에 의해 요구되는 정보 이외에도, 생성물이 사용될 수 있는 조건도 제공한다. 본 발명의 패키징 물질은 2개의 바이알, 습식/건식 생성물의 경우, 환자에게 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 수성 희석제 중에서 재구성하여 용액을 형성하고, 2-24시간 이상의 기간 동안 상기 용액을 사용하도록 하는 설명서를 제공한다. 단일 바이알,용액 생성물의 경우, 라벨에는 상기 용액이 2-24시간 이상의 기간 동안에 걸쳐 사용될 수 있다고 표기되어 있다. 청구된 본 생성물은 인간 약학적 생성물 사용에 유용하다.

[0284] 본 발명의 제제는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 및 선택된 완충제, 바람직하게, 염수 또는 선택된 염을 함유하는 포스페이트 완충제를 혼합하는 프로세스에 의해 제조될 수 있다. 수성 희석제 중에서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 및 완충제를 혼합하는 것은 종래 용해 및 혼합 방법을 사용하여 수행된다. 적합한 제제를 제조하기 위해, 예를 들어, 물 또는 완충제 중 계량된 양의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 원하는 농도의 단백질 및 완충제를 제공하기에 충분한 양으로 물 중 원하는 완충화제와 함께 조합한다. 상기 프로세스의 변형은 당업계에 공지된 숙련가에 의해 인지될 것이다. 예를 들어, 성분 첨가 순서, 추가 첨가제 사용 여부, 제제가 제조되는 온도 및 pH는 모두 사용되는 농도 및 투여 수단을 위해 최적화될 수 있는 인자이다.

[0285] 청구된 안정적인 또는 보존 제제는 투명 액제로서, 또는 수성 희석제 중 보존제 또는 완충제 및 부형제를 함유하는 제2 바이알로 재구성되는 동결건조된 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 바이알을 포함하는 이중 바이알로서 환자에게 제공될 수 있다. 단일 용액 바이알 또는 재구성이 요구되는 이중 바이알은 다회에 걸쳐 재사용될 수 있고, 단일 또는 다회 사이클의 환자 치료에 충분할 수 있고, 따라서, 현재 이용가능한 것보다 더욱 편리한 치료 요법을 제공할 수 있다.

[0286] 단백질 스캐폴드를 안정화시키는 다른 제제 또는 방법을 통해 단백질 스캐폴드를 포함하는 동결건조된 분제의 투명 액제 이외의 것을 수득할 수 있다. 비투명 액제 중에는 미립자 현탁액을 포함하는 제제가 있으며, 상기 미립자는 다양한 크기의 구조를 가지고, 다양하게, 마이크로스피어, 마이크로입자, 나노입자, 나노스피어, 또는 리포솜인 것으로 공지된 단백질 스캐폴드 함유 조성물이다. 활성제를 함유하는, 상기의 상대적으로 균질한, 본질적으로 구형인 미립자 제제는 미국 특허 번호 4,589,330에 교시된 바와 같이, 활성제 및 중합체를 함유하는 수성 상, 및 비수성 상을 접촉시킨 후, 이어서, 비수성 상을 증발시켜 수성 상으로부터 입자를 소결시킴으로써 형성될 수 있다. 다공성 마이크로입자는 미국 특허 번호 4,818,542에 교시된 바와 같이, 연속 용매 중에 분산된 활성제 및 중합체를 함유하는 제1 상을 사용하고, 냉동-건조 또는 희석-추출-침전에 의해 현탁액으로부터 상기 용매를 제거함으로써 제조될 수 있다. 상기 제제에 대해 바람직한 중합체는 젤라틴 아가, 전분, 아라비노갈락탄, 알부민, 콜라겐, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜리드-L(-) 락티드 폴리(엡실론-카프로락톤, 폴리(엡실론-카프로락톤-CO-락트산), 폴리(엡실론-카프로락톤-CO-글리콜산), 폴리(β-하이드록시 부티르산), 폴리에틸렌 옥시드, 폴리에틸렌, 폴리(알킬-2-시아노아크릴레이트), 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트), 폴리아미드, 폴리(아미노산), 폴리(2-하이드록시에틸 DL-아스파타미드), 폴리(에스테르 우레아), 폴리(L-페닐알라닌/에틸렌 글리콜/1,6-디이소시아나토헥산) 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)로 구성된 군으로부터 선택되는 천연 또는 합성 공중합체 또는 중합체이다. 특히 바람직한 중합체는 폴리에스테르, 예컨대, 폴리글리콜산, 폴리락트산, 글리콜리드-L(-) 락티드 폴리(엡실론-카프로락톤, 폴리(엡실론-카프로락톤-CO-락트산), 및 폴리(엡실론-카프로락톤-CO-글리콜산이다. 중합체 및/또는 활성물질을 용해시키는 데 유용한 용매로는 물, 헥산플루오로이소프로판올, 메틸렌클로라이드, 테트라하이드로푸란, 헥산, 벤젠, 또는 헥사플루오로아세톤 3/2수화물을 포함한다. 활성물질 함유 상을 제2 상과 함께 분산시키는 프로세스는 노즐내 오리피스를 통해 상기 제1 상에 압력을 가하여 소적 형성에 영향을 주는 것을 포함할 수 있다.

[0287] 건식 분제 제제는 동결건조 이외의 프로세스, 예컨대, 분무 건조에 의해, 또는 증발에 의한, 또는 결정질 조성물의 침전, 이어서, 수성 또는 비수성 용매를 제거하는 하나 이상의 단계에 의한 용매 추출에 의해 생성될 수 있다. 분무 건조된 단백질 스캐폴드 제조는 미국 특허 번호 6,019,968에 교시되어 있다. 단백질 스캐폴드 기반의 건식 분말 조성물은 호흡가능한 건식 분제를 제공하는 조건하에 용매 중의 단백질 스캐폴드, 및 임의적으로, 부형제의 용액 또는 슬러리를 분무 건조시킴으로써 제조될 수 있다. 용매는 쉽게 건조될 수 있는 극성 화합물, 예컨대, 물 및 에탄올을 포함할 수 있다. 단백질 스캐폴드 안정성은 산소 부재하에, 예컨대, 질소 블랭킷하에서, 또는 건조 가스로서 질소를 사용하여 분무 건조 방법을 수행함으로써 증진될 수 있다. 또 다른 비교적 건식이 제제는 전형적으로 WO 9916419에 교시된 바와 같이 하이드로플루오로알칸 추진체를 포함하는 현

탁액 매질 중에 분산된 복수 개의 천공된 마이크로구조의 분산제이다. 안정화된 분산제는 계량 흡입기를 사용하여 환자의 폐로 투여될 수 있다. 분무 건조된 의약이 상업적 제조에 유용한 장치는 부치 리미티드(Buchi Ltd.) 또는 니로 코포레이션(Niro Corp.)에 의해 제조된 것이다.

[0288] 본원에 기술된 안정적인 또는 보존 제제 또는 액제 중의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 당업계에 널리 공지된 바와 같이, SC 또는 IM 주사; 경피, 폐, 경점막, 임플란트, 삼투압 펌프, 카트리지, 마이크로펌프, 또는 당업자가 알고 있는 또 다른 수잔을 비롯한, 다양한 전달 방법을 통해 본 발명에 따라 환자에게 투여될 수 있다.

[0289] ***치료적 적용***

[0290] 본 발명은 또한 당업계에 공지된 바와 같이, 또는 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 사용하여, 예컨대, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 치료 유효량의 단백질 스캐폴드를 투여하거나, 또는 그와 접촉시킴으로써, 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 질환을 조정 또는 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 악성 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는 질환을 조정 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0291] 본 발명은 또한 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에서 백혈병, 급성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병(ALL: acute lymphoblastic leukemia), 급성 림프구 백혈병, B 세포, T 세포 또는 FAB ALL, 급성 골수양 백혈병(AML: acute myeloid leukemia), 급성 골수성 백혈병, 만성 골수세포 백혈병(CML: chronic myelocytic leukemia), 만성 림프구 백혈병(CLL: chronic lymphocytic leukemia), 모세포 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS: myelodyplastic syndrome), 림프종, 호지킨 질환, 악성 림프종, 비호지킨 림프종, 버킷 림프종, 다중 골수종, 카포시 육종, 결장직장 암종, 췌장 암종, 비인두 암종, 악성 조직구증, 부종양 증후군/악성종양에 의한 고칼슘혈증, 고형 종양, 방광암, 유방암, 결장직장암, 자궁내막암, 두부암, 경부암, 유전성 비용종증 암, 호지킨 림프종, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 신장 세포 암종, 고환암, 선암종, 육종, 악성 흑색종, 혈관종, 전이성 질환, 암 관련 골 재흡수, 암 관련 골 통증 등 중 적어도 하나를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 적어도 하나의 악성 질환을 조정 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0292] 본 발명의 임의의 방법은 상기 조정, 치료 또는 요법을 필요로 하는 세포, 조직, 기관, 동물 또는 환자에게 유효량의, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 포함하는 조성물 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 임의적으로 상기 질환 또는 장애를 치료하기 위해 공동 투여 또는 조합 요법을 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 상기 적어도 하나의 단백질 스캐폴드, 그의 명시된 일부분 또는 변이체를 투여하는 것은 알킬화제, 유사분열 억제제, 및 방사성약물 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 하나를 이전에, 그와 동시에, 및/또는 그 이후에 투여하는 것을 추가로 포함한다. 적합한 투여량은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예컨대, 문헌 [Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000)]; [PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000)]; [Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, Pa., 2001]; [Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, N.J.](상기 참고문헌은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).

[0293] 바람직한 용량은 임의적으로 투여당 약 0.1-99 및/또는 100-500 mg/kg, 또는 그의 임의의 범위, 값 또는 분율을 포함할 수 있거나, 또는 혈청 농도를 달성하도록 단일, 또는 다회 투여당 약 0.1-5,000 ㎍/ml(혈청) 농도, 또는 그의 임의의 범위, 값 또는 분율을 포함할 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드의 바람직한 투여량 범위는 약 1 mg/kg(환자 체중), 최대 약 3, 약 6 또는 약 12 mg/kg(환자 체중)이다.

[0294] 대안적으로, 투여되는 투여량은 공지된 인자, 예컨대, 특정 작용제의 약력학적 특징, 및 그의 투여 모드 및 경로; 수혜자의 연령, 건강, 및 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료 종류, 치료 빈도, 및 원하는 효과에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 활성 성분의 투여량은 체중 1 kg당 약 0.1 내지 100 mg일 수 있다. 일반적으로, 0.1 내지 50, 및 바람직하게, 0.1 내지 10 mg/kg/투여, 또는 지속 방출형 형태가 원하는 결과를 얻는 데 효과적이다.

[0295] 비제한적인 예로서, 인간 또는 동물 치료에서는 단일 주입 또는 반복 투약을 사용하여 1-40일째 중 적어도 한 시점에, 대안적으로 또는 추가로, 1-52주째 중 적어도 한 시점에, 또는 대안적으로 또는 추가로, 1-20년째 중 적어도 한 시점에 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드가 1일당 약 0.1 내지 내지 100 mg/kg, 또는 그의 임의의 범위, 값 또는 분율인 1회 또는 주기적 투여량으로서 제공될 수 있다.

[0296] 체내 투여에 적합한 투여 형태(조성물)은 일반적으로 유니트 또는 용기당 약 0.001 mg 내지 약 500 mg의 활성

성분을 함유한다. 활성 성분은 일반적으로 상기 약학적 조성물 중에 조성물 총 중량에 기초하여 약 0.5-99.999중량%인 양으로 존재할 것이다.

[0297] 비경구적 투여를 위해, 단백질 스캐폴드는 제공되는 약학적으로 허용되는 비경구용 비히클과 함께 회합하여, 또는 별개로 액제, 현탁제, 에멀젼, 입자, 분제, 또는 동결건조된 분제로서 제제화될 수 있다. 상기 비히클의 예로는 물, 염수, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 약 1-10% 인간 혈청 알부민이 있다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예컨대, 고정유 또한 사용될 수 있다. 비히클 또는 동결건조된 분제는 등장성(예컨대, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성(예컨대, 완충제 및 보존제)을 유지시켜 주는 첨가제를 함유할 수 있다. 제제는 공지된 또는 적합한 기술에 의해 멸균화된다.

[0298] 적합한 약학적 담체는 본 분야의 표준 참조 교재인 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol]의 최신판에 기술되어 있다.

[0299] ***대안적 투여***

[0300] 약학적 유효량의, 본 발명에 따른 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 투여하는 데 다수의 공지 및 개발된 모드가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 하기 설명에서 폐 투여가 사용되지만, 다른 투여 모드가 본 발명에 따라 사용될 수 있고, 적합한 결과를 얻을 수 있다. 본 발명의 단백질 스캐폴드는 담체 중에서 액제, 에멀젼, 콜로이드, 또는 현탁제로서, 또는 건식 분제로서 흡입 또는 본원에 기술된, 또는 당업계에 공지된 다른 모드에 의한 투여에 적합한 다양한 장치 및 방법 중 임의의 것을 사용하여 전달될 수 있다.

[0301] ***비경구용 제제 및 투여***

[0302] 비경구적 투여용 제제는 일반 부형제로서 멸균수 또는 멸균 염수, 폴리알킬렌 글리콜, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 식물 기원의 오일, 수소화된 나프탈렌 등을 함유할 수 있다. 주사용의 수성 또는 오일성 현탁제는 공지된 방법에 따라 적절한 유화제 또는 습윤제, 및 현탁화제를 사용하여 제조될 수 있다. 주사용 작용제는 비독성, 비경구적으로 투여가능한 희석제, 예컨대, 수성 액제, 멸균 주사용 액제 또는 용매 중 현탁제일 수 있다. 이용가능한 비히클 또는 용매, 물, 링거액, 등장성 염수 등이 허용되는 바와 같이; 일반 용매 또는 현탁화 용매, 멸균 비휘발성 오일이 사용될 수 있다. 이를 위해, 천연 또는 합성 또는 반합성 지방 오일 또는 지방산; 천연 또는 합성 또는 반합성 모노 또는 디 또는 트리글리세리드를 비롯한, 임의 종류의 비휘발성 오일 및 지방산이 사용될 수 있다. 비경구적 투여는 당업계에 공지되어 있고, 종래의 주사 수단, 미국 특허 번호 5,851,198에 기술되어 있는 바와 같은 가스 가압형의 바늘이 없는 주사 장치, 및 미국 특허 번호 5,839,446에 기술되어 있는 바와 같은 레이저 천공기 장치를 포함하나, 이에 제한되지 않는다(상기 특허는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).

[0303] ***대안적 전달***

[0304] 본 발명은 추가로 비경구적, 피하, 근육내, 정맥내, 관절내, 기관지내, 복부내, 낭내, 연골내, 체강내, 복내, 소뇌내, 뇌실내, 결장내, 자궁경관내, 위내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심막내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척수내, 활막내, 흉강내, 자궁내, 방광내, 병변내, 볼루스, 질, 직장, 협측, 설하, 비내, 또는 경피 수단에 의해 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 투여하는 것에 관한 것이다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물은 비경구적(피하, 근육내 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여용으로 사용하기 위해 특히 액체 액제 또는 현탁제 형태로; 질 또는 직장 투여용으로 사용하기 위해 특히 반고체 형태로, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 크림제 및 좌제 형태로; 협측, 또는 설하 투여용으로 사용하기 위해 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 정제 또는 캡슐제 형태로; 또는 비내로 사용하기 위해 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 분제, 비강용 점적제 또는 에어로졸 또는 특정 작용제; 또는 경피적으로 사용하기 위해 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 겔, 연고, 로션, 현탁제, 또는 피부 구조를 변형시키기 위해, 또는 경피용 패치 중의 약물 농도를 증가시키기 위해 화학 증진제, 예컨대, 디메틸술폭시드를 포함하거나([Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement;" Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994](상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)), 또는 단백질 및 펩티드를 함유하는 제제를 피부 상에 적용시킬 수 있게 하는(WO 98/53847), 또는 전기장을 가하여 예컨대, 전기천공과 같이 일시적 수송 경로를 생성하거나, 또는 예컨대, 이온영동과 같이, 피부를 통과하는 하전된 약물의 이동성을 증가시키는, 또는 예컨대, 초음파영동법과 같이, 초음파를 적용시킬 수 있게 하는(미국 특허 번호 4,309,989 및 4,767,402) 산화제를 포함하는 패치 전달 시스템으로 제조될 수 있다(상기 공개문헌 및 특허는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다).

