



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월14일

(11) 등록번호 10-2601849

(24) 등록일자 2023년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 9/64* (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12N 9/6472* (2013.01)  
*A61K 31/436* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-7025985  
(22) 출원일자(국제) 2016년02월23일  
심사청구일자 2021년02월19일  
(85) 번역문제출일자 2017년09월14일  
(65) 공개번호 10-2017-0117555  
(43) 공개일자 2017년10월23일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2016/050451  
(87) 국제공개번호 WO 2016/135470  
국제공개일자 2016년09월01일  
(30) 우선권주장  
1503133.9 2015년02월24일 영국(GB)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020140031484 A\*  
US20040040047 A1\*  
CHEMICAL REVIEWS, vol.110, no. 6,  
pp3315-3336(2010.06.09.)  
WO2014197638 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**오토러스 리미티드**  
영국 런던 191 우드 레인 더 미디어웍스 (우편번호: 더블유12 7에프피)  
(72) 발명자  
**플레 마틴**  
영국 더블유12 7알피 런던 테포 로드 포레스트 하우스 오토러스 리미티드 내  
**트로브리지 라이언**  
영국 더블유1티 4티피 런던 토트넘 코트 로드 97 더 네트워크 빌딩 유씨엘 비즈니스 파엘씨 내  
**호지킨 에드워드**  
영국 엔더블유1 2비이 런던 유스턴 로드 215 김스 빌딩 신코나 파트너즈 엘엘피 내  
(74) 대리인  
**김태홍, 김진희**

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 **키메라 단백질**

### (57) 요약

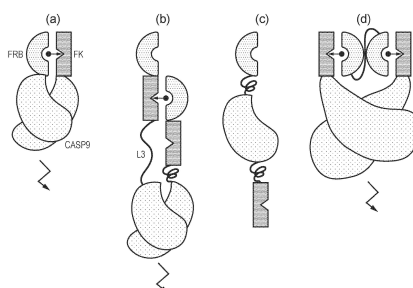
본 발명은, 하기 식:

Casp-Ht1-Ht2

를 갖는 키메라 단백질로서,

(뒷면에 계속)

### 대표도



여기서,

Casp는 카스파제 도메인이고;

Ht1은 제1 이중이량체화 도메인이고;

Ht2는 제2 이중이량체화 도메인이며;

여기서, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 동일한 키메라 단백질 쌍이, 한 키메라 단백질로부터의 Ht1이 다른 키메라 단백질로부터의 Ht2와 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동중이량체화를 유발하도록 상호작용하는 것인 키메라 단백질을 제공한다. 본 발명은 또한 그러한 단백질을 포함하는 세포 및 입양 세포 요법에 있어서의 그 용도를 제공한다.

(52) CPC특허분류

**C07K 14/7051** (2013.01)

**C12N 15/62** (2013.01)

**C07K 2319/70** (2013.01)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 식:

Ht1-Ht2-Casp

를 갖는 키메라 단백질로서,

상기 식에서,

Casp는 카스파제 도메인이고;

Ht1은 제1 이종이량체화 도메인이고;

Ht2는 제2 이종이량체화 도메인이며;

여기서, 이량체화의 화학적 유발제(chemical inducer of dimerization; CID)의 존재 하에, 동일한 키메라 단백질 쌍이, 한 키메라 단백질로부터의 Ht1이 다른 키메라 단백질로부터의 Ht2와 이종이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 상호작용하는 것이고;

상기 카스파제 도메인은 카스파제-8, 카스파제-9 및 카스파제-10의 군으로부터 선택되는 개시제(initiator) 카스파제 또는 카스파제-3 및 카스파제-7로부터 선택되는 실행자(executioner) 카스파제를 포함하는 것이고;

한 이종이량체화 도메인은 FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함하고 다른 이종이량체화 도메인은 mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 것인 키메라 단백질.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제1항에 있어서, Ht1은 FRB를 포함하고 Ht2는 FKBP를 포함하는 것인 키메라 단백질.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 CID는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체인 키메라 단백질.

#### 청구항 7

mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이종이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질로서, 상기 카스파제 도메인은 카스파제-8, 카스파제-9 및 카스파제-10의 군으로부터 선택되는 개시제(initiator) 카스파제 또는 카스파제-3 및 카스파제-7로부터 선택되는 실행자(executioner) 카스파제를 포함하는 것인 키메라 단백질.

#### 청구항 8

제1항에 따른 키메라 단백질을 코딩하는 핵산.

#### 청구항 9

제8항에 따른 하나 이상의 핵산 및 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

제8항에 따른 핵산을 포함하는 벡터.

#### 청구항 12

관심있는 뉴클레오타이드를 또한 포함하는 제8항에 따른 핵산을 포함하는 벡터로서, 상기 관심있는 뉴클레오타이드는, 벡터가 표적 세포를 형질도입하기 위해 사용될 경우, 상기 표적 세포가 제1항 및 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 키메라 단백질 및 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 공동 발현하도록, 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 코딩하는 것인 벡터.

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

제1항에 따른 키메라 단백질을 발현하는 세포.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 제6항에 따른 키메라 단백질 및 제7항에 따른 키메라 단백질을 포함하는 세포.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 제8항에 따른 핵산을 포함하는 세포.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 조혈모세포, 림프구 또는 T 세포인 세포.

#### 청구항 18

제11항에 따른 벡터로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계를 포함하는, 제14항에 따른 세포를 제조하는 방법.

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 본 발명은 입양 세포 요법(ACT)에 유용한 키메라 단백질에 관한 것이다. 상기 키메라 단백질은 상기 키메라 단백질을 발현하는 세포가 결실(delete)되도록 할 수 있는 자살 유전자로서 작용할 수 있다. 본 발명은 또한 이러한 키메라 단백질을 코딩하는 핵산, 이러한 핵산을 포함하는 세포 및 이들의 치료적 용도를 제공한다.

## 배경 기술

[0002] 입양 세포 요법

[0003] 입양 면역요법은 확립되고 발전하는 치료적 접근법이다. 동종이계 조혈모세포 이식(HSCT)의 실행에 있어, 혈액학적 악성종양의 재발을 치료하기 위해 공여체 림프구 주입(DLI)이 빈번하게 주어진다. 종양 침투하는 림프구(TIL)는 전이성 흑색종을 치료하는 데 유효하다. T 세포의 유전공학은 T 세포 치료법의 범위와 효력을 크게 증가시킨다: T 세포 수용체 전달은 세포내 암 항원의 표적화를 허용하고 반면 키메라 항원 수용체(CAR)는 표면 암 또는 계통 특이적 항원의 표적화를 허용한다. 양 접근법 모두에서 임상적 반응이 관찰되었으며, 여러 가지 추가적인 시도가 진행 중이다.

[0004] 급성 부작용이 입양 면역요법에 이어 발생할 수 있다. 이식편 대 숙주 질환(GvHD)은 DLI의 흔하고 심각한 합병증이다. 조작된 T 세포의 투여는 또한 독성을 초래한다. 예를 들면, 표적에서 벗어난 종양에 대한 독성이 흑색종 항원에 대한 원상태 T 세포 수용체 전달 연구에서 보고되었다; 신장 세포 암종 항원 탄산탈수효소

IX(CAIX)에 재지향된 T 세포는 예기치 못한 간독성을 일으켰다. 면역 활성화 증후군이 CD19 CAR 치료법 후에 보고되었다. 마지막으로 벡터 유도된 삽입 돌연변이유발은 림프 증식성 장애의 이론적인 위험을 초래한다. 이들 독성의 발생률과 중증도는 예측할 수 없다. 또한, 그 부작용이 통상적으로 치료제의 반감기로 악화되는 치료적 단백질 또는 소분자와는 반대로, T 세포는 주입되며, 복제하여, 잠재적으로 상승하는 급격한 독성을 유발한다.

[0005] **자살 유전자**

[0006] 자살 유전자는 허용될 수 없는 독성에 직면하여 T 세포와 같은 입양으로 전달된 세포를 선택적으로 파괴할 수 있는 유전자상으로 코딩된 기전이다. 임상 연구에서 두 가지 자살 유전자: 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-TK) 및 유도성 카스파제 9(iCasp9)가 시험되었다.

[0007] 단순 포진 바이러스 I 유도된 티미딘 키나제(HSV-TK) 유전자는 조혈모세포 이식 후 재발성 악성종양 및 엡슈타인 바르 바이러스(EBV) 림프구 증식을 치료하기 위한 공여체 T 세포 주입에서 생체 내 자살 스위치로 사용되어 왔다. 그러나, 이식편 대 숙주 질환을 유발하는 T 세포의 파괴는 불완전했으며, HSV-TK를 활성화시키는 전구 약물로서 강시클로비르(또는 유사체)의 사용은 사이토메갈로바이러스 감염에 대한 항바이러스 약물로서의 강시클로비르의 투여를 불가능하게 한다. 또한, HSV-TK-지향된 면역 반응은 면역 억제된 인간 면역결핍 바이러스 및 골수 이식 환자에서도 HSV-TK-형질도입된 세포의 제거를 초래하여, 주입된 T 세포의 지속성과 따라서 효능을 손상시킨다.

[0008] 카스파제 9 뒤의 활성화 기전은 최초의 iCasp9 분자에서 개척되었다. 카스파제 9가 활성화되기 위해 필요한 모든 것은 카스파제 9를 동종이량체화하기 위한 에너지 장벽을 극복하는 것이다. 동종이량체는 형태적 변화를 겪고 한 쌍의 이량체 중 하나의 단백질분해 영역이 활성화된다. 생리적으로 이것은 카스파제 9의 CARD 도메인이 APAF-1에 결합함에 의해 일어난다. iCasp9에서, APAF-1 도메인은 이량체화의 화학적 유발체(chemical inducer of dimerization; CID)에 선택적으로 결합하도록 돌연변이된 변형된 FKBP12로 대체된다. CID의 존재는 동종이량체화 및 활성화를 초래한다. iCasp9는 인간 FK506 결합 단백질(FKBP)에 융합된 변형된 인간 카스파제 9에 기반된다(문헌[Straathof et al.(2005) Blood 105:4247-4254]). 이것은 AP1903으로 알려진 소분자 CID의 존재 하에서 조건적 이량체화를 가능하게 한다. AP1903은 실험적 약물이며 이것은 야생형 FKBP12와 상호 작용하지 않기 때문에 생물학적으로 불활성인 것으로 간주된다. 그러나, 이 제제도의 임상 경험은 극소수의 환자에게만 제한되어 있다(문헌[Di Stasi, A. et al.(2011) N. Engl. J. Med. 365, 1673-1683]; 및[Iulucci, JD et al.(2001) J. Clin. Pharmacol., 41, 870-879]). AP1903은 또한 비교적 크고 극성 분자이며, 혈뇌 장벽을 넘지 않을 것이다.

[0009] 대안적인 접근법에서, 집행자 카스파제는 카스파제 3 또는 6 또는 7로 담배 에치 바이러스(TeV) 단백질분해 부위의 도입 및 라파마이신의 존재 하에 재조합되는 분할 TEV 프로테아제와 공동 발현을 포함하는 복잡한 전략을 사용하여 소분자에 의해 활성화될 수 있다(문헌[Morgan et al.(2014) Methods Enzymol. 544 : 179-213]). 이것은 여러 가지 이유로 임상적으로 유용한 자살 스위치에 대한 불만족스러운 전략이다: 첫째로, 고도로 복잡한 3개의 분리된 단백질: 각각 변형된 카스파제 및 분할 TeV 프로테아제의 두 성분이 요구된다; 두 번째로, TeV 구성요소는 이중발생성이며 면역원성이 있을 가능성이 있다; 마지막으로, 이 전략은 단지 정점 카스파제보다 하류이고 덜 민감한 프로테아제 감수성 카스파제 분자만 활성화한다.

[0010] FAS의 CID 활성화에 기초한 자살 유전자가 기술되어 있다(문헌[Amara et al.(1999) Hum. Gene Ther. 10, 2651-2655]). 이것은 또한 활성화를 위해 이 CID에 의존하며, 그리고 이것은 세포자멸사 캐스케이드를 직접적으로 활성화하지 않기 때문에(FAS 저항성을 통한) 탈출이 가능하다.

[0011] 실험적 CID에 대한 필요성을 대체하는 표준 조제약에 기초한 동종이량체화 시스템이 매력적인 대안이 될 수 있다. 그러나, 이용가능한 동종이량체화하는 소분자 의약품은 없다.

[0012] 다른 자살 유전자는 예를 들면 T 세포 상에 발현될 때 전장 CD20이 T 세포를 치료적 항-CD20 항체 리툽시맙에 의해 용해하기 쉽게 할 수 있다는 것이 제안되었다(문헌[Introna, M. et al.(2000) Hum. Gene Ther 11, 611-620]). 더욱이 자살 유전자는 항체 인식의 이 주제에 대해 기술되었는데, 예를 들면: RQR8은 T 세포를 CD20에 영향을 받기 쉽게 하지만 전장 CD20 분자보다 더 콤팩트하다(문헌[Philip, B. et al.(2014) Blood doi:10.1182/blood-2014-01-545020]); EGFR의 절단된 버전(huEGFRt)은 세포를 항-EGFR mAbs에 의한 용해에 영향을 받기 쉽게 한다(문헌[Wang, X. et al.(2011) Blood 118, 1255-1263]); 그리고 세포 표면 상에 발현된 myc 에피토프 태그는 항-myc 항체로 용해하기 쉬운 세포를 남긴다(문헌[Kieback et al.(2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 623-628]). 이들 항체 의존적 접근법의 주요 한계는 높은 국소 농도에서 작용하는 치료적

항체의 생체이용률에 대한 그것의 의존성이다. 예를 들면 용균 항체가 거대 질환에 대해 특히 효과적이지 않으며 항체 기반 자살 유전자의 한계는 높은 항체 농도에 도달하지 않는 경우에 상주하는 세포가 빠져나간다는 것이 공지되어 있다. 또한, 특정 상황: 예를 들어 CAR T 세포에 의해 유도된 중증 대식세포 활성화 증후군 또는 사이토카인 폭풍에서; 단클론성 항체에 의해 유도된 추가적인 면역 활성화는 치료하려고하는 자살 유전자의 임상 상황 활성화에 해로울 수 있다.

[0013] 따라서 상기 언급된 단점과 관련되지 않은 대안적인 자살 유전자에 대한 요구가 있다.

### 발명의 내용

[0014] 본 발명자들은 라파마이신 또는 라파마이신 유사체와 같은 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에 이량체화하는 신규한 자살 유전자를 개발하였다.

[0015] 라파마이신 및 라파마이신 유사체는 FKBP12와 mTOR의 FRB 도메인 사이에 계면을 생성함에 의해 이중이량체화를 유도한다. 이 회합은 FKBP12가 mTOR 활성화 부위에 대한 접근을 차단하여 그것의 기능을 억제하도록 한다. mTOR은 매우 큰 단백질이지만, 라파마이신과 상호작용이 요구된 mTOR의 정확한 작은 부분은 알려 저있고 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명자들은 카스파제의 동종이량체화를 유도하기 위해 라파마이신에 의해 매개된 이중이량체화를 이용하는 것이 가능하다는 것을 보여 주었다. 특히 그들은 놀랍게도 (i) mTOR의 FRB 도메인; (ii) FKBP12; 및 (iii) 카스파제를 포함하는 다중 도메인 분자를 생성하는 것과 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하기 위해 분자의 한 카피의 FRB 도메인과 또 다른 카피의 FKBP12 도메인 사이의 이중이량체화를 사용하는 것이 가능하다는 것을 보여 주었다.

[0017] 따라서 본 발명의 제1 측면의 제1 실시형태에서, 본 발명은 하기 식을 갖는 키메라 단백질을 제공한다:

[0018] Ht1-Ht2-Casp

[0019] 여기서,

[0020] Casp는 카스파제 도메인이고;

[0021] Ht1은 제1 이중이량체화 도메인이고;

[0022] Ht2는 제2 이중이량체화 도메인이며;

[0023] 여기서, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 동일한 키메라 단백질 쌍이, 한 키메라 단백질로부터의 Ht1이 다른 키메라 단백질로부터의 Ht2와 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 상호작용한다.

[0024] 본 입체배치(configuration)는 Ht1이 동일한 키메라 단백질 내의 Ht2와 임의의 유의미한 정도로 이중이량체화하지 않도록 된다.

[0025] 카스파제 도메인은 하기 군으로부터 선택되는 개시제(initiator) 카스파제를 포함할 수 있다: 카스파제-8, 카스파제-9 및 카스파제-10, 또는 카스파제-3 및 카스파제-7로부터 선택되는 실행자(executioner) 카스파제.

[0026] 본 발명의 제1 측면의 제1 실시형태의 다중-도메인 단백질에서 한 이중이량체화 도메인은 FKBP12를 포함할 수 있으며, 다른 이중이량체화 도메인은 mTOR의 FRB 도메인을 포함할 수 있다.

[0027] 이 이중이량체화 도메인 조합을 위한, 적합한 CID는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체이다.