[0305] ***폐/비강 투여***

[0306] 폐 투여를 위해, 바람직하게, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물은 폐의 하부 기도 또는 부비강에 도달하는

데 효과적인 입자 크기로 전달된다. 본 발명에 따라, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 흡입에 의해 치료제를 투여하기 위한 것으로 당업계에 공지된 다양한 흡입용 또는 비강용 장치 중 임의의 것에 의해 전달될 수 있다. 환자의 부비동 또는 폐포에 에어로졸화된 제제를 침착시킬 수 있는 상기 장치는 계량 흡입기, 네블라이저, 건식 분말 생성기, 분무기 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드의 폐 또는 비강 투여를 유도하는 데 적합한 다른 장치 또한 당업계에 공지되어 있다. 상기와 같은 장치는 모두 에어로졸인 단백질 스캐폴드의 분배를 위한 투여에 적합한 제제를 사용할 수 있다. 상기 에어로졸은 용액(수성 및 비수성, 둘 모두) 또는 고체 입자로 구성될 수 있다.

[0307] 예컨대, 벤토린(Ventolin) 계량 흡입기와 같은 계량 흡입기는 전형적으로 추진체 가스를 이용하고, 흡입 동안 작동을 필요로 한다(예컨대, WO 94/16970, WO 98/35888 참조). 터부헬러(Turbuhaler)™(Astra), 로타헬러(Rotahaler)®(Glaxo), 디스쿠스(Diskus)®(Glaxo), 스피로스(Spiros)™ 흡입기(Dura), 인홀 테라퓨틱스(Inhale Therapeutics)에 의해 시판되는 장치, 및 스핀헬러(Spinhaler)® 분말 흡입기(Fisons)와 같은 건식 분말 흡입기는 혼합된 분말의 호흡 작동을 이용한다(미국 특허 번호 4,668,218(Astra), EP 237507(Astra), WO 97/25086(Glaxo), WO 94/08552(Dura), 미국 특허 번호 5,458,135(Inhale), WO 94/06498(Fisons), 상기 특허는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다). AERx™ 애러다임(AERx™ Aradigm), 울트라벤트(Ultravent)® 네블라이저(Mallinckrodt), 및 아콘 II(Acorn II)® 네블라이저(Marquest Medical Products)(미국 특허 번호 5,404,871(Aradigm), WO 97/22376)(상기 참조문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)와 같은 네블라이저는 용액으로부터 에어로졸을 생성하지만, 계량 흡입기, 건식 분말 흡입기 등은 작은 입자 에어로졸을 생성한다. 상업적으로 이용가능한 흡입 장치에 관한 상기의 구체적인 예는 본 발명의 실시에 적합한 구체적인 장치를 대표적으로 나타내고자 하는 것이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0308] 바람직하게, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 조성물은 건식 분말 흡입기 또는 분무기에 의해 전달된다. 본 발명의 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 투여하기 위한 흡입 장치에는 몇가지 바람직한 특징이 존재한다. 예를 들어, 흡입 장치에 의한 전달은 이롭게는 신뢰가능하고, 재현가능하며, 정확하다. 흡입 장치는 임의적으로 우수한 호흡성을 위해 예컨대, 약 10 ㎛ 미만, 바람직하게 약 1-5 ㎛와 같은 작은 건식 입자를 전달할 수 있다.

[0309] ***스프레이로서의 단백질 스캐폴드 조성물의 투여***

[0310] 단백질 스캐폴드 조성물을 포함하는 스프레이는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 현탁액 또는 용액을 압력하에 노즐을 통해 가압함으로써 제조될 수 있다. 노즐 크기 및 형태, 가해지는 압력, 액체 공급 속도는 원하는 결과 및 입자 크기를 달성할 수 있도록 선택될 수 있다. 전기스프레이는 예를 들어, 모세관 또는 노즐 피드에 연결된 전기장에 의해 제조될 수 있다. 이롭게는, 분무기에 의해 전달되는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 입자는 약 10 ㎛ 미만, 바람직하게, 약 1 ㎛ 내지 약 5 ㎛, 및 가장 바람직하게, 약 2 ㎛ 내지 약 3 ㎛ 범위의 입자 크기를 가진다.

[0311] 분무기를 이용하여 사용하기에 적합한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 제제는 전형적으로 수용액 중 단백질 스캐폴드 조성물을 용액 1 ml당 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물 약 0.1 mg 내지 약 100 mg, 또는 약 0.1 mg/gm 내지 약 100 mg/gm, 그 안의 임의의 범위, 값, 또는 분율인 농도로 포함한다. 제제는 작용제, 예컨대, 부형제, 완충제, 등장제, 보존제, 계면활성제, 및 바람직하게, 아연을 포함할 수 있다. 제제는 또한 부형제 또는 단백질 스캐폴드 조성물의 안정화를 위한 작용제, 예컨대, 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물을 포함할 수 있다. 단백질 스캐폴드 조성물을 제제화하는 데 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드 조성물을 제제화하는 데 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 단백질 스캐폴드 조성물 제제는 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무화에 의해 유발되는 단백질 스캐폴드 조성물의 표면 유도 응집을 감소시키거나, 또는 그를 막을 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 다양한 통상적인 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알콜, 및 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르가 사용될 수 있다. 양은 일반적으로 제제 대비 0.001 내지 14중량% 범위가 될 것이다. 본 발명의 목적에 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 단백질, 예컨대, 단백질 스캐폴드, 또는 명시된 일부분 또는 변이체의 제제화를 위한 당업계에 공지된 추가의 작용제 또한 제제에 포함될 수 있다.

[0312] ***네블라이저에 의한 단백질 스캐폴드 조성물의 투여***

[0313] 본 발명의 단백질 스캐폴드 조성물은 네블라이저, 예컨대, 제트 네블라이저 또는 초음파 네블라이저에 의해 투여될 수 있다. 전형적으로, 제트 네블라이저에서는, 오리피스를 통해 고속 공기 제트를 생성하기 위해 압축 공기 공급원을 이용한다. 가스가 노즐 넘어로 팽창함에 따라, 저압 구역이 생성되고, 이는 액체 저장소에 연결된 모세관을 통해 단백질 스캐폴드 조성물 용액을 흡입하게 된다. 모세관으로부터의 액체 스트림은 상기 모세관으

로부터 배출됨에 따라, 불안정한 필라멘트 및 소적으로 전단되어 에어로졸을 생성하게 된다. 주어진 제트 네블라이저로부터 원하는 성능 특징을 달성하기 위해 다양한 형태, 유속, 및 배플 유형이 사용될 수 있다. 초음파 네블라이저에서는, 전형적으로 압전 변환기를 사용하여 진동, 역학 에너지를 생성하기 위해, 고주파 전기 에너지가 사용된다. 상기 에너지는 단백질 스캐폴드 조성물의 제제에 직접적으로, 또는 커플링 유체를 통해 전달되고, 이로써, 단백질 스캐폴드를 포함하는 에어로졸이 생성된다. 이롭게는, 네블라이저에 의해 전달되는 단백질 스캐폴드 조성물의 입자는 약 10 ㎛ 미만, 바람직하게, 약 1 ㎛ 내지 약 5 ㎛, 및 가장 바람직하게, 약 2 ㎛ 내지 약 3 ㎛ 범위의 입자 크기를 가진다.

[0314] 제트 네블라이저 또는 초음파 네블라이저를 이용하여 사용하기에 적합한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 제제는 전형적으로 용액 1 ml당 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 약 약 0.1 mg 내지 약 100 mg인 농도로 포함한다. 제제는 작용제, 예컨대, 부형제, 완충제, 등장제, 보존제, 계면활성제, 및 바람직하게, 아연을 포함할 수 있다. 제제는 또한 부형제 또는 단백질 스캐폴드 조성물의 안정화를 위한 작용제, 예컨대, 완충제, 환원제, 벌크 단백질, 또는 탄수화물을 포함할 수 있다. 단백질 스캐폴드 조성물을 제제화하는 데 유용한 벌크 단백질은 알부민, 프로타민 등을 포함한다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 제제화하는 데 유용한 전형적인 탄수화물은 수크로스, 만니톨, 락토스, 트레할로스, 글루코스 등을 포함한다. 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 제제는 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무화에 의해 유발되는 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 표면 유도 응집을 감소시키거나, 또는 그를 막을 수 있는 계면활성제를 포함할 수 있다. 다양한 통상적인 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 및 알콜, 및 폴리옥시에틸렌 소르비톨 지방산 에스테르가 사용될 수 있다. 양은 일반적으로 제제 대비 0.001 내지 4중량% 범위가 될 것이다. 본 발명의 목적에 특히 바람직한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 20 등이다. 단백질, 예컨대, 단백질 스캐폴드의 제제화를 위한 당업계에 공지된 추가의 작용제 또한 제제에 포함될 수 있다.

[0315] ***계량 흡입기에 의한 단백질 스캐폴드 조성물의 투여***

[0316] 계량 흡입기(MDI: metered dose inhaler)에서, 추진체, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드, 및 임의의 부형제 또는 다른 첨가제는 액화된 압축 가스를 포함하는 혼합물로서 캐니스터에 함유되어 있다. 계량 밸브의 작동을 통해 혼합물이 에어로졸로서, 바람직하겐, 크기 범위가 약 10 ㎛ 미만, 바람직하게, 약 1 ㎛ 내지 약 5 ㎛, 및 가장 바람직하게, 약 2 ㎛ 내지 약 3 ㎛인 입자를 함유하는 에어로졸로서 방출된다. 원하는 에어로졸 입자 크기는 제트 밀링, 분무 건조, 임계점 응축 등을 비롯한, 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 제조되는 단백질 스캐폴드 조성물의 제제를 사용함으로써 수득될 수 있다. 바람직한 계량 흡입기로는 3M 또는 글락소(Glaxo)에 의해 제조되고, 하이드로플루오로카본 추진체를 사용하는 것을 포함한다. 계량 흡입기 장치를 이용하여 사용하기 위한 적어도 하나의 단백질 스캐폴드의 제제는 일반적으로 예를 들어, 계면활성제의 도움으로 추진체 중에 현탁된 비수성 매질 중의 현탁액으로서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 함유하는 미분된 분말을 포함할 것이다. 추진체는 본 목적을 위해 사용되는 임의의 통상의 물질, 예컨대, 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본, 또는 하이드로카본, 예컨대, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄, HFA-134a(하이드로플루오로알칸-134a), HFA-227(하이드로플루오로알칸-227) 등일 수 있다. 바람직하게, 추진체는 하이드로플루오로카본이다. 계면활성제는 추진체 중의 현탁액으로서 적어도 하나의 단백질 스캐폴드를 안정화시키기 위해, 화학 분해로부터 활성제를 보호하기 위해 및 다른 목적을 위해 선택될 수 있다. 적합한 계면활성제로는 소르비탄 트리올레에이트, 대두 레시틴, 올레상 등을 포함한다. 일부 경우에, 용액 에어로졸은 용매, 예컨대, 에탄올을 사용하는 용액 에어로졸이 바람직하다. 단백질의 제제화를 위한 당업계에 공지된 추가의 작용제 또한 제제에 포함될 수 있다. 당업계의 숙련가는 본 발명의 방법은 본원에 기술되지 않은 장치를 통해 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 조성물의 폐 투여에 의해 달성될 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0317] ***경구용 제제 및 투여***

[0318] 경구 투여용 제제는 장벽의 투과성을 인공적으로 증가시키기 위해 애주번트(예컨대, 레조르시놀 및 비이온성 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 올레일 에테르 및 n-헥사데실폴리에틸렌 에테르)의 공통 투여 뿐만 아니라, 효소 분해를 억제시키기 위해 효소 억제제(예컨대, 췌장 트립신 억제제, 디이소프로필플루오로포스페이트(DFF) 및 트라시롤)의 공통 투여에 의존한다. 경구적, 협측, 점막, 비강, 폐, 질, 막횡단, 또는 직장 투여용으로 의도되는, 단백질 및 단백질 스캐폴드 및 적어도 2개의 계면활성제의 조합을 포함하는 친수성 작용제를 전달을 위한 제제는 미국 특허 번호 6,309,663에 교시되어 있다. 경구 투여용의 고체 유형의 투여 형태의 활성 구성 요소 화합물을 수크로스, 락토스, 셀룰로스, 만니톨, 트레할로스, 라피노스, 말티톨, 덱스트란, 전분, 아가, 아르기네이트, 키틴, 키토산, 펙틴, 트라가칸트 검, 아라비아 검, 젤라틴, 콜라겐, 카세인, 알부민, 합성 또는 반합성

중합체, 및 글리세리드를 비롯한, 적어도 하나의 첨가제와 혼합할 수 있다. 이들 투여 형태는 또한 다른 유형(들)의 첨가제, 예컨대, 불활성 희석제, 윤활제, 예컨대, 스테아르산마그네슘, 파라벤, 보존제, 예컨대, 소르브산, 아스코르브산, .알파.-토코페롤, 항산화제, 예컨대, 시스테인, 붕해제, 결합제, 증점제, 완충화제, 감미제, 향미제, 방향제 등을 함유할 수 있다.

[0319] 정제 및 환제는 장용 코팅된 제제로 추가로 프로세싱될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는 의료용으로 허용가능한 에멀젼, 시럽, 엘릭시르, 현탁제 및 액제 제제를 포함한다. 이들 제제는 본 분야에서 통상 사용되는 불활성 희석제, 예컨대, 물을 함유할 수 있다. 리포솜 또한 인슐린 및 헤파린을 위한 약물 전달 시스템으로서 기술되었다(미국 특허 번호 4,239,754). 더욱 최근에는, 혼합된 아미노산의 인공 중합체의 마이크로스피어(프로테노이드)는 약물 전달을 위해 사용되고 있다(미국 특허 번호 4,925,673). 추가로, 미국 특허 번호 5,879,681 및 미국 특허 번호 5,871,753에 기술되고, 생물학적 활성제를 경구적으로 전달하는 데 사용되는 담체 화합물은 당업계에 공지되어 있다.

[0320] ***점막용 제제 및 투여***

[0321] 생체활성제를 경구적으로 투여하기 위해 제제는 하나 이상의 생체호환가능한 중합체 또는 공중합체 부형제, 바람직하게, 생분해성 중합체 또는 공중합체에 캡슐화되고, 이로써, 마이크로캡슐이 생성되는데, 이는 생성된 마이크로캡슐의 적절한 크기에 기인하여 상기 생체활성제는 위장관을 통과하기 때문에 효능의 손실 없이, 다르게는 동물의 "페이에르판(Peyer's patch)" 또는 "GALT"로도 공지된 집합 림프소절(folliculi lymphatic aggregati)에 도달하게 되고, 그에 의해 흡수된다. 유사한 집합 림프소절이 기관지(BALT) 및 대장에서도 발견될 수 있다. 상기 기술된 조직은 일반적으로 점막 결합 림프세망 조직(MALT: mucosally associated lymphoreticular tissue)으로 지칭된다. 점막 표면을 통한 흡수를 위해, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드 투여용 조성물 및 방법은 에멀젼 입자의 점막 부착을 달성함으로써 점막 표면을 통한 흡수를 촉진시키는 복수 개의 1 ㎛ 미만의 입자, 점막부착성 마크로분자, 생체활성 펩티드 및 수성 연속 상을 포함하는 에멀젼을 포함한다(미국 특허 번호 5,514,670). 본 발명의 에멀젼 적용을 위해 적합한 점막 표면은 각막, 결막, 협측, 설하, 비강, 질, 폐, 위, 장, 및 직장 투여 경로를 포함할 수 있다. 질 또는 직장 투여용 제제, 예컨대, 좌제는 부형제로서, 예를 들어, 폴리알킬렌글리콜, 바셀린, 코코아 버터 등을 함유할 수 있다. 비내 투여용 제제는 고체일 수 있고, 부형제로서 예를 들어, 락토스를 함유할 수 있거나, 점비제의 수성 또는 오일성 용액일 수 있다. 협측 투여를 위해, 부형제는 당, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 전호화 전분 등을 함유할 수 있다(미국 특허 번호 5,849,695).

[0322] ***경피용 제제 및 투여***

[0323] 경피 투여를 위해, 적어도 하나의 단백질 스캐폴드는 전달 장치, 예컨대, 리포솜 또는 중합체 나노입자, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 또는 마이크로스피어 (이는 달리 언급되지 않는 한, 총칭하여 마이크로입자로 지칭된다)에 캡슐화된다. 합성 중합체, 예컨대, 폴리하이드록시 산, 예컨대, 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 그의 공중합체, 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 및 폴리포스파젠, 및 천연 중합체, 예컨대, 콜라겐, 폴리아미노산, 알부민 및 다른 단백질, 알기네이트 및 다른 다당류, 및 그의 조합로 제조된 마이크로입자를 비롯한, 다수의 적합한 장치가 공지되어 있다(미국 특허 번호 5,814,599).

[0324] ***장기간 투여 및 제제***

[0325] 피험체에게 장기간 동안에 걸쳐, 예를 들어, 단일 투여로부터 1주 내지 1년의 기간 동안 본 발명의 화합물을 전달하는 것이 바람직할 수 있다. 각종의 저속 방출형, 데포 또는 임플란트 투여 형태가 사용될 수 있다. 예를 들어, 투여 형태는 체액 중에서 가용성 정도가 낮은, 화합물의 약학적으로 허용되는 비독성 염, 예를 들어, (a) 다염기산, 예컨대, 인산, 황산, 시트르산, 타르타르산, 탄닌산, 팜산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌 모노술폰산 또는 디술폰산, 폴리갈락투론산 등과의 산 부가 염; (b) 다가 금속 양이온, 예컨대, 아연, 칼슘, 비스무트, 바륨, 마그네슘, 알루미늄, 구리, 코발트, 니켈, 카드뮴 등과의 염, 또는 예컨대, N,N'-디벤질-에틸렌디아민 또는 에틸렌디아민으로부터 형성된 유기 양이온과의 염; 또는 (c) (a) 및 (b)의 조합, 예컨대, 탄닌산 아연 염을 함유할 수 있다. 본 발명의 화합물, 또는 바람직하게, 상대적으로 불용성인 염, 예컨대, 바로 앞에 기술된 염은 주사용으로 적합한, 예컨대, 참깨유를 이용하여 겔로, 예를 들어, 알루미늄 겔로 제제화될 수 있다. 특히 바람직한 염은 아연 염, 탄닌산아연 염, 파모에이트 염 등이다. 또 다른 유형의 저속 방출형 주사용 데포 제제는 예를 들어, 미국 특허 번호 3,773,919에 기술된 바와 같이, 캡슐화를 위해 저속 분해, 비독성, 비항원성 중합체, 예컨대, 폴리락트산/폴리글리콜산 중합체 중에 분산된 화합물 또는 염을 함유할 것이다. 화합물, 또는 바람직하게, 상대적으로 불용성인 염, 예컨대, 상기 기술된 염 또한 특히, 동물에서 사용하기 위

해 콜레스테롤 매트릭스 실라스틱 펠릿으로 제제화될 수 있다. 추가의 저속 방출형, 데포 또는 임플란트 제제, 예컨대, 가스 또는 액체 리포솜은 문헌에 공지되어 있다(미국 특허 번호 5,770,222 및 문헌 ["Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978]).

[0326] ***입양 세포 요법으로서 변형된 세포의 주입***

[0327] 본 개시내용은 그를 필요로 하는 피험체에게로의 투여를 위해 선별되고/거나, 확장된 본 개시내용의 하나 이상의 CAR 및/또는 CARTyrin을 발현하는 변형된 세포를 제공한다. 본 개시내용의 변형된 세포는 실온 및 체온을 비롯한 임의의 온도에서의 보관을 위해 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 냉동보존, 및 이어서, 해동을 위해 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 멸균 패키징으로부터 피험체에게로의 직접적인 투여를 위해 약학적으로 허용되는 담체 중에 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 최소 수준의 세포 기능 및 CAR/CARTyrin 발현을 보장하기 위해 세포 생존능 및/또는 CAR/CARTyrin 발현 수준의 지표와 함께 약학적으로 허용되는 담체 중에 제형화될 수 있다. 본 개시내용의 변형된 세포는 추가 확장을 억제시키고/거나, 세포 사멸을 막기 위한 하나 이상의 시약과 함께 처방된 밀도로 약학적으로 허용되는 담체 중에 제형화될 수 있다.

[0328] ***유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드***

[0329] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 면역원성이 훨씬 더 작기 때문에, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드가 현존 유도성 폴리펩티드보다 우수하다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이고, 따라서, 비자연적으로 발생된 것이지만, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 생성하도록 재조합된 서열은, 숙주 인간 면역계가 "자기가 아닌 것"으로 인식할 수 있고, 그 결과, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함하는 세포, 또는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 또는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 포함하는 세포를 포함하는 조성물을 받은 피험체에서 면역 반응을 유도할 수 있는 비인간 서열은 포함하지 않는다.

[0330] 본 개시내용은 리간드 결합 영역, 링커, 및 아폽토시스 유발성 펩티드를 포함하는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 제공하고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열은 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 특정 실시양태에서, 아폽토시스 유발성 펩티드는 카스파제 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 9 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 카스파제 9 폴리펩티드는 절두된 카스파제 9 폴리펩티드이다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[0331] 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 1, 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 4, 카스파제 5, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 카스파제 10, 카스파제 11, 카스파제 12, 및 카스파제 14를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 및 카스파제 10을 비롯한, 아폽토시스와 연관된 상기 카스파제 폴리펩티드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 2, 카스파제 8, 카스파제 9, 및 카스파제 10을 비롯한, 아폽토시스를 개시하는 상기 카스파제 폴리펩티드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 카스파제 3, 카스파제 6, 및 카스파제 7을 비롯한, 아폽토시스를 수행하는 상기 카스파제 폴리펩티드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0332] 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교하여 하나 이상의 변형을 가지는 아미노산 또는 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 코돈 최적화될 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 아미노산 및/또는 핵산 서열에 대한 하나 이상의 변형은 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교하여, 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 상호작용, 교차 결합, 교차 활성화, 또는 활성화를 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 아미노산 및/또는 핵산 서열에 대한 하나 이상의 변형은 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교하여, 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 면역원성을 감소시킬 수 있다.

[0333] 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 야생형 카스파제 폴리펩티드와 비교하여 절두된 것일 수 있다. 예를 들어, 카스파제 폴리펩티드는 본 개시내용의 유도성 카스파제 폴리펩티드를 포함하는 세포에서 아폽토시스를 개시하는 것 이외에도 국부 염증성 반응을 활성화시킬 수 있는 가능성을 제거하거나, 또는 그를 최소화시키기 위하여 카스파제 활성화 및 동원 도메인(CARD: Caspase Activation and Recruitment Domain)을 코딩하는 서열을 제거하도록 절두될 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 스플라이싱되어 야생형 카스파제 폴리펩티드 대비 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드의 변이체 아미노산 서열을 형성할 수 있다.

본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 재조합 및/또는 키메라 서열에 의해 코딩될 수 있다. 본 개시내용의 재조합 및/또는 키메라 카스파제 폴리펩티드는 하나 이상의 상이한 카스파제 폴리펩티드로부터의 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 본 개시내용의 재조합 및/또는 키메라 카스파제 폴리펩티드는 하나 이상의 종으로부터의 서열(예컨대, 인간 서열 및 비인간 서열)을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 카스파제 폴리펩티드는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[0334] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 리간드 결합 영역은 본 개시내용의 제1 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드와 본 개시내용의 제2 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 이량체화를 용이하게 하거나, 또는 촉진시키는 임의의 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있으며, 상기의 이량체화는 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 교차 결합, 및 세포에서의 아폽토시스의 개시를 활성화시키거나, 또는 유도한다.

[0335] 리간드 결합("이량체화") 영역은 천연 또는 비천연 리간드(즉, 및 유도제), 예를 들어, 비천연 합성 리간드를 이용하여 유도를 허용하게 되는 임의의 폴리펩티드 또는 그의 기능성 도메인을 포함할 수 있다. 리간드 결합 영역은 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 성질, 및 리간드(즉, 유도제) 선택에 따라 세포막 내부 또는 외부에 위치할 수 있다. 수용체를 비롯한, 매우 다양한 리간드 결합 폴리펩티드 및 그의 기능성 도메인이 공지되어 있다. 본 개시내용의 리간드 결합 영역은 수용체로부터 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 리간드(예컨대, 소형 유기 리간드)가 공지되어 있거나, 또는 쉽게 제조될 수 있는 리간드 결합 영역이 특히 관심의 대상이 된다. 이러한 리간드 결합 영역 또는 수용체는 FKBP 및 사이클로필린 수용체, 스테로이드 수용체, 테트라사이클린 수용체 등 뿐만 아니라, 항체, 특히 그의 중쇄 또는 경쇄 서브유니트, 돌연변이화된 서열, 확률적 방법에 의해 무작위 아미노산 서열, 조합 합성으로부터 수득될 수 있는 "비천연" 수용체 등 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 FKBP 리간드 결합 영역, 사이클로필린 수용체 리간드 결합 영역, 스테로이드 수용체 리간드 결합 영역, 사이클로필린 수용체 리간드 결합 영역, 및 테트라사이클린 수용체 리간드 결합 영역으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0336] 하나 이상의 수용체 도메인(들)을 포함하는 리간드 결합 영역은 천연 도메인 또는 그의 절두된 활성부로서, 적어도 약 50개의 아미노산 내지 약 350개 미만의 아미노산, 일반적으로 200개 미만의 아미노산일 수 있다. 결합 영역은 예를 들어, 소형(< 25 kDa, 바이러스 벡터에서의 효율적인 형질감염을 허용하기 위함)이고, 단량체이며, 비면역원성일 수 있고, 이량체화를 위해 형성될 수 있는, 합성적으로 접근가능하고, 세포 투과성이며, 비독성인 리간드를 가질 수 있다.

[0337] 하나 이상의 수용체 도메인(들)을 포함하는 리간드 결합 영역은 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 디자인, 및 적절한 리간드(즉, 유도제)의 이용가능성에 따라 세포내, 또는 세포외일 수 있다. 소수성 리간드를 위해, 결합 영역은 막의 양측 어디에나 위치할 수 있지만, 친수성 리간드, 특히, 단백질 리간드를 위해서는, 결합을 위해 이용가능한 형태로 리간드를 내재화하는 수송 시스템이 없다면, 결합 영역은 일반적으로 세포막 외부에 위치할 것이다. 세포내 수용체의 경우, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드, 또는 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드 를 포함하는 트랜스포존 또는 벡터는 수용체 도메인 서열의 신호 펩티드 및 막관통 도메인 5' 또는 3'을 코딩할 수 있거나, 또는 수용체 도메인 서열의 지질 부착 신호 서열 5'를 가질 수 있다. 수용체 도메인이 신호 펩티드와 막관통 도메인 사이에 위치하는 경우, 수용체 도메인인 세포외일 것이다.

[0338] 항체, 및 항체 서브유니트, 예컨대, 중쇄 또는 경쇄, 특히, 단편, 더욱 특히, 가변 영역 모두 또는 그의 일부, 또는 고친화성 결합을 생성하기 위해 중쇄 및 경쇄의 융합물이 본 개시내용의 리간드 결합 영역으로서 사용될 수 있다. 고려되는 항체로는 이소성 방식으로 발현된 인간 생성물인 것, 예컨대, 면역 반응을 유발하지 않고, 일반적으로, 말초부(즉, CNS/뇌 부위 바깥쪽)에서 발현되지 않는 세포외 도메인을 포함한다. 상기 예로는 저친화성 신경 성장 인자 수용체(LNGFR: low affinity nerve growth factor receptor), 및 배아 표면 단백질(즉, 암배아 항원)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한 추가로, 항체는 생리적으로 허용되는 합텐 분자에 대하여 제조될 수 있고, 개별 항체 서브유니트는 결합 친화성에 대해 스크리닝될 수 있다. 서브유니트를 코딩하는 cDNA는 단리되고, 불변 영역, 가변 영역의 일부분의 결실, 가변 영역의 돌연변유발 등에 의해 변형될 수 있고, 이를 통해, 리간드에 대하여 적절한 친화성을 가지는 결합 단백질 도메인을 수득할 수 있다. 이러한 방식으로, 거의 모든 생리적으로 허용되는 합텐 분자가 리간드로서, 또는 리간드에 대한 에피토프를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 항체 유니트 대신, 결합 영역 또는 도메인이 공지되고, 결합을 위해 유용한 또는 공지된 리간드가 존재하는 경우, 천연 수용체가 사용될 수 있다.

[0339] 수용체의 다량체화를 위해, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 리간드 결합 영역/수용체 도메인에 대한 리간드는 리간드가, 각 결합 부위가 리간드 수용체 영역에 결합할 수 있는 것인 적어도 2개의 결합 부위를 가질

수 있다는 점에서 다량체일 수 있다(즉, 리간드는 제1 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 리간드 결합 영역에 결합할 수 있는 제1 결합 부위, 및 제2 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 리간드 결합 영역에 결합할 수 있는 제2 결합 부위를 가지며, 여기서, 제1 및 제2 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 리간드 결합 영역은 동일하거나, 또는 상이하다). 따라서, 본원에서 사용되는 바, "다량체 리간드 결합 영역"이라는 용어는 다량체 리간드에 결합하는, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 리간드 결합 영역을 지칭한다. 본 개시내용의 다량체 리간드는 이량체 리간드를 포함한다. 본 개시내용의 이량체 리간드는 리간드 수용체 도메인에 결합할 수 있는 2개의 결합 부위를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 다량체 리간드는 이량체, 또는 고차원 올리고, 일반적으로는 대략 사량체 이하의 소형 합성 유기 분자이고, 개별 분자는 전형적으로 적어도 약 150 Da 내지 약 5 kDa 미만, 일반적으로는 약 3 kDa 미만이다. 다양한 합성 리간드와 수용체의 쌍이 사용될 수 있다. 예를 들어, 천연 수용체를 포함하는 실시양태에서, 이량체 FK506은 FKBP12 수용체와 함께 사용될 수 있고, 이량체화된 사이클로스포린 A는 사이클로필린 수용체와 함께 사용될 수 있고, 이량체화된 에스트로겐은 에스트로겐 수용체와 함께, 이량체화된 글루코코르티코이드는 글루코코르티코이드 수용체와 함께, 이량체화된 테트라사이클린은 테트라사이클린 수용체와 함께, 이량체화된 비타민 D는 비타민 D 수용체와 함께 사용될 수 있고, 다른 것도 그러한 방식으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 고차원의 리간드, 예컨대, 삼량체가 사용될 수 있다. 비천연 수용체, 예컨대, 항체 서브유니트, 변형된 항체 서브유니트, 가요성 링커에 의해 이격되어 있는, 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 병렬로 구성된 단일 쇄 항체, 또는 변형된 수용체, 및 그의 돌연변이화된 서열 등을 포함하는 실시양태의 경우, 매우 다양한 화합물 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 본 개시내용의 다량체 리간드를 포함하는 유니트의 중요한 특징은 각 결합 부위가 고친화도로 수용체에 결합할 수 있고, 바람직하게, 이는 화학적으로 이량체화될 수 있다는 점이다. 또한, 본 방법은 리간드의 소수성/친수성의 균형을 맞춤으로써, 이들이 혈청 중에 작용 수준으로 용해될 수 있고, 추가로 대부분의 적용을 위해 혈장막을 통과하여 확산될 수 있도록 하는 이용가능하다.