[0028] 본 발명의 제1 측면의 제2 실시형태에서, FKBP12를 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질 및 mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질이 제공된다.

[0029] 본 발명의 이 측면의 제3 실시형태에서, 두 개의 단백질이 제공된다:

[0030] Ht1-Casp 및 Ht2-Ht2

[0031] 여기서, Ht1-Casp는 카스파제 도메인(Casp) 및 제1 이중이량체화 도메인(Ht1)을 포함하는 키메라 단백질이고; Ht2-Ht2는 2중 이상의 제2 이중이량체화 도메인(Ht2)을 포함하는 계면 단백질이고;

[0032] 여기서, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 한 쌍의 키메라 단백질 Ht1-Casp9가, 각 키메라 단백질로

부터의 Ht1이 계면 단백질로부터의 Ht2 도메인과 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 상호작용한다.

- [0033] 본 발명의 이 측면의 제4 실시형태에서, 하기 식을 갖는 키메라 단백질이 제공된다:
- [0034] Ht1-Casp-Ht2
- [0035] 여기서,
- [0036] Casp는 카스파제 도메인이고;
- [0037] Ht1은 제1 이중이량체화 도메인이고;
- [0038] Ht2는 제2 이중이량체화 도메인이며;
- [0039] 여기서, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 동일한 키메라 단백질 쌍이, 한 키메라 단백질로부터의 Ht1이 다른 키메라 단백질로부터의 Ht2와 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 상호작용한다.
- [0040] 본 발명의 제1 측면의 이 제4 실시형태로, 이중이량체화 도메인은 FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함하며, 다른 이중이량체화 도메인은 mTOR의 FRB 도메인을 포함하며, CID는 라파마이신 또는 그것의 유도체인 경우, 5 nM 미만, 예를 들면 1~3 nM 또는 약 1 nM의 농도가 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 사용될 수 있다.
- [0041] 키메라 단백질은 FKBP12에 융합된 카스파제 도메인을 포함할 수 있으며 그리고 계면 단백질은 2종 이상의 FRB 도메인의 융합일 수 있다. 이들 2종 이상의 FRB 도메인은 계면으로 작용하여, 두 FKBP12-Casp 도메인을 함께 결합한다.
- [0042] 제2 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 키메라 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0043] 핵산은 복수의 핵산 서열을 포함하는 핵산 컨스트럭트의 형태일 수 있다. 예를 들면, 본 컨스트럭트는 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열과 본 발명의 제2 측면에 따른 1종 이상의 핵산 서열(들)을 포함할 수 있다.
- [0044] 본 핵산 컨스트럭트는 하기를 포함할 수 있다:
- [0045] i) FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 코딩하는 제1 핵산 서열;
- [0046] ii) mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 코딩하는 제2 핵산 서열.
- [0047] 다음 구조를 갖는 핵산 컨스트럭트가 또한 제공된다:
- [0048] *Ht1-Casp-coexpr-Ht2-Ht2*
- [0049] 여기서,
- [0050] Casp는 카스파제 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;
- [0051] Ht1은 제1 이중이량체화 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;
- [0052] Ht2는 제2 이중이량체화 도메인을 코딩하는 핵산 서열이고;
- [0053] *coexpr*은 *Ht1-Casp* 및 *Ht2-Ht2*의 공동 발현을 할 수 있게 하는 핵산 서열이고,
- [0054] 여기서, 핵산 컨스트럭트의 발현은 키메라 단백질 Ht1-Casp 및 계면 단백질 Ht2-Ht2의 생성을 유도하고, 여기서, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 한 쌍의 키메라 단백질 Ht1-Casp가, 각 키메라 단백질로부터의 Ht1이 계면 단백질로부터의 Ht2 도메인과 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 상호작용한다.
- [0055] Ht1은 FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함할 수 있으며, Ht2는 mTOR의 FRB 도메인을 포함할 수 있다.
- [0056] 핵산 컨스트럭트는 또한 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수

있다.

- [0057] 제3 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제2 측면에 따른 핵산 서열 또는 핵산 컨스트럭트를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0058] 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 같은 관심 있는 뉴클레오타이드를 또한 포함할 수 있는 벡터로서, 상기 벡터가 표적 세포를 형질 도입하기 위해 사용될 때, 상기 표적 세포는 본 발명의 제1 측면에 따른 키메라 단백질 및 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 함께 발현하도록 한다.
- [0059] 제4 측면에서 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 키메라 단백질을 발현하는 세포를 제공한다.
- [0060] 본 세포는 하기를 포함할 수 있다:
- [0061] i) FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 제1 키메라 단백질; 및
- [0062] ii) mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 제2 키메라 단백질.
- [0063] 두 개의 단백질을 발현하는 세포가 또한 제공된다:
- [0064] Ht1-Casp 및 Ht2-Ht2
- [0065] 여기서, Ht1-Casp는 카스파제 도메인(Casp) 및 제1 이중이량체화 도메인(Ht1)을 포함하는 키메라 단백질이고; Ht2-Ht2는 두 개의 제2 이중이량체화 도메인(Ht2)을 포함하는 제면 단백질이고;
- [0066] 여기서, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 한 쌍의 키메라 단백질 Ht1-Casp9가, 각 키메라 단백질로부터의 Ht1이 제면 단백질로부터의 Ht2 도메인과 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 상호작용한다.
- [0067] 본 세포는 본 발명의 제2 측면에 따른 핵산 서열 또는 컨스트럭트를 포함할 수 있다.
- [0068] 본 세포는, 예를 들면, 조혈모세포, 림프구 또는 T 세포일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 제3 측면에 따른 벡터로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계를 포함하는 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 제작하는 방법이 또한 제공된다.
- [0070] 세포를 이량체화의 화학적 유발제(CID)에 노출시키는 단계를 포함하는 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 제거하는 방법이 또한 제공된다.
- [0071] CID는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체일 수 있다.
- [0072] 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 질환을 예방하거나 치료하는 방법이 또한 제공된다.
- [0073] 본 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0074] (i) 본 발명의 제2 측면에 따른 벡터로 대상체로부터 분리된 세포의 샘플을 형질도입 또는 형질감염시키는 단계, 및
- [0075] (ii) 상기 형질도입된/형질감염된 세포를 환자에게 투여하는 단계.
- [0076] 본 방법은 암을 치료하기 위한 것일 수 있다.
- [0077] 대상체에게 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포의 투여에 의해 유발된 대상체에서 병리적 면역 반응을 예방하고/하거나 치료하는 방법이 또한 제공된다.
- [0078] 상기 병리적 면역 반응은 하기 군으로부터 선택될 수 있다: 이식편 대 숙주 질환; 중앙 이외의 표적에 작용하는 독성(on-target off-tumor toxicity); 면역 활성화 증후군; 및 림프증식성 질환.
- [0079] 대상체에서 질환을 치료하거나 또는 예방을 위한 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [0080] (i) 상기 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 투여하는 단계;
- [0081] (ii) 병리적 면역 반응의 발달에 대해 상기 대상체를 모니터링하는 단계; 및