[0340] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 활성화는 예를 들어, 조건부로 조절되는 단백질 또는 폴리펩티드를 생산하는 유도제에 의해 매개되는 화학적으로 유도된 이량체화(CID: chemically induced dimerization)를 통해 달성될 수 있다. 본 개시내용의 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 유도성일 뿐만 아니라, 상기 폴리펩티드의 유도는 또한 불안정한 이량체화의 분해, 또는 단량체 경재적 억제제의 투여에 기인하여 가역적일 수 있다.

[0341] 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 리간드 결합 영역은 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 가지는 FKBP12 폴리펩티드를 포함한다. 리간드 결합 영역이 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 가지는 FKBP12 폴리펩티드를 포함하는 특정 실시양태에서, 유도제는 AP1903인 합성 약물(CAS 인덱스 명칭: 2-피페리딘카복실산, 1-[(2S)-1-옥소-2-(3,4,5-트리메톡시페닐)부틸]-, 1,2-에탄디일비스[이미노(2-옥소-2,1-에탄디일)옥시-3,1-페닐렌[(1R)-3-(3,4-디메톡시페닐)프로필리덴]]에스테르, [2S-[1(R*),2R*[S*[S*[1(R*),2R*]]]]]-(9Cl) CAS 등록 번호: 195514-63-7; 분자식: C78H98N4O20; 분자량: 1411.65))을 포함할 수 있다. 리간드 결합 영역이 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 가지는 FKBP12 폴리펩티드를 포함하는 특정 실시양태에서, 유도제는 AP20187(CAS 등록 번호: 195514-80-8 및 분자식: C82H107N5O20)을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 유도제는 AP20187 유사체, 예컨대, 예를 들어, AP1510이다. 본원에서 사용되는 바, 유도제 AP20187, AP1903 및 AP1510은 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0342] AP1903 API는 알포라 리서치 인크.(Alphora Research Inc.)에 의해 제조되고, 주사용 AP1903 약물 제품(AP1903 Drug Product for Injection)은 포르마테크 인크.(Formatech Inc.)에 의해 제조된다. 이는 비이온성 가용제 솔루톨(Solutol) HS 15(250 mg/mL, BASF)의 25% 용액 중 5 mg/mL의 AP1903 용액으로서 제제화된다. 실온에서, 상기 제제는 투명하고, 약간 황색을 띠는 용액이다. 냉동시, 상기 제제는 가역적 상 전이가 이루어지고, 이로써, 유백색 용액이 생성된다. 상기 상 전이는 실온으로의 재가온시에 가역화된다. 충전량은 3 mL 유리 바이알 중 2.33 mL(바이알당 총 주사용 AP1903 대략 10 mg)이다. AP1903 투여가 필요하다고 결정되었을 때, 환자는 예를 들어, 비DEHP, 비에틸렌 옥시드 멸균화된 주입 세트를 사용하여 2시간 동안에 걸쳐 IV 주입을 통해 단일의 고정 용량의 주사용 AP1903(0.4 mg/kg)을 투여받을 수 있다. AP1903의 용량은 모든 환자에 대하여 개별적으로 계산되고, 체중이 ≥10%만큼 변동되지 않는다면, 재계산되지 않는다. 계산된 용량은 주입 이전에 0.9% 생리 식염수 100 mL 중에 희석된다. 선행된 AP1903에 관한 I상 연구에서, 24명의 건강한 지원자는 2시간 동안에 걸쳐 IV로 주입된, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/kg 용량 수준의 주사용 AP1903의 단일 투약으로 치료받았다. AP1903 혈장 수준은 용량과 정비례하였고, 0.01-1.0 mg/kg 용량 범위에 걸쳐 평균 C최대 값의 범위는 대략 10-1275 ng/mL였다. 초기의 주입 기간 후, 혈액 농도는 신속한 분포 단계를 보였고, 혈장 수준은 투약 후 0.5, 2 및 10

시간째에 각각 최대 농도의 대략 18, 7, 및 1%로 감소되었다. 주사용 AP1903은 모든 용량 수준에서 안정하고, 내약성이 우수한 것으로 나타났으며, 바람직한 약동학적 프로파일을 입증하였다(문헌 [Iuliucci J D, et al., J Clin Pharmacol. 41: 870-9, 2001]).

[0343] 사용된 주사용 AP1903의 고정 용량은 예를 들어, 2시간 동안에 걸쳐 정맥내로 주입되는 0.4 mg/kg일 수 있다. 시험관내에서 세포의 효과적인 신호전달을 위해 요구되는 AP1903의 양은 10-100 nM(1,600 Da MW)이다. 이는 16-160 μg/L 또는 ~0.016-1.6 μg/kg(1.6-160 μg/kg)과 같다. 상기 기술된 바와 같은 AP1903에 관한 I상 연구에서, 최대 1 mg/kg의 용량은 우수한 내약성을 보였다. 그러므로, 0.4 mg/kg은 안전할 수 있고, 치료 세포와 조합하여 상기 I상 연구에 대한 AP1903의 유효 용량일 수 있다.

[0344] 본 개시내용의 리간드 결합을 코딩하는 아미노산 및/또는 핵산 서열은 야생형 아미노산 또는 핵산 서열과 비교하여 하나 이상의 서열 변형을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 리간드 결합 영역을 코딩하는 아미노산 및/또는 핵산 서열은 코돈 최적화된 서열일 수 있다. 하나 이상의 변형은 야생형 폴리펩티드와 비교하여 본 개시내용의 리간드 결합 영역에 대한 리간드(예컨대, 유도제)의 결합 친화성을 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 하나 이상의 변형은 야생형 폴리펩티드와 비교하여 본 개시내용의 리간드 결합 영역에 대한 면역원성을 감소시킬 수 있다. 본 개시내용의 리간드 결합 영역 및/또는 본 개시내용의 유도제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[0345] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 리간드 결합 영역, 링커 및 아폽토시스 유발성 펩티드를 포함하고, 여기서, 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 비인간 서열을 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 비인간 서열은 제한 부위를 포함한다. 링커는, 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상호작용 또는 활성화가 세포에서 아폽토시스를 개시하도록 하기 위해, 리간드 결합 영역의 이량체화시, 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 상호작용, 교차 결합, 교차 활성화, 또는 활성화를 허용하는 임의의 유기 또는 무기 물질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 링커는 G/S가 풍부한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드("GS" 링커)이다. 특정 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 폴리펩티드이다. 바람직한 실시양태에서, 링커는 폴리펩티드이고, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 제한 엔도뉴클레아제에 대한 제한 부위를 함유하지 않는다. 본 개시내용의 링커는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[0346] 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 세포에서 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 발현을 개시 및/또는 조절할 수 있는 임의의 프로모터의 전사 조절하에 세포에서 발현될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "프로모터"라는 용어는 유전자를 전사시키는 RNA 폴리머라제에 대한 초기 결합 부위로서 작용하는 프로모터를 지칭한다. 예를 들어, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 포유동물 세포에서 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 발현을 개시 및/또는 조절할 수 있는, 천연, 내인성, 외인성, 및 이종성 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 프로모터의 전사 조절하에 포유동물 세포에서 발현될 수 있다. 바람직한 포유동물 세포는 인간 세포를 포함한다. 따라서, 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드는 인간 세포에서 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드의 발현을 개시 및/또는 조절할 수 있는, 인간 프로모터 또는 바이러스 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 프로모터의 전사 조절하에 인간 세포에서 발현될 수 있다. 인간 세포에서의 발현을 위한 프로모터의 예로는 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 조기 유전자 프로모터, SV40 조기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복부, β 액틴 프로모터, 래트 인슐린 프로모터 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제 프로모터포함하나, 이에 제한되지 않으며, 상기 프로모터는 각각 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 고수준으로 수득하는 데 사용될 수 있다. 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 당업계에 널리 공지된 다른 바이러스 또는 포유동물 세포 또는 박테리아 파지를 사용하는 것 역시 고려되지만, 단, 발현 수준은 세포에서 아폽토시스를 개시시키는 데 충분한 경우에 그러하다. 특성이 널리 공지된 프로모터를 사용함으로써, 형질감염 또는 형질전환 후, 관심 단백질의 발현 수준 및 패턴을 최적화할 수 있다.

[0347] 특이적인 생리적 또는 합성 신호에 반응으로 조절된 프로모터의 선택으로 본 개시내용의 유도성 아폽토시스 유발성 폴리펩티드가 유도적인 방식으로 발현될 수 있다. 엑디손 시스템(Invitrogen: 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)는 상기와 같은 한 시스템이다. 상기 시스템은 포유동물 세포에서의 관심 유전자의 조절된 발현이 이루어질 수 있도록 디자인된 것이다. 이는 실제로 기저 수준의 트랜스진 발현은 허용하지는 않지만, 200배 초과의 유도성을 허용하는 엄격하게 조절되는 발현 기전으로 구성된다. 상기 시스템은 드로소필라(*Drosophila*)의 이종이량체 엑디손 수용체를 기반으로 하고, 엑디손 또는 유사체, 예컨대, 무리스테론 A가 수용체에 결합할 때, 수용체는 프로모터를 활성화시켜 하류 트랜스진의 발현을 작동시킴으로써 고수준의 mRNA 전사체가 수득된다. 상기

시스템에서, 이종이량체 수용체의 두 단량체는 모두 구성적으로 한 벡터로부터 발현되는 반면, 관심 유전자의 발현을 구동시키는 엑디손 반응성 프로모터는 또 다른 플라스미드 상에 존재한다. 그러므로, 상기 유형의 시스템을 관심 벡터로 조작하는 것이 유용할 수 있다. 유용할 수 있는 또 다른 유도성 시스템은 원래는 (Gossen) 및 (Bujard)(문헌 [Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992]; [Gossen et al., Science, 268:1766-1769, 1995])에 의해 개발된, 테트-오프(Tet-Off)™ 또는 테르-온(Tet-On)™ 시스템(Clontech: 미국 캘리포니아주 팔로알토)이다. 상기 시스템을 통해서는 또한 테트라사이클린, 또는 테트라사이클린 유도체, 예컨대, 독시사이클린에 대한 반응으로 고소준의 유전자 발현이 조절될 수 있다. 테트-온™ 시스템에서, 유전자 발현은 독시사이클린의 존재하에서 작동이 시작되는 반면, 테트-오프™ 시스템에서는 유전자 발현이 독시사이클린의 부재하에서 작동이 시작된다. 이들 시스템은 E. 콜라이의 테트라사이클린 내성 오페론으로부터 유래된 2개의 조절 요소: (테트라사이클린 리프레서가 결합하는) 테트라사이클린 오퍼레이터 서열 및 테트라사이클린 리프레서 단백질을 기반으로 한다. 관심 유전자는 플라스미드 내로 그에 존재하는 테트라사이클린 반응성 요소를 가지는 프로모터 뒤에 클로닝된다. 제2 플라스미드는, 테트-오프™ 시스템에서, 단순 헤르페스 바이러스로부터의 VP16 도메인으로 구성된, 테트라사이클린 조절 전사활성인자로 불리는 조절 요소 및 야생형 테트라사이클린 리프레서를 함유한다. 따라서, 독시사이클린의 부재하에서, 전사는 구성적으로 작동을 시작한다. 테트-온™ 시스템에서, 테트라사이클린 리프레서가 야생형이 아니고, 독시사이클린의 부재하에서 전사를 활성화시킨다. 유전자 요법 벡터 제제를 위해, 테트-오프™ 시스템이 사용될 수 있고, 이로써, 생산자 세포는 테트라사이클린 또는 독시사이클린의 존재하에서 성장할 수 있고, 잠재적으로 독성인 트랜스진의 발현을 방해할 수 있지만, 벡터가 환자에게 도입되었을 때, 유전자 발현은 구성적으로 작동을 시작하게 될 것이다.

[0348] 일부 상황하에서는, 유전자 요법 벡터 중 트랜스진의 발현을 조절하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 원하는 발현 수준에 따라, 활성 강도가 다양한 상이한 바이러스 프로모터가 사용된다. 포유동물 세포에서는, 강력한 전사 활성화를 제공하기 위해서 대개는 CMV 즉시 조기 프로모터가 사용된다. CMV 프로모터는 문헌 [Donnelly, J. J., et al., 1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48]에 리뷰되어 있다. 트랜스진의 감소된 발현 수준이 요구될 때에는 강도가 감소된 변형된 버전의 CMV 프로모터 또한 사용될 수 있다. 조혈 세포에서의 트랜스진의 발현이 요구될 때, 대개는 레트로바이러스 프로모터, 예컨대, MLV 또는 MMTV로부터의 LTR이 사용된다. 원하는 효과에 따라 사용되는 다른 바이러스 프로모터로는 SV40, RSV LTR, HIV-1 및 HIV-2 LTR, 아데노바이러스 프로모터, 예컨대, E1A, E2A, 또는 MLP 영역, AAV LTR, HSV-TK, 및 조류 육종 바이러스로부터의 것을 포함한다.

[0349] 다른 예에서, 발생적으로 조절되고, 특정 분화된 세포에서 활성인 프로모터가 선택될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 프로모터는 다능성 줄기 세포에서는 활성을 띠지 않을 수 있지만, 예를 들어, 다능성 줄기 세포가 더욱 성숙한 세포로 분화된 경우, 이때는 프로모터가 활성화될 수 있다.

[0350] 유사하게, 잠재적 독성, 또는 비표적화된 조직에의 비바람직한 효과를 감소시키기 위하여 특이적 조직 또는 세포에서 전사가 이루어질 수 있도록 조직 특이적 프로모터가 사용된다. 이들 프로모터를 통해 더욱 강력한 프로모터, 예컨대, CMV 프로모터와 비교하여 감소된 발현이 이루어질 수 있고, 그 뿐만 아니라, 더욱 제한된 발현이 이루어질 수 있고, 면역원성이 생성될 수 있다(문헌 [Bojak, A., et al., 2002. Vaccine. 20:1975-79]; [Cazeaux., N., et al., 2002. Vaccine 20:3322-31]). 예를 들어, 적절할 경우, 조직 특이적 프로모터, 예컨대, PSA 연관 프로모터 또는 전립선 특이적 선 칼리크레인, 또는 근육 크레아틴 키나제 유전자가 사용될 수 있다.

[0351] 조직 특이적 또는 분화 특이적 프로모터로는 하기: B29(B 세포); CD14(단핵구 세포); CD43(백혈구 및 혈소판); CD45(조혈 세포); CD68(대식세포); 데스민(근육); 엘라스타제-1(췌장 소포 세포); 엔도글린(내피 세포); 피브로넥틴(분화 세포, 치유 조직); 및 Flt-1 (내피 세포); GFAP(성상세포)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0352] 특정 적응증에서, 유전자 요법 벡터 투여 후 특정 시점에 전사를 활성화시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 조절가능한 호르몬 또는 사이토카인인 것과 같이 상기 프로모터를 이용함으로써 수행된다. 사용될 수 있는 사이토카인 및 염증성 단백질 반응성 프로모터는 K 및 T 키니노겐(문헌 [Kageyama et al., (1987) J. Biol. Chem., 262, 2345-2351]), c-fos, TNF 알파, C 반응성 단백질(문헌 [Arcone, et al., (1988) Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207]), 합토글로빈(문헌 [Oliviero et al., (1987) EMBO J., 6, 1905-1912), 혈청 아밀로이드 A2, C/EBP 알파, IL-1, IL-6(문헌 [Poli and Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 8202-8206]), 보체 C3(문헌 [Wilson et al., (1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191]), IL-8, 알파-1 산성 당단백질(문헌 [Prowse and Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8, 42-51), 알파-1 항트립신, 지단백질 리파제(문헌 [Zechner et al., Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988]), 안지오텐시노겐(문헌 [Ron, et al., (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895]), 피브리노겐, c-jun(포르볼 에스테르, TNF 알파, UV 방사선, 레티노산, 및 과산화수소에 의해

유도), 콜라게나제(포르볼 에스테르 및 레티노산에 의해 유도), 메탈로티오네인(중금성 및 글루코코르티코이드 유도성), 스트로멜리신(포르볼 에스테르, 인터류킨-1 및 EGF에 의해 유도), 알파-2 마크로글로불린 및 알파-1 항키모트립신을 포함한다. 다른 프로모터로는 예를 들어, SV40, MMTV, 인체 면역 결핍 바이러스(MV), 몰로니 바이러스, ALV, 엡스타인-바 바이러스, 라우스 육종 바이러스, 인간 액틴, 미오신, 헤모글로빈, 및 크레아틴을 포함한다.

[0353] 원하는 작용에 따라 상기 프로모터 중 임의의 것은 단독으로 또는 또 다른 것과의 조합으로 유용할 수 있다는 것이 구상된다. 원하는 세포 또는 조직에서 작용성을 띠도록 프로모터, 및 다른 조절 요소가 선택된다. 추가로, 상기 프로모터 목록이 완전하거나, 또는 제한적인 것으로 해석되지 않아야 하며; 다른 프로모터가 본원에 개시된 프로모터 및 방법과 함께 사용된다.

[0354] **실시예**

[0355] **실시예 1: P-BCMA-101(a/k/a 항BCMA CARTyrin(A08))의 특징 규명**

[0356] CARTyrin을 코딩하는 서열을 T 세포 내로 전기천공한 후, 본 개시내용의 CARTyrin의 발현을 평가하였다. 종양 세포주에 대한 탈과립화에 의해 CARTyrin 발현 T 세포의 관능성을 측정하였다. 특징규명은 관능성과의 상관관계를 추가로 검정한다.

[0357] 도 4는 A08 항BCMA CARTyrin의 구조를 도시한 것이다.

[0358] 도 5-8은 (A08 항BCMA CARTyrin을 코딩하는) P-BCMA-101의 시험관내 및 생체내 특징규명을 보여주는 것이다.

[0359] A08 CARTyrin의 시험관내 평가 결과, 인간 1차 T 세포의 렌티바이러스 형질도입 후, 고수준의 표면 발현 및 BCMA+ 종양 세포에 대한 강력한 세포독성 기능(예컨대, 증식)이 입증되었다(도 5a-c 참조). 시험관내에서의 상기와 같은 강력한 성능 이후, 생체내에서 작용할 수 있는 A08 CARTyrin의 능력을 평가하였다.

[0360] 도 6은 마우스에서 A08 CARTyrin을 이용하여 수행된 생체내 연구를 위한 처리 스케줄을 도시한 것이다. 본 연구 결과는 (A08 CARTyrin을 코딩하는) P-BCMA-101로 처리된 마우스 100%가 21일째까지 생존하였다는 것을 보여준다(도 7 참조). 처리된 동물의 21일째의 상기와 같은 완전한 생존은 종양 부하량이 0인 외관을 동반하였다 (M 단백질 존재도에 의해 사정된 바, 이는 21일째에는 상기 동물에서 검출할 수 없었다(도 7 참조). 도 8은 P-BCMA-101로 처리된 것 뿐만 아니라, 대조군 동물에서의 종양 부하량을 추가로 도시한 일련의 사진을 제공하는 것이다. A08 CARTyrin을 발현하는 동물은 대조군과 비교하였을 때, 감소된 종양 부하량을 나타낸다.

[0361] **실시예 2: iC9 안전 스위치가 통합된 피기백의 인간 범용 T 세포 내 발현 및 기능**

[0362] 아막사 4D 뉴클레오펙터를 이용하여 인간 범용 T 세포를 4개의 피기백 트랜스포존 중 하나로 뉴클레오펙션시켰다. "모의" 조건을 받은 변형된 T 세포는 공(empty) 피기백 트랜스포존으로 뉴클레오펙션시켰다. 변형된 T 세포는 치료제만 단독(CARTyrin을 코딩하는 서열) 함유하는 피기백 트랜스포존, 또는 통합된 iC9 서열 및 치료제(CARTyrin을 코딩하는 서열)를 함유하는 피기백 트랜스포존을 받았다.

[0363] 도 8은 리간드 결합 영역, 링커, 및 절두된 카스파제 9 폴리펩티드를 함유하는 iC9 안전 스위치의 개략적 다이어그램을 제공하는 것이다. 구체적으로, iC9 폴리펩티드는 36번 위치에서의 페닐알라닌(F)의 발린(V)으로의 치환(F36V)을 포함하는 FK506 결합 단백질 12(FKBP12) 폴리펩티드를 포함하는 리간드 결합 영역을 함유한다. iC9 폴리펩티드의 FKBP12 폴리펩티드는

GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVI
RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE(서열 번호 23)

를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 FKBP12 폴리펩티드는

GGGGTCCAGGTCGAGACTATTTCACCAGGGGATGGGCGAACATTTCCAAAAAGG
GGCCAGACTTGCGTCGTGCATTACACCGGGATGCTGGAGGACGGGAAGAAAGTG
GACAGCTCCAGGGATCGCAACAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGAAAGCAGGAA
GTGATCCGAGGATGGGAGGAAGGCGTGGCACAGATGTCAGTCGGCCAGCGGGCC
AAACTGACCATTAGCCCTGACTACGCTTATGGAGCAACAGGCCACCCAGGGATC
ATTCCCCCTCATGCCACCCTGGTCTTCGAT GTGGAACTGCTGAAGCTGGAG(서열 번호 24)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 링커 영역은 GGGGS(서열 번호 25)를 포함하는 아미노산, 및 GGAGGAGGAGGATCC(서열 번호 26)를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 링커 영역을 코딩하는 핵산 서열은

GFGDVGALESLRGNADLAYISLMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRR
RFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
AVYGTDGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDE
SPGSNPEPDATPFQEGLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVE
TLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFLRKKLFFKTS
(서열 번호 27)

를 포함하는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. iC9 폴리펩티드의 링커 영역을 코딩하는 핵산 서열은

TTTGGGGACGTGGGGGCCCTGGAGTCTCTGCGAGGAAATGCCGATCTGGCTTACA
TCCTGAGCATGGAACCCTGCGGCCACTGTCTGATCATTAACAATGTGAACTTCTG
CAGAGAAAGCGGACTGCGAACACGGACTGGCTCCAATATTGACTGTGAGAAGCT
GCGGAGAAGGTTCTCTAGTCTGCACTTTATGGTCGAAGTGAAAGGGGATCTGACC
GCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCTCAGCAGGACCATGGAGCT
CTGGATTGCTGCGTGGTCGTGATCCTGTCCCACGGGTGCCAGGCTTCTCATCTGC
AGTTCCCCGGAGCAGTGTACGGAACAGACGGCTGTCCTGTCAGCGTGGAGAAGA
TCGTCAACATCTTCAACGGCACTTCTTGCCCTAGTCTGGGGGGAAAGCCAAAACT
GTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGGGAACAGAAAGATCACGGCTTCGAGGTGGC
CAGCACCAGCCCTGAGGACGAATCACCAGGGAGCAACCCTGAACCAGATGCAAC
TCCATTCCAGGAGGGACTGAGGACCTTTGACCAGCTGGATGCTATCTCAAGCCTG
CCCACTCCTAGTGACATTTTCGTGTCTTACAGTACCTTCCCAGGCTTTGTCTCATG
GCGCGATCCCAAGTCAGGGAGCTGGTACGTGGAGACACTGGACGACATCTTTGA
ACAGTGGGCCCATTCAGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGAGTGGCAAACGC
TGTCTCTGTGAAGGGCATCTACAAACAGATGCCCCGGGTGCTTCAATTTTCTGAGA
AAGAAACTGTTCTTTAAGACTTCC (서열 번호 28)

를 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0364] iC9 안전 스위치를 시험하기 위해, 4개의 변형된 T 세포를 각각 0, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM 또는 1,000 nM AP1903(AP1903에 대한 유도제)와 함께 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 아폽토시스된 세포에 대한 마커로서 형광 인터컬레이터인 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)를 사용하여 유세포 분석법에 의해 생존능을 사정하였다.

[0365] 세포 생존능을 12일째 사정하였다(도 9 참조). 데이터는 iC9 구성체를 함유하는 세포에서 유도제의 농도가 증가함에 따라 세포 집단이 우측 하단에서 좌측 상단 사분면으로 이동하였다는 보여주고 있지만; 그러나, 이러한 효과는 iC9 구성체가 없는 세포(오직 CARTyrin만을 받은 세포)에서 관찰되지 않고, 여기서, 세포는 유도제의 농도와 상관 없이, 상기 두 구역 사이에서 고르게 분포한다. 추가로, 세포 생존능을 19일째 사정하였다(도 10 참조). 데이터는 도 9(뉴클레오펙션 후 12일째)에 제시된 것과 동일한 경향을 보이고 있지만; 그러나, 좌측 상단 사분면으로의 집단 이동은 본 후기 시점(뉴클레오펙션 후 19일째)에 더욱 뚜렷하게 보인다.

[0366] 집계 결과의 정량화를 수행하였고, 이는 12일째(도 9 및 좌측 그래프) 및 19일째(도 10 및 우측 그래프)에 각 변형된 세포 유형에 대한 iC9 스위치의 유도제(AP1903)의 농도의 함수로서의 세포 생존율(%)에 iC9 안전 스위치가 미치는 유의적인 영향을 보여주고 있는 도 11에 제공되어 있다. iC9 안전 스위치의 존재가 12일째까지 세포 상당수에서 아폽토시스를 유도하고, 그 효과는 19일째까지 더욱더 현저하게 이루어진다.

[0367] 본 연구의 결과는, AP1903이 심지어 본 연구의 최저 농도(0.1 nM)에서도 아폽토시스를 유도하기 때문에, iC9 안전 스위치가 유도제(예컨대, AP1903)와의 접촉시 활성 세포를 제거하는 데 극도로 효과적이라는 것을 나타낸다. 추가로, iC9 안전 스위치는 트리시스트론성 벡터의 일부로서 기능적으로 발현될 수 있다.

[0368] **참조로 포함**

[0369] 명확히 배제되거나, 달리 제한되지 않은 한, 임의의 상호 참조되거나, 또는 관련된 특허 또는 출원을 비롯한, 본원에서 인용된 모든 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다. 어떤 문헌의 인용도 이 문헌이 본원에 개시되거나, 청구된 임의의 발명에 대하여 선행 기술이라는 것, 또는 상기 문헌이 단독으로 또는 임의의 다른 참고문헌 또는 참고문헌들과의 임의의 조합으로 임의의 상기 발명을 교시하거나, 제안하거나, 개시한다는 것을 인정

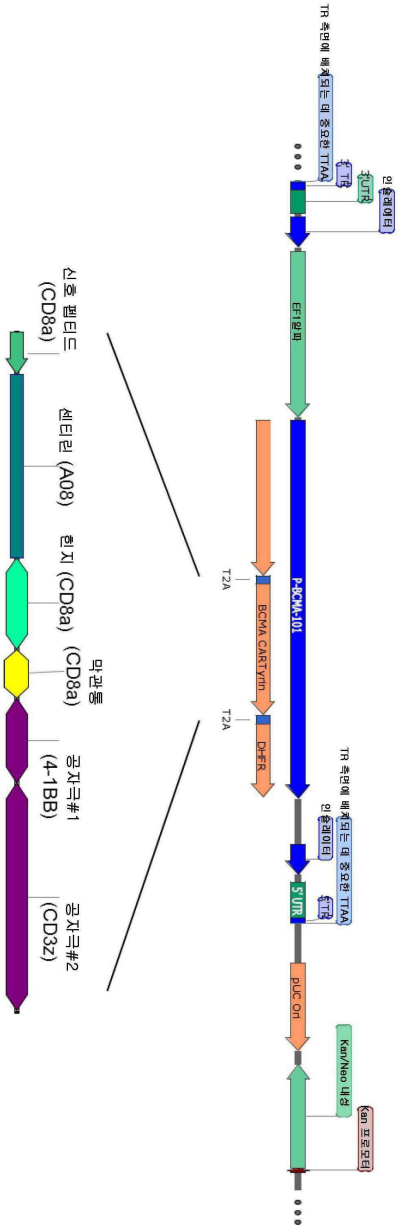
하는 것은 아니다. 추가로, 본 명세서에서 용어의 임의의 의미 또는 정의가 참조로 포함된 문헌에서의 동일한 용어의 임의의 의미 또는 정의와 상충되는 한도 내에서, 본 명세서의 해당 용어에 지정된 의미 또는 정의가 적용될 것이다.

[0370] **다른 실시양태**

[0371] 본 개시내용의 특정 실시양태가 예시되고, 기술되었지만, 본 개시내용의 정신 및 범주로부터 벗어남 없이 다양하게 다른 변화 및 변형이 이루어질 수 있다. 첨부된 특허청구범위의 범주는 본 개시내용의 범주 내에 있는 상기와 같은 모든 변화 및 변형을 포함한다.

도면

도면1



P-BCMA-101

신호 펩티드 : MALPVTALLLPLALLLHAARP (서열 번호 3)

센티린 (A08):
MLPAPKNLVVSRITEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVVITGVKGGRF
SSPLVASFTT (서열 번호 41)

힌지 (CD8A): TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열 번호 10)

막관통 (CD8A): IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (서열 번호 4)

공자극 도메인#1 (4-1BB): KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열 번호 8)

공자극 도메인#2 (CD28):
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호 6)

P-BCMA-101 구성체 :

MALPVTALLLPLALLLHAARPMLPAPKNLVVSRITEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDL
TGLKPGTEYAVVITGVKGGRFSSPLVASFTTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호 42)

도면2

도면3a

P-BCMA-101

신호 펩타드: MALPVTALLLPLALLLHAARP (서열 번호 3)

셀티린 (A08):
MLPAPKNLVVSRITEDSARLSWTAPDAAFDSFPIRYIETLIWGEAIWLDVPGSERSYDLTGLKPGTEYAVVITGVKGGR
FSSPLVASFTT (서열 번호 43)

힌지(CD8A): TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열 번호 10)

막관통(CD8A): IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (서열 번호 4)

공자극 도메인(4-1BB): KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열 번호 8)

공자극 도메인#2 (CD28):
RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호 6)

도면3b

P-BCMA-101 CARTYRIN 구성체 :

ATGGCACTGCCAGTCACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCACGCAGCTAGACCAATGCTGCCTGCA

CCAAAGAACCTGGTGGTGAGCCGGATCACAGAGGACTCCGCCAGACTGTCTTGGACCGCCCCTGACGCCGCCTT

CGATTCCTTTCCAATCCGGTACATCGAGACACTGATCTGGGGCGAGGCCATCTGGCTGGACGTGCCCGGCTCTGAG

AGGAGCTACGATCTGACAGGCCTGGAAGCCTGGCACCGAGTATGCAGTGGTCATCACAGGAGTGAAGGGCGGCAG

GTTCAGCTCCCCTCTGGTGGCCTCTTTTACCACAACCACAACCCCTGCCCCCAGACCTCCCACACCCGCCCCTACC

ATCGCGAGTCAGCCCCTGAGTCTGAGACCTGAGGCCTGCAGGCCAGCTGCAGGAGGAGCTGTGCACACCAGGGG

CCTGGACTTCGCCTGCGACATCTACATTTGGGCACCACTGGCCGGGACCTGTGGAGTGCTGCTGCTGAGCCTGGT

CATCACACTGTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAACTGCTGTATATTTTCAAACAGCCCTTCATGCGCCCCGTGCA

GACTACCCAGGAGGAAGACGGGTGCTCCTGTCGATTCCCTGAGGAAGAGGAAGGCGGGTGTGAGCTGCGCGTGA

AGTTTAGTCGATCAGCAGATGCCCCAGCTTACAAACAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCC

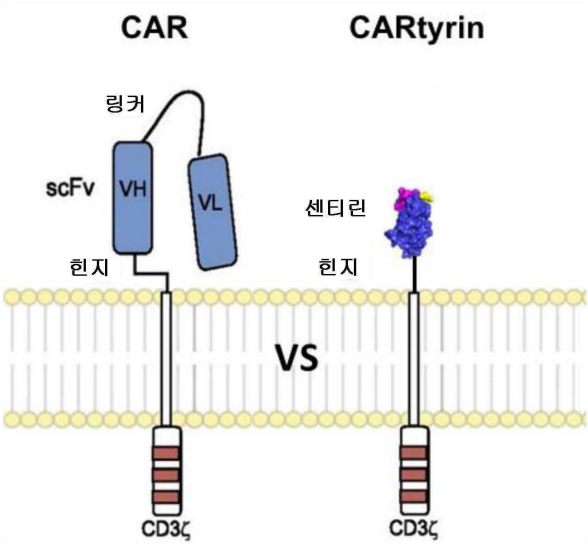
GCCGAGAGGAATATGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGACGCGACCCCGAAAATGGGAGGCAAGCCCAGGCGCAA

AAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCAGAAGCCTATTCTGAGATCGGCATGA

AGGGGGAGCGACGGAGAGGCAAAGGGCACGATGGCCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACAAAGGACACCTA

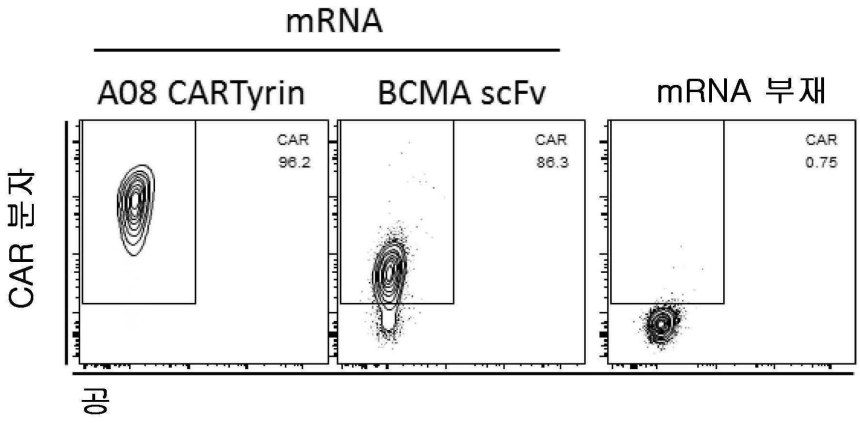
TGATGCTCTGCATATGCAGGCACTGCCTCCAAGG (서열 번호 44)

도면4

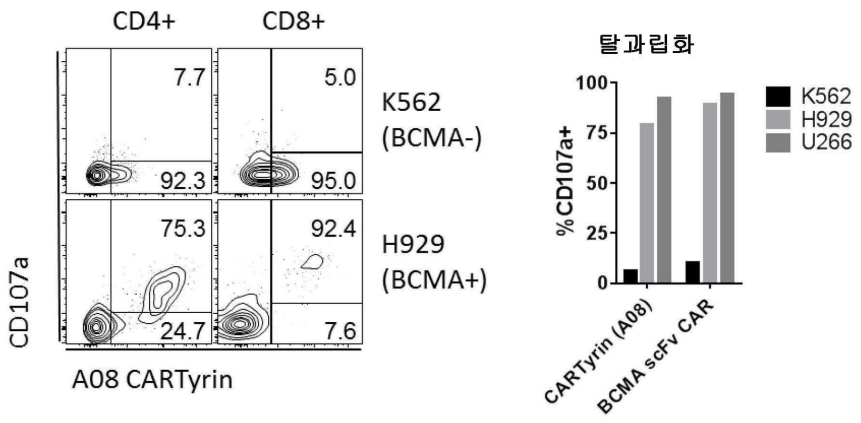


	scFv	센티린
크기:	~260 aa	~90 aa
성분:	중쇄&경쇄 가변 영역, 가요성 링커	피브로넥틴 타입 III 도메인
유래 기점:	주로 설치류 Ab	인간
안정성:	원래의 IgG 포맷만큼 안정하지 않음	안정적

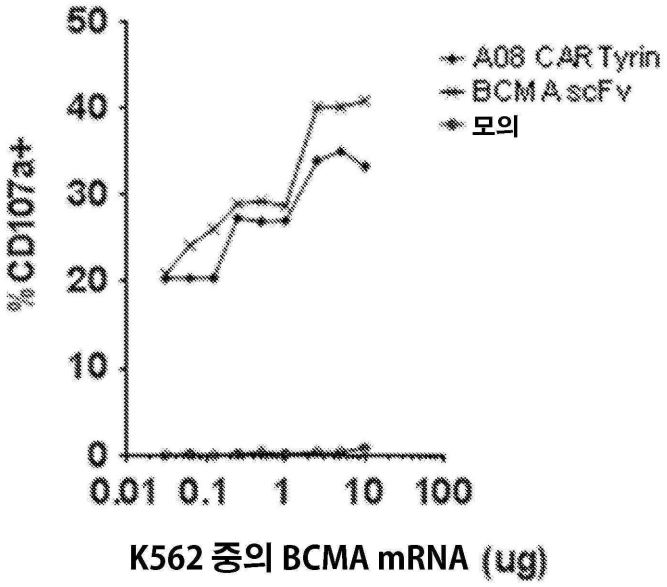
도면5a



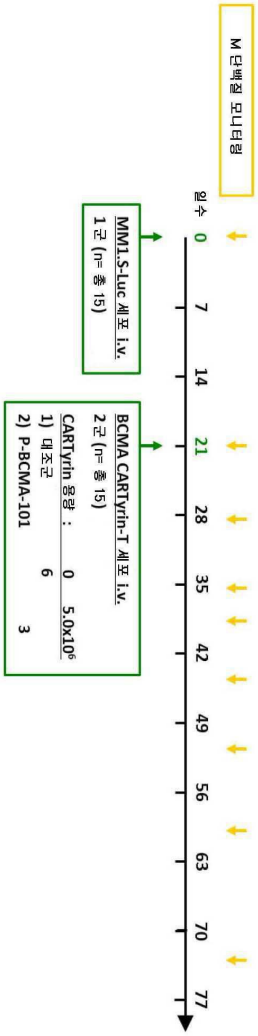
도면5b


CD4+
CD8+
7.7
5.0
92.3
95.0
K562
(BCMA-)
75.3
92.4
24.7
7.6
H929
(BCMA+)
CD107a
A08 CARTyrin
탈과립화
100
75
50
25
0
% CD107a+
K562
H929
U266
CARTyrin (A08)
BCMA scFv CAR

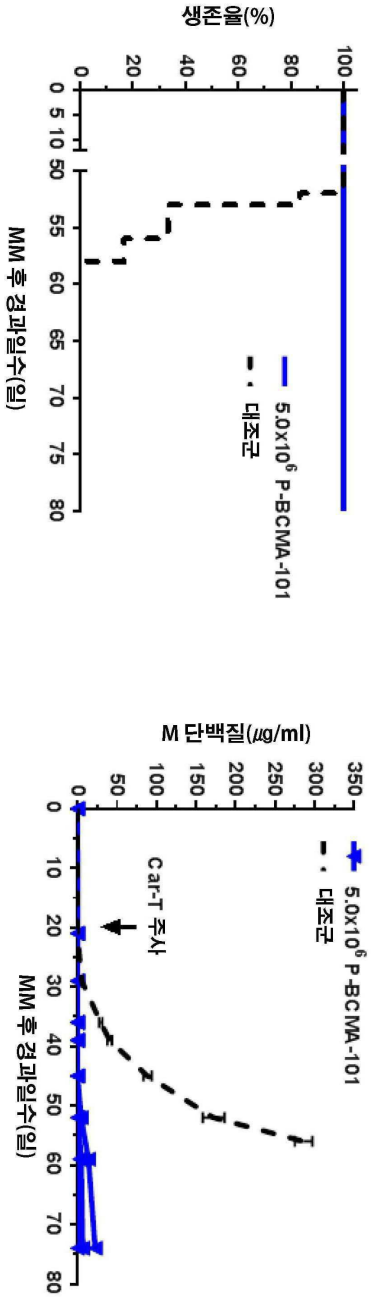
도면5c


50
40
30
20
10
0
% CD107a+
A08 CAR Tyrin
BCMA scFv
모의
0.01
0.1
1
10
100
K562 중의 BCMA mRNA (ug)

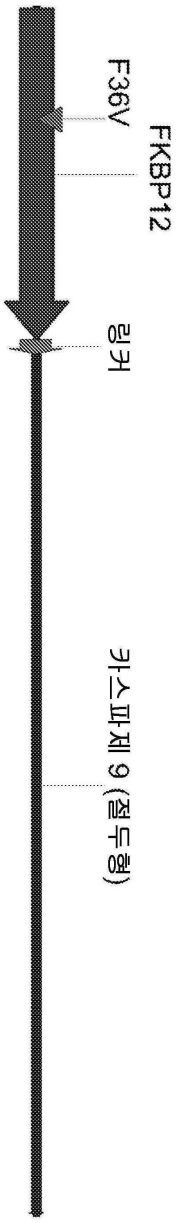
도면6


M 단백질 모니터링
일수
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
MM1.S-Luc 세포 i.v.
1군 (n= 총 15)
BCMA CARTyrin-T 세포 i.v.
2군 (n= 총 15)
CARTyrin 용량 : 0 5.0x10^6
1) 대조군 6
2) P-BCMA-101 3

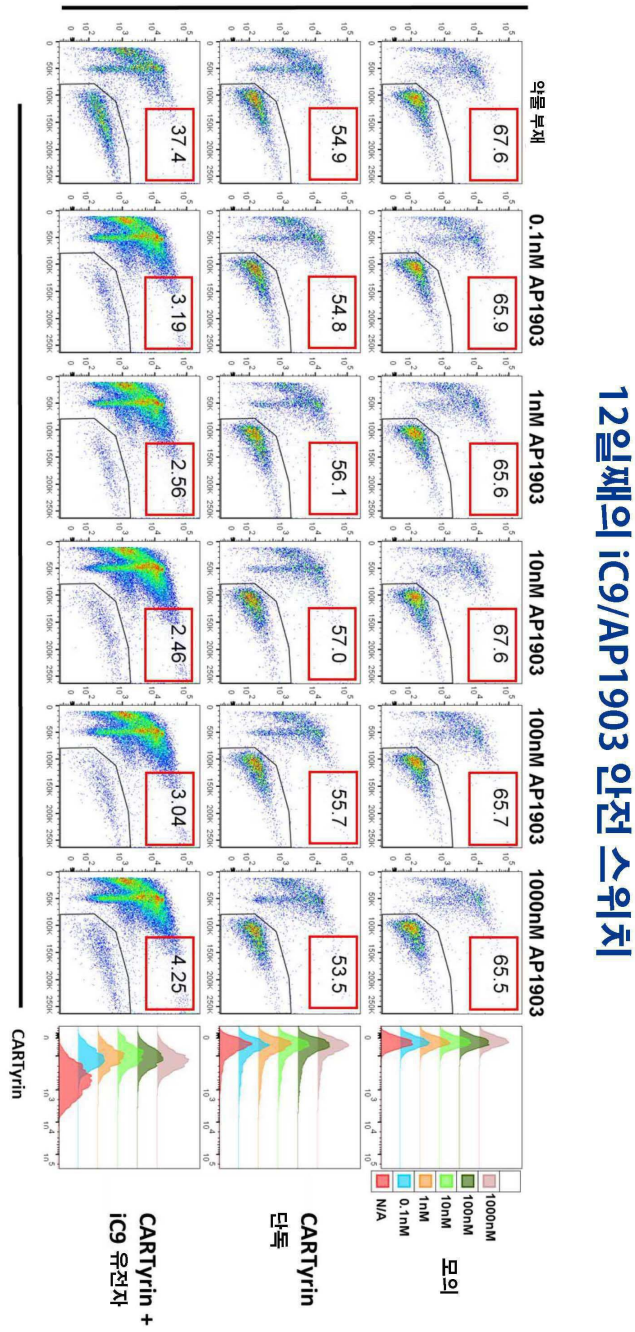
도면7


생존율(%)
MM 후 경과일수(일)
5.0x10^6 P-BCMA-101
대조군
M 단백질(μg/ml)
MM 후 경과일수(일)
Car-T 주사
5.0x10^6 P-BCMA-101
대조군

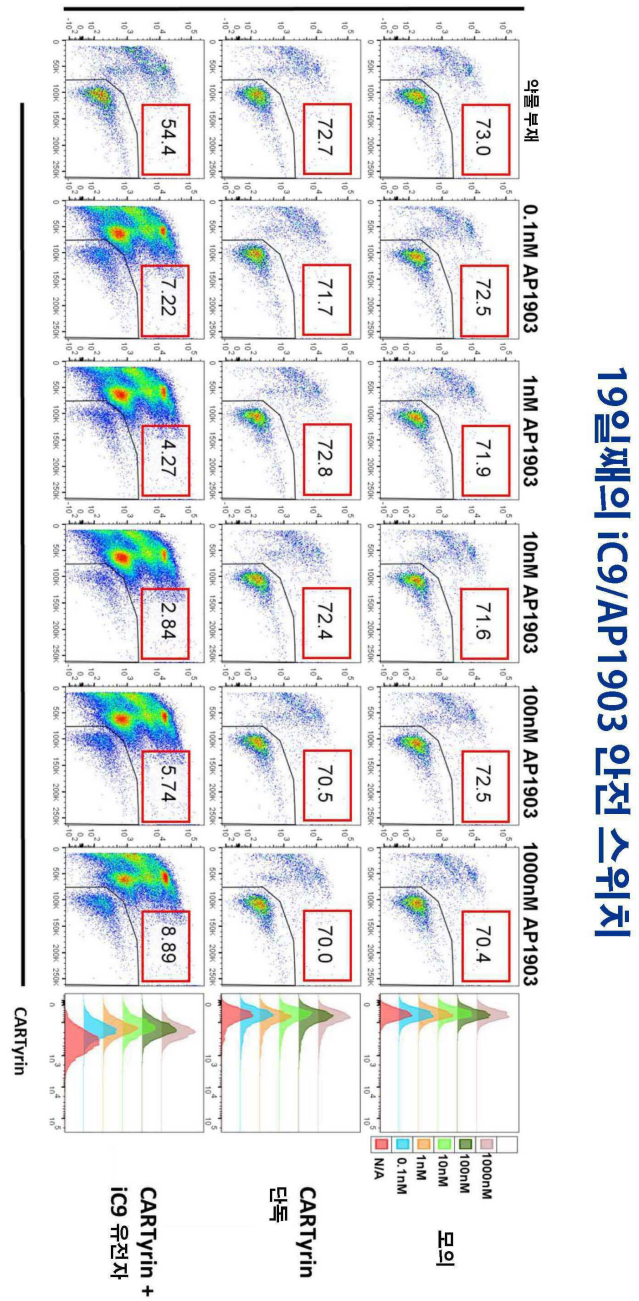
도면8



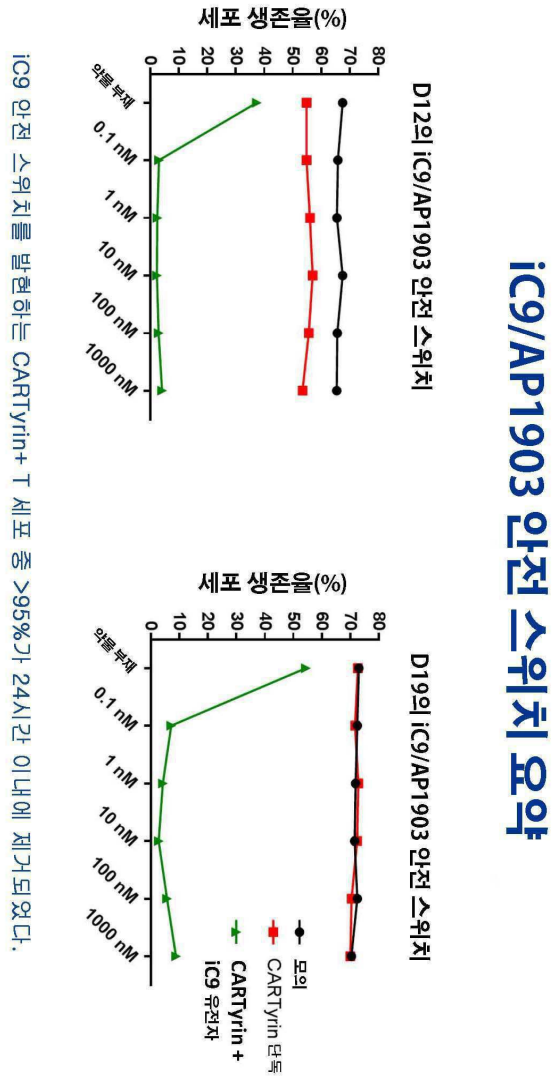
도면9


12일째의 iC9/AP1903 안전 스위치
약물 투제
0.1nM AP1903
1nM AP1903
10nM AP1903
100nM AP1903
1000nM AP1903
67.6
65.9
65.6
67.6
65.7
65.5
54.9
54.8
56.1
57.0
55.7
53.5
37.4
3.19
2.56
2.46
3.04
4.25
CARTyrin
모의
CARTyrin 단독
CARTyrin + iC9 유전자
1000nM
100nM
10nM
1nM
0.1nM
N/A

도면10


19일째의 iC9/AP1903 안전 스위치
약물 부재
0.1nM AP1903
1nM AP1903
10nM AP1903
100nM AP1903
1000nM AP1903
73.0
72.5
71.9
71.6
72.5
70.4
72.7
71.7
72.8
72.4
70.5
70.0
54.4
7.22
4.27
2.84
5.74
8.89
CARTyrin
모의
CARTyrin 단독
CARTyrin + iC9 유전자
N/A
0.1nM
1nM
10nM
100nM
1000nM

도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Poseida Therapeutics, Inc.