- [0082] (iii) 상기 대상체가 병리적 면역 반응을 발달시키고 있거나 발달시켰다는 징후를 나타낸다면, 상기 대상체에게 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 투여하는 단계.
- [0083] 조혈모세포 이식, 림프구 주입 또는 입양 세포 이식에 사용하기 위한 본 발명의 제4 측면에 따른 세포가 또한 제공된다.
- [0084] 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포의 투여에 의해 유발된 병리적 면역 반응을 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 라파마이신 또는 라파마이신 유사체가 또한 제공된다.
- [0085] 따라서 본 발명은 허용될 수 없는 독성에 직면하여 입양으로 주입된 세포의 선택적 파괴를 할 수 있으며, 라파마이신 및/또는 그것의 유사체에 의해 활성화되는 자살 유전자를 제공한다.
- [0086] 라파마이신은 잘 이해된 특성, 우수한 생체이용률 및 유통량을 지닌 널리 사용되는 표준 의약품이다. 라파마이신은 또한 치료받는 상태를 악화시키지 않으며, 실제로 면역억제제이기 때문에 원하지 않는 독성뿐만 아니라 그것의 자살 유전자 기능에 유익한 효과를 가질 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0087] **도 1** - RapCasp9에 대한 상이한 접근법을 보여주는 도면. (a) 두 분자가 별도로 발현되는 이중 컨스트럭트. 각 분자는 각각 FKBP12 또는 FRB 중 어느 하나와 융합된 Casp9의 촉매 도메인을 갖는다. (b) FKBP12 및 FRB가 직접적으로 함께 융합되고 그 후, 가요성 링커에 의해 Casp9의 촉매 도메인에 융합되는 단일 컨스트럭트. 자가 이중이량체화는 이 배향에서 가능하지 않아야 한다. (c) 카스파제 9의 촉매 도메인이 FRB와 FKBP12에 의해 축적된 단일 컨스트럭트. 여기서, 자가 이중이량체화가 발생할 수 있고 그래서 이 반복은 잘 작용하는 것으로 예상되지 않는다. (d) 카스파제 9의 촉매 도메인이 FKBP12에 융합되고 두 개의 FRB 카피의 융합인 별도의 작은 단백질이 함께 발현되는 이중 컨스트럭트.
- 도 2** - 이중이량체화제로 카스파제 9를 활성화시키는 것이 가능하다는 논증. T 세포는 eGFP 단독으로 형질도입되거나(도 2a) 또는 FKBP12-dCasp9(공동 발현 eGFP) 및 FRB-dCasp9(공동 발현 eBFP2)와 함께 형질도입되었다(도 2b). T 세포는 의도적으로 부분적으로만 형질도입되어 형질도입되지 않은 T 세포가 내부 대조로 작용할 것이다. 그 후, T 세포를 감소하는 농도의 라파마이신에 노출하였다. 48시간 후, 세포를 아넥신-V 및 7AAD로 염색하고, 형광 단백질을 발현하는 생존 세포의 비율을 관찰하는 유세포분석법으로 분석하였다. eGFP 및 eBFP2 양자를 발현하는 T 세포는 가장 낮은 농도의 라파마이신의 존재 하에도 매우 효과적으로 제거되었다.
- 도 3** - RapCasp9 변이체의 기능. T 세포는(a) eGFP 단독으로 형질도입되었고;(b) 각각 eGFP 및 eBFP2와 함께 발현된 FKBP12-Casp9 및 FRB-Casp9로 이중 형질도입되었고;(c) FRB-FKBP12-Casp9로 형질도입되었으며, (d) FRB-Casp9-FKBP12 및(e) FBP12-Casp9-2A-FRB-FRBw로 형질도입되었다. 단지 일부의 세포만이 형질도입되었으며, 음성 세포는 내부 음성 대조군으로 작용하였다. T 세포를 48시간 동안 2.5nM 라파마이신에 노출시켰다. T 세포를 그 후, 아넥신-V 및 7AAD로 염색하고 유세포분석법에 의해 분석하였다. eGFP 대 eBFP2는 아넥신-V 및 7AAD 염색에 의해 결정된 바와 같이 생존 세포 상에 나타난다.
- 도 4** - 라파마이신 및 라팔로그. A) 라파마이신; B) C-20-메틸릴라파마이신(MaRap); C) C16(S)-부틸설폰아미도 라파마이신(C16-BS-Rap); D) C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신(C16-iRap); 및 E) C16-(S)-7-메틸인돌라파마이신(AP21976/C16-AiRap).
- 도 5** - 실시예 3에서 시험된 컨스트럭트의 요약.
- 도 6** - 실시예 3에 대한 게이팅 전략의 요약.
- 도 7, 8 및 9** - 다양한 농도의 라파마이신으로 배양 후 도 5에 도시된 컨스트럭트로 형질감염된 주르카트(Jurkat) 세포의 사멸을 나타내는 연구.
- 도 10** - 도 7, 8 및 9에 도시된 FACS 데이터를 요약하는 그래프.
- 도 11** - 라파마이신 대 템시롤리무스의 존재 하에 주르카트 세포 사멸을 비교하는 그래프.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0088] **키메라 단백질**
- [0089] 본 발명은 자살 유전자로 작용하는 키메라 단백질에 관한 것이다. 키메라 단백질을 발현하는 세포는 이량체화의

화학적 유발제(CID), 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체의 투여에 의해 생체내 또는 시험관내에서 단리될 수 있다.

[0090] 키메라 단백질은 하기 식을 가질 수 있다:

[0091] Ht1-Ht2-Casp

[0092] 여기서,

[0093] Casp는 카스파제 도메인이고;

[0094] Ht1은 제1 이중이량체화 도메인이고;

[0095] Ht2는 제2 이중이량체화 도메인임.

[0096] 키메라 단백질은 하기 식을 가질 수 있다:

[0097] Ht1-Ht2-L-Casp

[0098] 여기서, Casp, Ht1 및 Ht2는 상기에 정의된 바와 같고, L은 선택적인 링커임.

[0099] 입체배치는 Ht1은 동일한 키메라 단백질 분자 내의 Ht2와는 유의미하게 이중이량체화하지만, 그러나 두 개의 키메라 단백질이 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에 합치될 때, 한 키메라 단백질로부터의 Ht1이 다른 키메라 단백질로부터의 Ht2와 이중이량체화하여 두 카스파제 도메인의 동종이량체화를 유발하도록 되어야 한다.

[0100] 입체배치는 Ht1은 동일한 키메라 단백질 내의 Ht2와 임의의 유의미한 정도로 이중이량체화하지 않도록 된다. 예를 들면, 본 발명의 제1 측면의 실시형태에 따른 키메라 단백질을 발현하는 세포에서, CID의 존재는 동일한 키메라 단백질 내 이중이량체화보다 더 큰 비율의 두 개의 키메라 단백질 사이의 이량체화를 야기하여야 한다. 용액에서 또는 세포 또는 세포 군집에서 동일한 분자 내에서 이중이량체화된 키메라 단백질의 양은 CID의 존재 하에 별도 키메라 단백질 분자와 이중이량체화된 키메라 단백질의 양의 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% 또는 1% 미만일 수 있다.

[0101] 키메라 단백질은 서열 번호 1로서 나타낸 서열을 포함할 수 있다.

[0102] 서열 번호 1(FRB-FKBP12-L3-dCasp9)

```
<-----FRB-----
MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR

-----FRB-----><L1-><--FKBP12-----
DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKLEYSGGGSLEGVQVETISPGDGR

-----FKBP12-----
TFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSDRNKPFPKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAK

-----><-----L3-----><--dCasp9--
LTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLKLESGGGSGGGSGGGSGVDGFGDVGA

-----dCasp9-----
LESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIIINN VFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMV

-----dCasp9-----
EVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDCPVSVE

-----dCasp9-----
KIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE

-----dCasp9-----
GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQ

-----dCasp9----->
SLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS
```

[0103]

[0104] 상기 서열에서 "FKBP12"는 FKBP12의 서열을 지칭하고; "dCasp9"은 Casp9의 촉매 도메인을 지칭하고; "L1"은 하나의 반복 링커이고; "FMD-2A"는 구제역 2A 유사 펩타이드 ERAV이고; "FRB"는 mTOR의 FRB 도메인이고; "L3"는

두 개의 반복 링커이고; "FRBw"는 코돈 워블링 FRB이다

[0105] 제2 실시형태에서, 본 발명은 CID가 라파마이신 또는 라파마이신 유사체인 "2-분자" 자살 유전자 시스템을 제공한다.

[0106] 따라서, 본 발명은 또한 i) FK506 결합 단백질(FKBP12)을 포함하는 이중이량체화 도메인 및 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질; 및 ii) mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이중이량체화 도메인 및 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 제공한다.

[0107] 세포, 예컨대 T 세포가 이들 키메라 단백질 양자를 발현할 때, 라파마이신 또는 라파마이신 유사체의 존재는 FKBP-포함 도메인 또는 i)이 FRB-포함 도메인 또는 ii)와 이중이량체화되도록 하여, 따라서 i) 및 ii)로부터 카스파제 도메인의 동중이량체화를 유발한다.

[0108] 본 발명의 이 실시형태에서, 키메라 단백질은 서열 번호 2 또는 3으로서 나타낸 서열을 포함할 수 있다.