Ostertag, Eric

Shedlock, Devon

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS AND METHODS FOR USE

<130> POTH-008/001WO

<150> 62/503,127

<151> 2017-05-08

<150> 62/405,180

<151> 2016-10-06

<150> 62/362,746

<151> 2016-07-15

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser

1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu

20 25 30

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

35 40 45

Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly

50 55 60

Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser

65 70 75 80

Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr

85

<210> 2

<211> 594

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> piggybac transposase

<400> 2

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln

1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Val Ser Asp

20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile

35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60
Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80
Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110
Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125
Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140
Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Ser Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175
Tyr Ala Phe Phe Gly Ile Leu Val Met Thr Ala Val Arg Lys Asp Asn
180 185 190
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
195 200 205
Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
210 215 220

Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225 230 235 240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
245 250 255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
260 265 270
Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Val Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
275 280 285

Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Thr Lys

290 295 300

Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305 310 315 320

Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
325 330 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
340 345 350

Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
355 360 365

Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
370 375 380

Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385 390 395 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
405 410 415

Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
420 425 430

Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480

Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495

Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510

Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

Arg Asp Asn Ile Ser Asn Ile Leu Pro Lys Glu Val Pro Gly Thr Ser
530 535 540

Asp Asp Ser Thr Glu Glu Pro Val Met Lys Lys Arg Thr Tyr Cys Thr

545 550 555 560

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

565 570 575

Cys Lys Lys Val Ile Cys Arg Glu His Asn Ile Asp Met Cys Gln Ser

580 585 590

Cys Phe

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 5

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

atctacattt gggcaccact ggccgggacc tgtggagtgc tgctgctgag cctggtcatc 60

acactgtact gc 72

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cgcgtgaagt ttagtcgatc agcagatgcc ccagcttaca aacagggaca gaaccagctg 60

tataacgagc tgaatctggg ccgccgagag gaatatgacg tgctggataa gcggagagga 120

cgcgaccccg aaatgggagg caagcccagg cgcaaaaacc ctcaggaagg cctgtataac 180

gagctgcaga aggacaaaat ggcagaagcc tattctgaga tcggcatgaa gggggagcga 240

cggagaggca aagggcacga tgggctgtac cagggactga gcaccgccac aaaggacacc 300

tatgatgctc tgcatatgca ggcactgcct ccaagg 336

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 9

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aagagaggca ggaagaaact gctgtatatt ttcaaacagc ccttcatgcg ccccgtgcag 60

actacccagg aggaagacgg gtgctcctgt cgattccctg aggaagagga aggcgggtgt 120

gagctg 126

<210> 10

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 11

<211> 135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

actaccacac cagcacctag accaccaact ccagctccaa ccatcgcgag tcagcccctg 60

agtctgagac ctgaggcctg caggccagct gcaggaggag ctgtgcacac caggggcctg 120

gacttcgcct gcgac 135

<210> 12

<211> 594

<212> PRT

<213> Trichoplusia ni

<400> 12

Met Gly Ser Ser Leu Asp Asp Glu His Ile Leu Ser Ala Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Glu Leu Val Gly Glu Asp Ser Asp Ser Glu Ile Ser Asp
20 25 30

His Val Ser Glu Asp Asp Val Gln Ser Asp Thr Glu Glu Ala Phe Ile
35 40 45

Asp Glu Val His Glu Val Gln Pro Thr Ser Ser Gly Ser Glu Ile Leu
50 55 60

Asp Glu Gln Asn Val Ile Glu Gln Pro Gly Ser Ser Leu Ala Ser Asn
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Leu Pro Gln Arg Thr Ile Arg Gly Lys Asn Lys His
85 90 95

Cys Trp Ser Thr Ser Lys Ser Thr Arg Arg Ser Arg Val Ser Ala Leu
100 105 110

Asn Ile Val Arg Ser Gln Arg Gly Pro Thr Arg Met Cys Arg Asn Ile
115 120 125

Tyr Asp Pro Leu Leu Cys Phe Lys Leu Phe Phe Thr Asp Glu Ile Ile
130 135 140

Ser Glu Ile Val Lys Trp Thr Asn Ala Glu Ile Ser Leu Lys Arg Arg
145 150 155 160

Glu Ser Met Thr Gly Ala Thr Phe Arg Asp Thr Asn Glu Asp Glu Ile
165 170 175

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

```
His Met Ser Thr Asp Asp Leu Phe Asp Arg Ser Leu Ser Met Val Tyr
        195                 200                 205

Val Ser Val Met Ser Arg Asp Arg Phe Asp Phe Leu Ile Arg Cys Leu
    210                 215                 220
Arg Met Asp Asp Lys Ser Ile Arg Pro Thr Leu Arg Glu Asn Asp Val
225                 230                 235                 240
Phe Thr Pro Val Arg Lys Ile Trp Asp Leu Phe Ile His Gln Cys Ile
                245                 250                 255
Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Ala His Leu Thr Ile Asp Glu Gln Leu Leu
            260                 265                 270

Gly Phe Arg Gly Arg Cys Pro Phe Arg Met Tyr Ile Pro Asn Lys Pro
        275                 280                 285
Ser Lys Tyr Gly Ile Lys Ile Leu Met Met Cys Asp Ser Gly Tyr Lys
    290                 295                 300
Tyr Met Ile Asn Gly Met Pro Tyr Leu Gly Arg Gly Thr Gln Thr Asn
305                 310                 315                 320
Gly Val Pro Leu Gly Glu Tyr Tyr Val Lys Glu Leu Ser Lys Pro Val
                325                 330                 335

His Gly Ser Cys Arg Asn Ile Thr Cys Asp Asn Trp Phe Thr Ser Ile
            340                 345                 350
Pro Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Glu Pro Tyr Lys Leu Thr Ile Val
        355                 360                 365
Gly Thr Val Arg Ser Asn Lys Arg Glu Ile Pro Glu Val Leu Lys Asn
    370                 375                 380
Ser Arg Ser Arg Pro Val Gly Thr Ser Met Phe Cys Phe Asp Gly Pro
385                 390                 395                 400

Leu Thr Leu Val Ser Tyr Lys Pro Lys Pro Ala Lys Met Val Tyr Leu
                405                 410                 415
Leu Ser Ser Cys Asp Glu Asp Ala Ser Ile Asn Glu Ser Thr Gly Lys
            420                 425                 430
Pro Gln Met Val Met Tyr Tyr Asn Gln Thr Lys Gly Gly Val Asp Thr
```

435 440 445

Leu Asp Gln Met Cys Ser Val Met Thr Cys Ser Arg Lys Thr Asn Arg
450 455 460

Trp Pro Met Ala Leu Leu Tyr Gly Met Ile Asn Ile Ala Cys Ile Asn
465 470 475 480
Ser Phe Ile Ile Tyr Ser His Asn Val Ser Ser Lys Gly Glu Lys Val
485 490 495
Gln Ser Arg Lys Lys Phe Met Arg Asn Leu Tyr Met Ser Leu Thr Ser
500 505 510
Ser Phe Met Arg Lys Arg Leu Glu Ala Pro Thr Leu Lys Arg Tyr Leu
515 520 525

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

Cys Phe

<210> 13
<211> 90
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13
Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe
20 25 30
Leu Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu
35 40 45

Thr Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg

65 70 75 80

Ser Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr

85 90

<210> 14

<211> 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FN3 domain consensus sequence

<400> 14

atgctgcctg caccaaagaa cctggtggtg tctcatgtga cagaggatag tgccagactg 60

tcatggactg ctcccgacgc agccttcgat agttttatca tcgtgtaccg ggagaacatc 120

gaaaccggcg aggccattgt cctgacagtg ccagggtccg aacgctctta tgacctgaca 180

gatctgaagc ccggaactga gtactatgtg cagatcgccg gcgtcaaagg aggcaatatc 240

agcttccctc tgtccgcaat cttcaccaca 270

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 concensus sequence

<400> 15

Thr Glu Asp Ser

1

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 16

Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain concensus

<400> 17

Ser Glu Lys Val Gly Glu

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 18

Gly Ser Glu Arg

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 19

Gly Leu Lys Pro Gly

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modification of FN3 domain consensus

<400> 20

Lys Gly Gly His Arg Ser Asn

1 5

<210> 21

<211> 958

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 21

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe
1 5 10 15

Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu

20 25 30

Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys
35 40 45

Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val
50 55 60

Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp
65 70 75 80

Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala

85 90 95

Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala
115 120 125

Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile
130 135 140

Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr

145 150 155 160

Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu
165 170 175

His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val
180 185 190

Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys
195 200 205

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

210 215 220

Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu

225 230 235 240

Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly

245 250 255

Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp

260 265 270

His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly

275 280 285

Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr

290 295 300

Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile

305 310 315 320

Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro

325 330 335

Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln

340 345 350

Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn

355 360 365

Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn

370 375 380

Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser Gly Ser Gly Glu Gly

385 390 395 400

Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

405 410 415

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

420 425 430

His Ala Ala Arg Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser

435 440 445

Arg Ile Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala

450 455 460

Ala Phe Asp Ser Phe Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly

465 470 475 480

Glu Ala Ile Trp Leu Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu

485 490 495

Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val

500 505 510

Lys Gly Gly Arg Phe Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr Thr

515 520 525

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

530 535 540

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

545 550 555 560

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp

565 570 575

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile

580 585 590

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

595 600 605

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys

610 615 620

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

625 630 635 640

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn

645 650 655

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

660 665 670

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

675 680 685

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

690 695 700

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
705 710 715 720
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

725 730 735
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser
740 745 750
Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn
755 760 765
Pro Gly Pro Met Val Gly Ser Leu Asn Cys Ile Val Ala Val Ser Gln
770 775 780
Asn Met Gly Ile Gly Lys Asn Gly Asp Phe Pro Trp Pro Pro Leu Arg

785 790 795 800
Asn Glu Ser Arg Tyr Phe Gln Arg Met Thr Thr Thr Ser Ser Val Glu
805 810 815
Gly Lys Gln Asn Leu Val Ile Met Gly Lys Lys Thr Trp Phe Ser Ile
820 825 830
Pro Glu Lys Asn Arg Pro Leu Lys Gly Arg Ile Asn Leu Val Leu Ser
835 840 845
Arg Glu Leu Lys Glu Pro Pro Gln Gly Ala His Phe Leu Ser Arg Ser

850 855 860
Leu Asp Asp Ala Leu Lys Leu Thr Glu Gln Pro Glu Leu Ala Asn Lys
865 870 875 880
Val Asp Met Val Trp Ile Val Gly Gly Ser Ser Val Tyr Lys Glu Ala
885 890 895
Met Asn His Pro Gly His Leu Lys Leu Phe Val Thr Arg Ile Met Gln
900 905 910
Asp Phe Glu Ser Asp Thr Phe Phe Pro Glu Ile Asp Leu Glu Lys Tyr

915 920 925
Lys Leu Leu Pro Glu Tyr Pro Gly Val Leu Ser Asp Val Gln Glu Glu
930 935 940
Lys Gly Ile Lys Tyr Lys Phe Glu Val Tyr Glu Lys Asn Asp

945 950 955

<210> 22

<211> 2874

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 22

atgggggtcc aggtcgagac tatttcacca ggggatgggc gaacatttcc aaaaaggggc 60

cagacttgcg tcgtgcatta caccgggatg ctggaggacg ggaagaaagt ggacagctcc 120

agggatcgca acaagccctt caagttcatg ctgggaaagc aggaagtgat ccgaggatgg 180

gaggaaggcg tggcacagat gtcagtcggc cagcgggcca aactgaccat tagccctgac 240

tacgcttatg gagcaacagg ccacccaggg atcattcccc ctcatgccac cctggtcttc 300

gatgtggaac tgctgaagct ggagggagga ggaggatccg gatttgggga cgtgggggcc 360

ctggagtctc tgcgaggaaa tgccgatctg gcttacatcc tgagcatgga accctgcggc 420

cactgtctga tcattaacaa tgtgaacttc tgcagagaaa gcggactgcg aacacggact 480

ggctccaata ttgactgtga gaagctgcgg agaaggttct ctagtctgca ctttatggtc 540

gaagtgaaag gggatctgac cgccaagaaa atggtgctgg ccctgctgga gctggctcag 600

caggaccatg gagctctgga ttgctgcgtg gtcgtgatcc tgtcccacgg gtgccaggct 660

tctcatctgc agttccccgg agcagtgtac ggaacagacg gctgtcctgt cagcgtggag 720

aagatcgtca acatcttcaa cggcacttct tgccctagtc tgggggggaaa gccaaaactg 780

ttctttatcc aggcctgtgg cggggaacag aaagatcacg gcttcgaggt ggccagcacc 840

agccctgagg acgaatcacc agggagcaac cctgaaccag atgcaactcc attccaggag 900

ggactgagga cctttgacca gctggatgct atctcaagcc tgcccactcc tagtgacatt 960

ttcgtgtctt acagtacctt cccaggcttt gtctcatggc gcgatcccaa gtcagggagc 1020

tggtacgtgg agacactgga cgacatcttt gaacagtggg cccattcaga ggacctgcag 1080

agcctgctgc tgcgagtggc aaacgctgtc tctgtgaagg gcatctacaa acagatgccc 1140

gggtgcttca attttctgag aaagaaactg ttctttaaga cttccggatc tggagaggga 1200

aggggaagcc tgctgacctg tggagacgtg gaggaaaacc caggaccaat ggcactgcca 1260

gtcaccgccc tgctgctgcc tctggctctg ctgctgcacg cagctagacc aatgctgcct 1320

gcaccaaaga acctggtggt gagccggatc acagaggact ccgccagact gtcttggacc 1380

gcccctgacg ccgccttcga ttcctttcca atccggtaca tcgagacact gatctggggc 1440

gaggccatct ggctggacgt gcccggctct gagaggagct acgatctgac aggcctgaag 1500

cctggcaccg agtatgcagt ggtcatcaca ggagtgaagg gcggcaggtt cagctcccct 1560

ctggtggcct cttttaccac aaccacaacc cctgccccca gacctcccac acccgccccc 1620

accatcgcga gtcagcccct gagtctgaga cctgaggcct gcaggccagc tgcaggagga 1680

gctgtgcaca ccaggggcct ggacttcgcc tgcgacatct acatttgggc accactggcc 1740

gggacctgtg gagtgctgct gctgagcctg gtcatcacac tgtactgcaa gagaggcagg 1800

aagaaactgc tgtatatttt caaacagccc ttcatgcgcc ccgtgcagac tacccaggag 1860

gaagacgggt gctcctgtcg attccctgag gaagaggaag gcgggtgtga gctgcgcgtg 1920

aagtttagtc gatcagcaga tgccccagct tacaaacagg gacagaacca gctgtataac 1980

gagctgaatc tgggccgccg agaggaatat gacgtgctgg ataagcggag aggacgcgac 2040

cccgaaatgg gaggcaagcc caggcgcaaa aaccctcagg aaggcctgta taacgagctg 2100

cagaaggaca aaatggcaga agcctattct gagatcggca tgaaggggga gcgacggaga 2160

ggcaaagggc acgatgggct gtaccaggga ctgagcaccg ccacaaagga cacctatgat 2220

gctctgcata tgcaggcact gcctccaagg ggaagtggag aaggacgagg atcactgctg 2280

acatgcggcg acgtggagga aaaccctggc ccaatggtcg ggtctctgaa ttgtatcgtc 2340

gccgtgagtc agaacatggg cattgggaag aatggcgatt tcccatggcc acctctgcgc 2400

aacgagtccc gatactttca gcggatgaca actacctcct ctgtggaagg gaaacagaat 2460

ctggtcatca tgggaaagaa aacttggttc agcattccag agaagaaccg gcccctgaaa 2520

ggcagaatca atctggtgct gtcccgagaa ctgaaggagc caccacaggg agctcacttt 2580

ctgagccggt ccctggacga tgcactgaag ctgacagaac agcctgagct ggccaacaaa 2640

gtcgatatgg tgtggatcgt cgggggaagt tcagtgtata aggaggccat gaatcacccc 2700

ggccatctga aactgttcgt cacacggatc atgcaggact ttgagagcga tactttcttt 2760

cctgaaattg acctggagaa gtacaaactg ctgcccgaat atcctggcgt gctgtccgat 2820

gtccaggaag agaaaggcat caaatacaag ttcgaggtct atgagaagaa tgac 2874

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP12 polypeptide

<400> 23

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro

1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp
20 25 30
Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45
Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60
Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
85 90 95
Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
100 105