[0109] 서열 번호 2(FKBP12-dCasp9)

```
<-----FKBP12-----
MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDKNKPFKFM LGKQEVIR
-----FKBP12-----><L1-><-----
GWEEGVAQMSVQGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGVDGF
-----dCasp9-----
GDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS
-----dCasp9-----
LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDCG
-----dCasp9-----
PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDA
-----dCasp9-----
TPFQEGLRTRFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH
-----dCasp9----->
SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFN FLRKKLFFKTSAS
```

[0110]

[0111] 서열 번호 3(FRB-dCasp9)

```
-----FRB----->
MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR
-----FRB-----><L1-><-----dCasp9-----
DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKLEYSGGGSGVDGFGDVGALESLR
-----dCasp9-----
GNADLAYILSMEPCGHCLII NNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGD
-----dCasp9-----
LTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDCGCPVSVEKIVNI
-----dCasp9-----
FNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQEGLRTF
-----dCasp9-----
DQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLR
-----dCasp9----->
VANAVSVKGIYKQMPGCFN FLRKKLFFKTSAS
```

[0112]

[0113] 제3 실시형태에서, 본 발명은 제2 실시형태보다 더 작은 풋프린트를 갖는 대안적인 "두 분자" 접근법을 제공한다. 여기서, Ht1은 카스파제와 융합되고 제2 분자는 공동 발현된 Ht2-Ht2 융합을 포함한다. CID의 존재 하에, Ht2-Ht2는 두 개의 Ht1-Casp 분자를 결합시킨다. 실제로, 이것은 FKBP12-Casp9를 FRB-FRB와 공동 발현시키고 라파마이신으로 활성화시킴으로써 구현될 수 있다. 편리하게, 이들 구성요소는 구체적 2A 유사 펩타이드와 공동 발현될 수 있다. 제2 Ht2(예를 들면 FRB) 인코딩 서열은 재조합을 방지하기 위해 코돈이 워블링될 수 있다.

[0114] 서열 번호 4(FKBP12-dCasp9-2A-FRB-FRBw)

```

<-----FKBP12-----
MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIR

-----FKBP12-----><L1-><-----
GWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGVDGF

-----dCasp9-----
GDVGALLESRLGNADLAYILSMEPCGHCLIIINNWNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSS

-----dCasp9-----
LHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTDCG

-----dCasp9-----
PVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESPGSNPEPDA

-----dCasp9-----
TPFQEGRLRTFDQLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAH

-----dCasp9-----><-----FMD-2A-----
SEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASQCTNYALLKLAGDVESNP

-><-----FRB-----
GPGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRG

-----FRB-----><-----L2----->
WEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGGSGGGGS

<-----FRBw-----
MLEGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIR

-----FRBw----->
GWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLES

```

[0115]

[0116] 상기 서열에서: "FKBP12"는 FKBP12를 지칭하고; "dCasp9"은 Casp9의 촉매 도메인이고; "L1"은 하나의 반복 커이고; "FMD-2A"는 구제역 2A 유사 캡타이드 ERAV이고; "FRB"는 mTOR의 FRB 도메인이고; "L2"는 두 개의 반복 커이고; "FRBw"는 코돈 위블링 FRB이다.

[0117] **카스파제**

[0118] 카스파제, 또는 시스테인-아스파르트산 프로테아제 또는 시스테인 의존적 아스파르테이트 지향된 프로테아제는 세포자멸사에서 필수적인 역할을 하는 시스테인 프로테아제의 계열이다.

[0119] 12개의 카스파제가 인간에서 확인되었다. 세포자멸적 카스파제의 두 가지 유형이 있다: 개시제 카스파제 및 실행자 카스파제. 개시제 카스파제, 예컨대 카스파제-2, 카스파제-8, 카스파제-9, 및 카스파제-10은 불활성 프로 형태의 이펙터 카스파제를 절단하고, 이로써 이들을 활성화한다. 실행자 카스파제, 예컨대 카스파제-3, 카스파제-6 및 카스파제-7은 그 후, 세포 내의 다른 단백질 기질을 절단하여, 세포자멸적 과정을 촉발한다.

[0120] 본 발명의 제1 측면의 키메라 단백질의 카스파제 도메인은 카스파제-2; 카스파제-8, 카스파제-9 및 카스파제-10 으로부터 선택되는 개시제 카스파제; 또는 카스파제-3, 카스파제-6 및 카스파제-7 으로부터 선택되는 실행자 카스파제를 포함할 수 있다.

[0121] 특히, 본 발명의 제1 측면의 키메라 단백질의 카스파제 도메인은 카스파제-9을 포함할 수 있다. 카스파제 9은 주요 개시제 카스파제이고 따라서 그것의 활성화는 세포자멸사 유도에 대해 매우 감수성 유발제이다. 더욱이, 동종이량체화는 동종이량체화 및 단백질 분해 절단보다 활성화에 필요한 모든 것이다.

[0122] 전장 카스파제-9는 서열 번호 5로서 나타난 서열을 가진다.

[0123] 서열 번호 5(카스파제-9)

```

1 MDEADRRLLR RCRLRLVEEL QVDQLWDALL SSELFPRPHMI EDIQRAGSGS RRDQARQLII
61 DLETRGSQAL PLFISCLEDT GQDMLASFLR TNRQAAKLSK PTLENLTPVV LRPEIRKPEV
121 LRPETPRPVD IGSGGGFDVG ALESRLGNAD LAYILSMEPC GHCLINNVN FCRESGLRTR
181 TGSNIDCEKL RRRFSSPHFM VEVKGDLTAK KMLALLELA QQDHGALDCC VVILSHGCQ
241 ASHLQFPGAV YGTGDCPVSV EKIVNIFNGT SCPSLGGKPK LFFIQACGGE QKDHGFEVAS
301 TSPEDESPGS NPEPDATPFQ EGLRTFDQLD AISSLPTPSD IFVSYSTFPG FVSWRDPKSG
361 SWYVETLDDI FEQWAHSEDL QSLLLRVANA VSVKGIYKQM PGCNFNLRKK LFFKTS
    
```

[0124]

[0125] 카스파제-9는, 예를 들면 카스파제 동원 도메인을 제거하기 위해 절단될 수 있다. 절단된 카스파제-9는 서열 번호 6으로서 제시된다.

[0126] 서열 번호 6(절단된 카스파제-9, CARD 도메인을 결함)

```

GFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
RRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLALLELAQQDHGALDCCVVILSHGCQASHLQFP
GAVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPE
DESPGSNPEPDATPFQEGRLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGS
WYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCNFNLRKKLFFKTS
    
```

[0127]

[0128] 본 발명의 제1 측면의 키메라 단백질은 동종이량체화하고 따라서 세포자멸사를 촉발하는 능력을 보유하는 서열 번호 5 또는 서열 번호 6 또는 그것의 단편이나 변이체를 포함할 수 있다.

[0129] 변이체 카스파제-9 서열은 서열 번호 5 또는 6에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0130] 두 폴리펩타이드 서열 사이의 동일성 백분율은 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>에서 무료로 이용가능한 BLAST와 같은 프로그램에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0131] 생체 내에서, 프로테아제 카스파제 9는 배아 발생 동안 세포 결실을 조절하는 어포프토솜 및 이온화 방사선 또는 화학요법 약물과 같은 치명적인 세포성 상해뿐만 아니라 세포사를 유발하는 생리적 반응으로 알려진 다중 성분 경로의 중심적 참가자이다. 카스파제 9의 기능은 제한된 단백질분해에 의해 카스파제 3 및 7의 활성 형태를 생성하고, 이로써 세포자멸적 신호를 실행 단계에 전달하는 것이다. 그러나 카스파제 9는 크고 작은 소단위 사이의 단백질 분해가 잠재적 자이모겐을 촉매적 형태로 전환시키지 않는다는 점에서 그것의 친밀한 동족들 중에서 혼치않다. 사실상, 이것은 활성화에 요구된 동종이량체화이다.

[0132] **이종이량체화 도메인**

[0133] 매크롤라이드 라파마이신 및 FK506은 세포성 단백질의 이종이량체화를 유도함으로써 작용한다. 각 약물은 FKBP12 단백질에 높은 친화도로 결합하여 그 뒤에 각각 mTOR/FRAP 및 칼시뉴린에 결합하고 불활성화하는 약물-단백질 복합체를 생성한다. mTOR의 FKBP-라파마이신 결합(FRB) 도메인은 관심 있는 단백질에 융합될 수 있는 단리된 89 아미노산 단백질 모이어티로 정의되고 적용되었다. 라파마이신은 FKBP12와 융합된 단백질 또는 FKBP12에 FRB 융합의 근사치를 그 후, 유도할 수 있다.

[0134] 본 발명의 문맥에서 이종이량체화 도메인(Ht1 또는 Ht2) 중 하나는 FRB, 또는 그것의 변이체이거나 포함할 수 있고 다른 이종이량체화 도메인(Ht2 또는 Ht1)은 FKBP12 또는 그것의 변이체이거나 포함할 수 있다.

[0135] 라파마이신은 이상적 이량체화제의 몇 개의 특성을 가진다: 이것은 FKBP12에 결합될 때 FRB에 대해 높은 친화도(KD < 1 nM)를 가지고 mTOR의 FRB 도메인에 대해 아주 특이적이다. 라파마이신은 포유동물에서 호의적인 약력학적 및 약동학 프로파일을 갖는 유효한 치료적 면역억제제이다. 에버롤리무스, 템시롤리무스 및 데포롤리무스(문헌[Benjamin et al, Nature Reviews, Drug Discovery, 2011])와 같은 상이한 약력학적 및 동적 특성을 갖는 라파마이신의 약리적 유사체가 또한 임상 설정에 따라 사용될 수 있다.

[0136] 라파마이신 결합 및 불활성화 내인성 mTOR을 방지하기 위해, FRB와 접하는 라파마이신의 표면은 변형될 수 있다. "부딪힌" 라파마이신을 수용하는 버페이스를 형성하기위한 FRB 도메인의 보상성 돌연변이는 내인성 mTOR 단백질이 아닌 단지 FRB 돌연변이체와 이량체화 상호작용을 회복시킨다.

- [0137] Bayle 등(문헌[Chem Bio; 2006; 13; 99-107])은 다양한 라파마이신 유사체, 또는 "라팔로그" 및 그것의 대응하는 변형된 FRB 결합 도메인을 기술한다. 예를 들면, Bayle 등(2006)은 각각에 대해 각 상보적 결합 도메인과 조합하여, 도 3에 나타난 바와 같은, 라팔로그: C-20-메틸틸트라파마이신(MaRap), C16(S)-부틸설폰아미도라파마이신(C16-BS-Rap) 및 C16-(S)-7-메틸인돌라파마이신(AP21976/C16-AiRap)을 기술한다. 다른 라파마이신/라팔로그는 시롤리무스 및 타크롤리무스를 포함한다.
- [0138] 키메라 단백질의 이중이량체화 도메인은 서열 번호 7 내지 서열 번호 11로서 나타난 서열, 또는 그것의 변이체이거나 포함할 수 있다.
- [0139] 서열 번호 7 - FKBP12 도메인
- MGVQVETISPGDGRFTFPRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDNRNKPFFKMLGKQE
- [0140] VIRGWEEGVAQMSVGQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE
- [0141] 서열 번호 8 - mTOR의 야생형 FRB 세그먼트
- MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
- [0142] QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISKLES
- [0143] 서열 번호 9 - AP21967에 결합하는 것을 허용하는 2098에서 L에 T 치환을 갖는 FRB
- MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
- [0144] QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRISKLES
- [0145] 서열 번호 10 - 야생형에 대한 감소된 친화도로 라파마이신을 결합하는 전체 mTOR의 2098에서 H에 그리고 잔기 2101에서 F에서 W에 T 치환을 갖는 mTOR의 FRB 세그먼트
- MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
- [0146] QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLHQAFDLYYHVFRISKLES
- [0147] 서열 번호 11 - 감소된 친화도로 라파마이신을 결합하는 전체 mTOR의 잔기 2095에서 P에 K 치환을 갖는 mTOR의 FRB 세그먼트
- MASRILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFN
- [0148] QAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVPDLTQAWDLYYHVFRISKLES
- [0149] 변이체 서열은 서열 번호 7 내지 11에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가질 수 있고, 단 본 서열은 유효한 이량체화 시스템을 제공한다. 즉, 단, 본 서열은 두 키메라 단백질의 충분한 공극제화를 용이하게 하여 두 카스파제 도메인의 동중이량체화를 허용한다.
- [0150] 서열 번호 8로서 나타난 "야생형" FRB 도메인은 인간 mTOR의 아미노산 2025-2114를 포함한다. 인간 mTOR의 아미노산 넘버링 시스템을 사용하여, 본 발명의 키메라 단백질의 FRB 서열은 하기 위치 중 하나 이상에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다: 2095, 2098, 2101.
- [0151] 본 발명의 키메라 단백질에 사용된 변이체 FRB는 위치 2095, 2098 및 2101에서 하기 아미노산 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0152] 2095: K, P, T 또는 A
- [0153] 2098: T, L, H 또는 F
- [0154] 2101: W 또는 F
- [0155] Bayle 등(상기와 같음)은 위치 2095, 2098 및 2101에서 아미노산에 따라 주석을 단 하기 FRB 변이체를 기술한다 (표 1 참고): KTW, PLF, KLW, PLW, TLW, ALW, PTF, ATF, TTF, KLF, PLF, TLF, ALF, KTF, KHF, KFF, KLF. 이들 변이체는 Bayle 등의 표 1 및 도 5A에 나타난 바와 같이 다양한 정도로 라파마이신 및 라팔로그를 결합할 수 있다. 본 발명의 키메라 단백질은 이들 FRB 변이체 중 하나를 포함할 수 있다.
- [0156] 링커
- [0157] 링커가 카스파제 도메인과 이중이량체화 도메인(들)을 공간적으로 분리하기 위해 포함될 수 있다.

- [0158] 본 발명의 제1 측면의 제1 실시형태에서, 키메라 단백질은 이들이 단일 분자 내에 CID의 존재 하에 서로 이중이량체화될 수 없지만, 한 분자 상의 Ht1은 동일한 이중이량체화 도메인을 갖는 또 다른 키메라성 분자 상의 Ht2와 이중이량체화될 수 있는 입체배치로 유지하는 두 이중이량체화 도메인을 포함한다(도 1B). Ht1 및 Ht2가 카스파제 도메인과 인접한 디자인(Ht1-Casp-Ht2)에서, Ht1과 Ht2가 함께 연결된 디자인보다 활성화 열등했기 때문에, 단일 CID에 대해 단일 분자로부터 Ht1과 Ht2의 비생산적인 결합을 방지하는 것의 중요성을 나타낸다.
- [0159] 이 실시형태에서, 링커(L1)는 충분한 가요성을 제공하여야 하여 측매 도메인은 동종이량체화할 수 있지만, 동종이량체화에 대한 에너지 장벽이 극복되지 않을 만큼 매우 가요성이 아니다(도 1). 예를 들면, 링커는 길이에서 15 미만, 10 미만 또는 5~15 또는 5~10 사이 아미노산일 수 있다.
- [0160] 본 발명의 제1 측면의 제2 실시형태에서, 키메라 단백질은 CID의 존재 하에 제2 키메라 단백질 상의 상보적 이중이량체화 도메인과 이중이량체화할 수 있는 단일 이중이량체화 도메인을 포함한다.
- [0161] 대안적인 입체배치에서, 두 이중이량체화 도메인은 긴 링커(L2)를 갖는 단일 분자 상에 제공될 수 있어, 하기식을 갖는 컨스트럭트를 제공한다:
- [0162] Ht1-Casp1-L2-Ht2-Casp2
- [0163] HT 및 Casp 도메인은 링커의 각 면 상에 어느 하나의 순서일 수 있다.
- [0164] 이 실시형태에서, 링커 L2는 충분한 가요성을 부여할 수 있어 제1 이중이량체화 도메인은 제2 이중이량체화 도메인과 이중이량체화될 수 있고; 그래서 '제1 키메라 단백질'에 대응하는 분자의 부분 내 카스파제 도메인은 '제2 키메라 단백질'에 대응하는 분자의 부분 내 카스파제 도메인과 동종이량체화될 수 있다.
- [0165] 본 발명의 제1 측면의 제3 실시형태에서, Casp는 다른 이중이량체화 도메인의 2개 이상의 복제물의 융합인 제2 분자가 아닌, 단일 이중이량체화 도메인에 융합된다. 두 분자는 공동 발현될 수 있다. 이 경우에, 제2 분자는 CID의 존재 하에 2개 이상의 Casp 도메인을 함께 갖는 계면으로서 작용한다. 이 경우에, 이중이량체화 도메인의 두 개 이상의 복제물은 Casp9 도메인의 근사치가 이들을 충분히 활성화되도록 하는 그러한 방법으로 융합되어야 한다.
- [0166] 계면 단백질은 두 Ht2 도메인 초과를 포함하는 다량체일 수 있다. 예를 들면, 이중나선 도메인과 같은 다량체화 링커를 사용하여 단일 계면 단백질 내에 복수의 Ht2 도메인을 조합하는 것이 가능하다.
- [0167] 이 실시형태에서, 계면 단백질은 구조식 Ht2-L2-Ht2, 또는 Ht2-L2를 가질 수 있고, 여기서 L2는 이중나선 도메인이다.
- [0168] 이중나선은 2~7개의 알파-나선이 로프의 가닥과 같이 함께 랩핑된 구조적 모티프이다. 이중나선 도메인의 구조는 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어 Lupas & Gruber에 의해 기술된 바와 같다(문헌[Advances in Protein Chemistry; 2007; 70; 37-38]).
- [0169] 이중나선은 보통 헵타드 반복으로 지칭된, 소수성(h) 및 하전된(c) 아미노산 잔기의 반복된 패턴인, hxxhcxhc를 포함한다. 헵타드 반복 내 위치는 보통 abcdefg로 표지되고, 여기서 a 및 d는 소수성 위치로, 때로는 이소류신, 류신, 또는 발린으로 점유된다. 이 반복 패턴을 갖는 서열을 알파-나선 2차 구조로 접힘은 소수성 잔기가 나선형 주위를 부드럽게 윈손 방식으로 코일화하여 양친매성 구조를 형성하는 '스트라이프'로 제공되도록 한다. 두 개의 이러한 나선이 세포질에 자체 배열하도록 하기 위한 가장 유리한 방법은 소수성 가닥을 친수성 아미노산 사이에서 서로 사이에 긴 랩핑을 하는 것이다. 따라서, 올리고머화를 위한 열역학적 추진력을 제공하는 것은 소수성 표면의 매장이다. 이중나선 계면 내 팩킹은 a 및 d 잔기의 측쇄 사이에 거의 완전한 반데르발스 접촉으로 예외적으로 단단하다.
- [0170] 이중나선 도메인을 함유하는 단백질의 예는, 비제한적으로, 키네신 모터 단백질, D형 간염 델타 항원, 고세균 박스 C/D sRNP 코어 단백질, 연골-올리고머 매트릭스 단백질(COMP), 만노스 결합 단백질 A, 이중나선 세린-풍부 단백질 1, 폴리펩타이드 방출 인자 2, SNAP-25, SNARE, Lac 억제인자 또는 아포지질단백질 E를 포함한다.
- [0171] **이량체화의 화학적 유발제(CID)**
- [0172] 이량체화의 화학적 유발제(CID)는 동일한 Ht1 및 Ht2 도메인을 갖는 별도 키메라성 분자 상의 Ht1과 Ht2 사이에 이중이량체화를 유도하는 임의의 분자일 수 있다.
- [0173] CID는 라파마이신 또는 라파마이신에 대해 개선된 또는 상이한 약동학적 또는 약력학적 특성을 가지지만 동일한