<210> 24
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FKBP12 polypeptide
<400> 24
ggggtccagg tcgagactat ttcaccaggg gatgggcgaa catttccaaa aaggggccag 60
acttgcgtcg tgcattacac cgggatgctg gaggacggga agaaagtgga cagctccagg 120
gatcgcaaca agcccttcaa gttcatgctg ggaaagcagg aagtgatccg aggatgggag 180

gaaggcgtgg cacagatgtc agtcggccag cgggccaaac tgaccattag ccctgactac 240
gcttatggag caacaggcca cccagggatc attccccctc atgccaccct ggtcttcgat 300
gtggaactgc tgaagctgga g 321
<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> linker
<400> 25
Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 26

ggaggaggag gatcc 15

<210> 27

<211> 281

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> truncated caspase 9

<400> 27

Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp
1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ile Ser Leu Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile
20 25 30

Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly
35 40 45

Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His

50 55 60

Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu
65 70 75 80

Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys
85 90 95

Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe
100 105 110

Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys

115 120 125

Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys
130 135 140

Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His
145 150 155 160
Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser
165 170 175
Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe

180 185 190
Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe
195 200 205
Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys
210 215 220
Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp
225 230 235 240
Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala

245 250 255
Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Asn Phe Leu
260 265 270
Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser
275 280

<210> 28
<211> 843
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> truncated caspase 9
<400> 28

tttggggacg tgggggccct ggagtctctg cgaggaaatg ccgatctggc ttacatcctg 60
agcatggaac cctgcggcca ctgtctgatc attaacaatg tgaacttctg cagagaaagc 120

ggactgcgaa cacggactgg ctccaatatt gactgtgaga agctgcggag aaggttctct 180
agtctgcact ttatggtcga agtgaaaggg gatctgaccg ccaagaaaat ggtgctggcc 240
ctgctggagc tggctcagca ggaccatgga gctctggatt gctgcgtggt cgtgatcctg 300
tcccacgggt gccaggcttc tcatctgcag ttccccggag cagtgtacgg aacagacggc 360
tgtcctgtca gcgtggagaa gatcgtcaac atcttcaacg gcacttcttg ccctagtctg 420
gggggaaagc caaaactgtt ctttatccag gcctgtggcg gggaacagaa agatcacggc 480

ttcgaggtgg ccagcaccag ccctgaggac gaatcaccag ggagcaaccc tgaaccagat 540

gcaactccat tccaggaggg actgaggacc tttgaccagc tggatgctat ctcaagcctg 600

cccactccta gtgacatttt cgtgtcttac agtaccttcc caggctttgt ctcatggcgc 660

gatcccaagt cagggagctg gtacgtggag acactggacg acatctttga acagtgggcc 720

cattcagagg acctgcagag cctgctgctg cgagtggcaa acgctgtctc tgtgaagggc 780

atctacaaac agatgcccgg gtgcttcaat tttctgagaa agaaactgtt ctttaagact 840

tcc 843

<210> 29

<211> 394

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> inducible proapoptotic polypeptide

<400> 29

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro
1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp
20 25 30

Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala
115 120 125

Asp Leu Ala Tyr Ile Ser Leu Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile
130 135 140

Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr
145 150 155 160
Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu
165 170 175
His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val

180 185 190
Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys
195 200 205
Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln
210 215 220
Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu
225 230 235 240
Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly

245 250 255
Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp
260 265 270
His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly
275 280 285
Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr
290 295 300
Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile

305 310 315 320
Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro
325 330 335
Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln
340 345 350
Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn
355 360 365
Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Asn Phe

370 375 380
Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser

385 390

<210> 30

<211> 1182

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> inducible proapoptotic polypeptide

<400> 30

ggggtccagg tcgagactat ttcaccaggg gatgggcgaa catttccaaa aaggggccag 60

acttgcgtcg tgcattacac cgggatgctg gaggacggga agaaagtgga cagctccagg 120

gatcgcaaca agcccttcaa gttcatgctg ggaaagcagg aagtgatccg aggatgggag 180

gaaggcgtgg cacagatgtc agtcggccag cgggccaaac tgaccattag ccctgactac 240

gcttatggag caacaggcca cccagggatc attccccctc atgccaccct ggtcttcgat 300

gtggaactgc tgaagctgga gggaggagga ggatccgaat ttggggacgt gggggccctg 360

gagtctctgc gaggaaatgc cgatctggct tacatcctga gcatggaacc ctgcggccac 420

tgtctgatca ttaacaatgt gaacttctgc agagaaagcg gactgcgaac acggactggc 480

tccaatattg actgtgagaa gctgcggaga aggttctcta gtctgcactt tatggtcgaa 540

gtgaaagggg atctgaccgc caagaaaatg gtgctggccc tgctggagct ggctcagcag 600

gaccatggag ctctggattg ctgcgtggtc gtgatcctgt cccacgggtg ccaggcttct 660

catctgcagt tccccggagc agtgtacgga acagacggct gtcctgtcag cgtggagaag 720

atcgtcaaca tcttcaacgg cacttcttgc cctagtctgg ggggaaagcc aaaactgttc 780

tttatccagg cctgtggcgg ggaacagaaa gatcacggct tcgaggtggc cagcaccagc 840

cctgaggacg aatcaccagg gagcaaccct gaaccagatg caactccatt ccaggaggga 900

ctgaggacct ttgaccagct ggatgctatc tcaagcctgc ccactcctag tgacattttc 960

gtgtcttaca gtaccttccc aggctttgtc tcatggcgcg atcccaagtc agggagctgg 1020

tacgtggaga cactggacga catctttgaa cagtgggccc attcagagga cctgcagagc 1080

ctgctgctgc gagtggcaaa cgctgtctct gtgaagggca tctacaaaca gatgcccggg 1140

tgcttcaatt ttctgagaaa gaaactgttc tttaagactt cc 1182

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Thosea asigna virus

<400> 31

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-T2A

<400> 32

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

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 33

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-T2A

<400> 33

ggatctggag agggaagggg aagcctgctg acctgtggag acgtggagga aaacccagga 60

cca 63

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Equine rhinitis A

<400> 34

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-G2A

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> FMDV-O

<400> 36

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 37

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-F2A

<400> 37

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20 25

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Porcine Teschovirus

<400> 38

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 39

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GSG-P2A

<400> 39

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 40

<211> 4897

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PB-EF1a vector

<400> 40

tgtacataga ttaaccctag aaagataatc atattgtgac gtacgttaaa gataatcatg 60

cgtaaaattg acgcatgtgt tttatcggtc tgtatatcga ggtttattta ttaatttgaa 120

tagatattaa gttttattat atttacactt acatactaat aataaattca acaaacaatt 180

tatttatgtt tatttattta ttaaaaaaaa acaaaaactc aaaatttctt ctataaagta 240

acaaaacttt tatcgaatac ctgcagcccg ggggatgcag agggacagcc ccccccaaa 300

gcccccaggg atgtaattac gtccctcccc cgctaggggg cagcagcgag ccgcccgggg 360

ctccgctccg gtccggcgct cccccccgcat ccccgagccg gcagcgtgcg gggacagccc 420

gggcacgggg aaggtggcac gggatcgctt tcctctgaac gcttctcgct gctctttgag 480

cctgcagaca cctgggggga tacggggaaa agttgactgt gcctttcgat cgaaccatgg 540

acagttagct ttgcaaagat ggataaagtt ttaaacagag aggaatcttt gcagctaatg 600

gaccttctag gtcttgaaag gagtgggaat tggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg 660

cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta 720

gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccttttttcc 780

cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa 840

cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt 900

tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacc tggctgcagt acgtgattct 960

tgatcccgag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg cttaaggagc 1020

cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat 1080

ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 1140

ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga 1200

tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca 1260

gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg agcgcggcca ccgagaatcg gacgggggta 1320

gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 1380

ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc 1440

cggccctgct gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 1500

gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac 1560

ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc 1620

tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat ggagtttccc cacactgagt gggtggagac 1680

tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1740

tggatcttgg ttcattctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttccatttca 1800

ggtgtcgtga gaattctaat acgactcact atagggtgtg ctgtctcatc attttggcaa 1860

agattggcca ccaagcttgt cctgcaggag ggtcgacgcc tctagacggg cggccgctcc 1920

ggatccacgg gtaccgatca catatgcctt taattaaaca ctagttctat agtgtcacct 1980

aaattccctt tagtgagggt taatggccgt aggccgccag aattgggtcc agacatgata 2040

agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt 2100

tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt 2160

aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt 2220

tcggactcta ggacctgcgc atgcgcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgttt 2280

tccccgtatc cccccaggtg tctgcaggct caaagagcag cgagaagcgt tcagaggaaa 2340

gcgatcccgt gccaccttcc ccgtgcccgg gctgtccccg cacgctgccg gctcggggat 2400

gcgggggggag cgccggaccg gagcggagcc ccgggcggct cgctgctgcc ccctagcggg 2460

ggagggacgt aattacatcc ctgggggctt tgggggggggg ctgtccctct caccgcggtg 2520

gagctccagc ttttgttcga attggggccc cccctcgagg gtatcgatga tatctataac 2580

aagaaaatat atatataata agttatcacg taagtagaac atgaaataac aatataatta 2640

tcgtatgagt taaatcttaa aagtcacgta aaagataatc atgcgtcatt ttgactcacg 2700
cggtcgttat agttcaaaat cagtgacact taccgcattg acaagcacgc ctcacgggag 2760
ctccaagcgg cgactgagat gtcctaaatg cacagcgacg gattcgcgct atttagaaag 2820
agagagcaat atttcaagaa tgcatgcgtc aattttacgc agactatctt tctagggtta 2880
atctagctag ccttaagggc gcctattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga 2940
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 3000
attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg 3060

cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 3120
gcaggaaaga acatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 3180
cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 3240
ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca 3300
actcttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 3360
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct 3420
ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3480

gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc 3540
acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta 3600
tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 3660
gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 3720
cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcaggggggg 3780
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gccttttac ggttcctggc cttttgctgg 3840
ccttttgctc acatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3900

tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag tcagaagaac 3960
tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg gagcggcgat accgtaaagc 4020
acgaggaagc ggtcagccca ttcgccgcca agctcttcag caatatcacg ggtagccaac 4080
gctatgtcct gatagcggtc cgccacaccc agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag 4140
cggccatttt ccaccatgat attcggcaag caggcatcgc catgggtcac gacgagatcc 4200
tcgccgtcgg gcatgctcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggctggcgc gagcccctga 4260
tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggctt ccatccgagt acgtgctcgc 4320

tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccggatcaag cgtatgcagc 4380

cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaaggtg agatgacagg 4440

agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtccc ttcccgcttc agtgacaacg 4500

tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg 4560

tcttgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc 4620

tgcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtca 4680

tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca 4740

atcataatat tattgaagca tttatcaggg ttcgtctcgt cccggtctcc tcccaatgca 4800

tgtcaatatt ggccattagc catattattc attggttata tagcataaat caatattggc 4860

tattggccat tgcatacgtt gtatctatat cataata 4897

<210> 41

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Centyrin

<400> 41

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val Lys Gly Gly Arg Phe

65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr

85 90

<210> 42

<211> 334

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 42

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser
20 25 30
Arg Ile Thr Glu Asp Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala
35 40 45
Ala Phe Asp Ser Phe Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly

50 55 60
Glu Ala Ile Trp Leu Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu
65 70 75 80
Thr Gly Leu Lys Pro Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val
85 90 95
Lys Gly Gly Arg Phe Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr Thr
100 105 110
Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

115 120 125
Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly
130 135 140
Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp
145 150 155 160
Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile
165 170 175
Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys

180 185 190
Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
195 200 205
Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
210 215 220
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn
225 230 235 240

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val

245 250 255

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

260 265 270

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

275 280 285

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

290 295 300

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

305 310 315 320

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

325 330

<210> 43

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Centyrin

<400> 43

Met Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Arg Ile Thr Glu Asp

1 5 10 15

Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe

20 25 30

Pro Ile Arg Tyr Ile Glu Thr Leu Ile Trp Gly Glu Ala Ile Trp Leu

35 40 45

Asp Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro

50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Ala Val Val Ile Thr Gly Val Lys Gly Gly Arg Phe

65 70 75 80

Ser Ser Pro Leu Val Ala Ser Phe Thr Thr

85 90

<210> 44

<211> 1002

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CARTyrin

<400> 44

atggcactgc cagtcaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgcagctaga 60

ccaatgctgc ctgcaccaaa gaacctggtg gtgagccgga tcacagagga ctccgccaga 120

ctgtcttgga ccgcccctga cgccgccttc gattcctttc caatccggta catcgagaca 180

ctgatctggg gcgaggccat ctggctggac gtgcccggct ctgagaggag ctacgatctg 240

acaggcctga agcctggcac cgagtatgca gtggtcatca caggagtgaa gggcggcagg 300

ttcagctccc ctctggtggc ctcttttacc acaaccacaa cccctgcccc cagacctccc 360

acacccgccc ctaccatcgc gagtcagccc ctgagtctga gacctgaggc ctgcaggcca 420

gctgcaggag gagctgtgca caccaggggc ctggacttcg cctgcgacat ctacatttgg 480

gcaccactgg ccgggacctg tggagtgctg ctgctgagcc tggtcatcac actgtactgc 540

aagagaggca ggaagaaact gctgtatatt ttcaaacagc ccttcatgcg ccccgtgcag 600

actacccagg aggaagacgg gtgctcctgt cgattccctg aggaagagga aggcgggtgt 660

gagctgcgcg tgaagtttag tcgatcagca gatgccccag cttacaaaca gggacagaac 720

cagctgtata acgagctgaa tctgggccgc cgagaggaat atgacgtgct ggataagcgg 780

agaggacgcg accccgaaat gggaggcaag cccaggcgca aaaaccctca ggaaggcctg 840

tataacgagc tgcagaagga caaaatggca gaagcctatt ctgagatcgg catgaagggg 900

gagcgacgga gaggcaaagg gcacgatggg ctgtaccagg gactgagcac cgccacaaag 960

gacacctatg atgctctgca tatgcaggca ctgcctccaa gg 1002

<210> 45

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

atggcactgc cagtcaccgc cctgctgctg cctctggctc tgctgctgca cgcagctaga 60

cca 63