넓은 작용 기전을 갖는 라파마이신 유사체("라팔로그")를 포함할 수 있다. CID는, 예를 들어 도 4에 나타난 바와 같이 상보적 FKBP12 또는 FRB에 대해 조작된 특이성을 갖는 변경된 라파마이신일 수 있다. Bayle 등(2006, 상기와 같음)은 C16 및/또는 C20에서 작용화된 다양한 라팔로그를 기술한다.

[0174] 제1 카테고리에서 이러한 라팔로그의 예는 시롤리무스, 에버롤리무스, 템시롤리무스 및 데포롤리무스를 포함한다. 제2 카테고리에서 이러한 라팔로그의 예는 C-20-메틸릴트라파마이신(MaRap); C16(S)-부틸설포아미도라파마이신(C16-BS-Rap); C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신(C16-iRap); 및 C16-(S)-7-메틸인돌라파마이신(AP21976/C16-AiRap)를 포함한다.

[0175] CID의 존재 하에 카스파제 도메인의 동종이량체화는 CID의 부재 하에 일어나는 카스파제 활성화보다 2, 5, 10, 50, 100, 1,000 또는 10,000배 높은 카스파제 활성화를 유도한다.

[0176] 라파마이신은 강력한 면역억제제이다. 라파마이신의 유사체[라팔로그(rapalogue)]는 매일 임상적으로 사용된다. 오늘날의 라팔로그는 우수한 생체이용률과 유통 양을 가지고 있다. 비록 이들이 강력한 면역억제제이지만(자살 유전자를 활성화시키기 위한) 짧은 복용량은 부작용을 최소화해야 한다. 또한, mAb의 투여와 달리, 라파마이신 및 유사체의 약리적 효과는 자살 유전자가 종양을 벗어난 독성 또는 면역 과활성화 증후군과 같은 활성화를 필요로 하는 임상 시나리오에서 아주 유리할 수 있다.

#### [0177] 핵산 서열

[0178] 본 발명의 제2 측면은 본 발명에 따른 키메라 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0179] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", 및 "핵산"은 서로 동의어인 것으로 의도된다.

[0180] 숙련된 사람은 다수의 상이한 폴리뉴클레오타이드 및 핵산이 유전자 암호의 축퇴의 결과로서 동일한 폴리펩타이드를 코딩할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 당업자는 통상적인 기술을 사용하여 폴리펩타이드가 발현되어야 하는 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 용법을 반영하기 위해 본원에 기술된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩타이드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오타이드 치환을 할 수 있음을 이해해야 한다.

[0181] 본 발명의 제2 측면에 따른 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 이들은 단일가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 이들은 또한 그 안에 합성 또는 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드에 대한 수많은 상이한 유형의 변형이 당해 기술에 공지되어 있다. 이들은 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 골격, 분자의 3' 및/또는 5' 말단에 아크리딘 또는 폴리라이신 사슬의 첨가를 포함한다. 본원에서 기재된 바와 같은 용도의 목적상, 폴리뉴클레오타이드는 당해 기술에서 이용가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변형은 관심있는 폴리뉴클레오타이드의 생체내 활성 또는 수명을 증진하기 위해 수행될 수 있다.

[0182] 뉴클레오타이드 서열에 관한 용어들 "변이체", "동족체" 또는 "유도체"는 서열로부터 또는 서열에의 하나(또는 그 이상)의 핵산의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 또는 첨가를 포함한다.

[0183] 본 발명의 이 측면의 제1 실시형태에서, 하기 식을 갖는 키메라 단백질을 코딩하는 핵산이 제공된다:

[0184] Ht1-Ht2-L-Casp

[0185] 여기서,

[0186] Ht1은 제1 이종이량체화 도메인이고;

[0187] Ht2는 제2 이종이량체화 도메인임.

[0188] L은 선택적인 링커이고;

[0189] Casp는 카스파제 도메인임;

[0190] 핵산 서열은 서열 번호 1로서 나타난 키메라 단백질 서열 또는 그것의 변이체를 코딩할 수 있다.

[0191] 예를 들어 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 12로서 나타난 서열을 포함할 수 있다.

[0192] 서열 번호 12(FRB-FKBP12-L3-Casp9)

ATGGCTTCTAGAAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGT  
TTGTACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCT  
ATGATGGAACGGGGCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCTATGGTCGA  
GATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGCAGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGAC  
CTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCCGACGAATCTCAAAGCTCGAGTAT  
AGCGGCGGGCAGCCTGGAGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCAGGCGACGGCAGA  
ACCTTCCCCAAGAGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCACATACCGGCATGCTGGAGGACGGC  
AAGAAGTTCGACAGCAGCCGCGACCGCAATAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAG  
GAGGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAG  
CTGACCATCAGCCCCGACTACGCCTATGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATCATCCACCC  
CACGCCACCCTGGTGTGTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGTCCGGCGGAGGCGGGTCT  
GGAGGAGGCGGCAGCGGCGGGCGGGTCAAGCGTGGATGGCTTCGGCGACGTGGGAGCC  
CTGGAGAGCCTGAGAGGCAACGCCGATCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGC  
CACTGCCTGATCATCAACAACGTGAACCTTCTGCCGGGAGAGCGGCCTGCGGACCCGGACC  
GGCAGCAACATCGACTGCGAGAAGCTGAGGAGGCGCTTCTCCTCCCTGCACTTTATGGTG  
GAGGTGAAAGGCGATCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCCAG  
CAGGACCACGGAGCCCTGGATTGCTGTGTGGTGGTGTGATCCTGTCCCACGGCTGCCAGGCC  
AGCCACCTGCAGTTCCTCCGGAGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGTCCCCTGTCCGTGGAG  
AAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCCTGCCCCCTCCCTGGGCGGCAAGCCCAAGCTG  
TTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTTGAGGTGGCCAGCACC  
TCCCCCGAGGACGAGAGGCCAGGCAGCAACCCCGAGCCCGACGCCACCCCTTCCAGGAG  
GGCCTGCGCACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCACCCCCAGCGACATC  
TTCGTGAGCTACAGCACCTTTCCCGGCTTCGTGAGCTGGCGCGATCCCAAGTCCGGCTCT  
TGGTATGTGGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCATAGCGAGGACCTGCAG  
AGCCTGCTGCTGCGCGTGGCCAATGCCGTGAGCGTGAAGGGCATCTACAAGCAGATGCCA  
GGCTGCTTCAACTTCTGCGGAAGAAGCTGTTCTTCAAGACCAGCGCCTCCTGA

[0193]

[0194] 본 발명의 이 측면의 제2 실시형태에서, 구조식: Ht1-L-Casp를 갖는 키메라 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 제  
공된다

[0195] 여기서,

[0196] Ht1은 이중이량체화 도메인임.

[0197] L은 선택적인 링커이고;

[0198] Casp는 카스파제 도메인임;

[0199] 핵산 서열은 서열 번호 2 또는 3으로서 나타낸 키메라 단백질 서열 또는 그것의 변이체를 코딩할 수 있다.

[0200] 예를 들어 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 13 또는 14로서 나타낸 서열을 포함할 수 있다.

[0201] 서열 번호 13(FKBP12-dCasp9)

ATGCTGGAGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCAGGCGACGGCAGAACCTTCCCCAAG  
AGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCACATACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGTTCGAC  
AGCAGCCGCGACCGCAATAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAGGAGGTGATCAGA  
GGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATCAGC  
CCGACTACGCCTATGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATCATCCACCCACGCCACCCTG  
GTGTTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGTCCGGAGGCGGCTCCGGCTGGATGGCTTC  
GGCGACGTGGGAGCCCTGGAGAGCCTGAGAGGCAACGCCGATCTGGCCTACATCCTGAGC  
ATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTGATCATCAACAACGTGAACCTTCTGCCGGGAGAGCGGC  
CTGCGGACCCGGACCGGCAGCAACATCGACTGCGAGAAGCTGAGGAGGCGCTTCTCCTCC  
CTGCACTTTATGGTGGAGGTGAAAGGCGATCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTG  
CTGGAGCTGGCCCAGCAGCAACCGAGCCCTGGATGCTGTGTGGTGGTGTGATCCTGTCC  
CACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCCGGAGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGT  
CCCGTGTCCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCCTGCCCCCTCCCTGGGC  
GGCAAGCCCAAGCTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTT  
GAGGTGGCCAGCACTCCCCCGAGGACGAGAGCCAGGCAGCAACCCCGAGCCCGACGCC  
ACCCCTTCCAGGAGGGCGTGCACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCC  
ACCCCGAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGCACCTTTCCCGGCTTCGTGAGCTGGCGGAT  
CCCAAGTCCGGCTCTTGGTATGTGGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCAT  
AGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGCGTGGCCAATGCCGTGAGCGTGAAGGGCATC  
TACAAGCAGATGCCAGGCTGCTTCAACTTCTGCGGAAGAAGCTGTTCTTCAAGACCAGC  
GCCTCCTGA

[0202]

[0203] 서열 번호 14(FRB-dCasp9)

```
ATGGCTTCTAGAATCCTCTGGCATGAGATGTGGCATGAAGGCCTGGAAGAGGCATCTCGT
TTGTACTTTGGGGAAAGGAACGTGAAAGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCCTTGCATGCT
ATGATGGAACGGGGCCCCCAGACTCTGAAGGAAACATCCTTTAATCAGGCCCTATGGTCGA
GATTTAATGGAGGCCCAAGAGTGGTGACGGAAGTACATGAAATCAGGGAATGTCAAGGAC
CTCCTCCAAGCCTGGGACCTCTATTATCATGTGTTCGACGAATCTCAAAGCTCGAGTAT
AGCGGGCGGCGCAGCGGCTGGATGGCTTCGGCGACGTGGGAGCCCTGGAGAGCCTGAGA
GGCAACGCCGATCTGGCCTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTGATCATC
AACAAACGTGAACCTTCTGCCGGGAGAGCGGCCCTGCGGACCCGACCGGCAGCAACATCGAC
TGCGAGAAGCTGAGGAGGCGCTTCTCCTCCCTGCACTTTATGGTGGAGGTGAAAGGCGAT
CTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTGCTGGAGCTGGCCCAGCAGGACCACGGAGCC
CTGGATTGCTGTGTGGTGGTGATCCTGTCCACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTC
CCCGGAGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGTCCCGTGTCCGTGGAGAAGATCGTGAACATC
TTCAACGGCACCTCCTGCCCTCCTGGGCGGCAAGCCCAAGCTGTTCTTTATCCAGGCC
TGTGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTTGAGGTGGCCAGCACCTCCCCGAGGACGAG
AGCCACGGCAGCAACCCCCAGCCCCGACGCCACCCCTTCCAGGAGGGCCTGCGCACCTTC
GACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCCCACCCCCAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGC
ACCTTTCCCGGCTTCGTGAGCTGGCGCGATCCCAAGTCCGGCTCTTGGTATGTGGAGACC
CTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCATAGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGC
GTGGCCAATGCCGTGAGCGTGAAGGGCATCTACAAGCAGATGCCAGGCTGCTTCAACTTC
CTGCGGAAGAAGCTGTTCTTCAAGACCAGCGCCTCCTGA
```

[0204]

[0205] 이 제2 실시형태에서, 핵산 서열은 양 키메라 단백질을 코딩하는 컨스트럭트의 형태로 제공될 수 있다.

[0206] 본 컨스트럭트는 하기 식을 갖는 다단백질을 코딩할 수 있다:

[0207] Ht1-L2-Casp-coexpr-Ht2-L2-Casp

[0208] 여기서,

[0209] Ht1은 제1 이중이량체화 도메인이고;

[0210] L1 및 L2는 동일하거나 상이할 수 있는 선택적인 링커이고;

[0211] Coexpr은 두 단백질인: Ht1-L1-Casp 및 Ht2-L2-Casp의 공동발현을 가능하게 하는 서열이고;

[0212] Ht2는 제2 이중이량체화 도메인이고;

[0213] Casp는 카스파제 도메인임.

[0214] 두 카스파제 도메인과 같이, 동일 또는 유사한 서열을 코딩하는 핵산 서열이 있을 때, 본 서열 중 하나는 상동성 재조합을 회피하도록 코돈 위블링될 수 있다.

[0215] 제3 실시형태에서, 하기 구조식을 갖는 서열을 코딩하는 핵산 서열이 제공된다:

[0216] Ht1-Casp-coexpr-Ht2-Ht2

[0217] 여기서,

[0218] Casp는 카스파제 도메인이고;

[0219] Ht1은 제1 이중이량체화 도메인이고;

[0220] Coexpr은 절단 부위와 같이, 단백질 Ht1-Casp 및 Ht2-Ht2의 공동발현을 가능하게 하는 서열이고;

[0221] Ht2는 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에 Ht1과 이중이량체화하는 제2 이중이량체화 도메인임.

[0222] 제2 단백질인 Ht2-Ht2를 코딩하는 서열에서, Ht2를 코딩하는 서열 중 하나는 상동성 재조합을 회피하도록 코돈 위블링될 수 있다.

[0223] 제3 실시형태에 따른 핵산 컨스트럭트는 서열 번호 15로서 나타난 서열을 가질 수 있다.

[0224] 서열 번호 15(FKBP12-Casp9-2A-FRB-FRBw)

ATGCTGGAGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCAGGCGACGGCAGAACCTTCCCCAAG  
AGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTATACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGTTTCGAC  
AGCAGCCGCGACCGCAATAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAGGAGGTGATCAGA  
GGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATCAGC  
CCCCACTACGCCTATGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATCATCCACCCACGCCACCCTG  
GTGTTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGTCCGGAGGCGGCTCCGGCGTGGATGGCTTC  
GGCGACGTGGGAGCCCTGGAGAGCCTGAGAGGCAACGCCGATCTGGCCTACATCCTGAGC  
ATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTGATCATCAACAACGTGAACCTTCTGCCGGGAGAGCGGC  
CTGCGGACCCGACCGGCAGCAACATCGACTGCGAGAAGCTGAGGAGGCGCTTCTCCTCC  
CTGCACCTTTATGGTGGAGGTGAAAGGCGATCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCCCTG  
CTGGAGCTGGCCAGCAGGACCACGGAGCCCTGGATTGCTGTGTGGTGGTGATCCTGTCC  
CACGGCTGCCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCGGAGCCGTGTACGGCACCGACGGCTGT  
CCCGTGTCCGTGGAGAAGATCGTGAACATCTTCAACGGCACCTCCTGCCCTCCCTGGGC  
GGCAAGCCCCAAGCTGTTCTTTATCCAGGCCTGTGGCGGCGAGCAGAAGGACCACGGCTTT  
GAGGTGGCCAGCACCTCCCCGAGGACGAGAGCCCAGGCAGCAACCCCGAGCCCGACGCC  
ACCCCCCTTCCAGGAGGGCCTGCGCACCTTCGACCAGCTGGACGCCATCAGCAGCCTGCC  
ACCCCCAGCGACATCTTCGTGAGCTACAGCACCTTCCCGGCTTCGTGAGCTGGCGCGAT  
CCCAAGTCCGGCTCTTGGTATGTGGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCAT  
AGCGAGGACCTGCAGAGCCTGCTGCTGCGCTGGCCAATGCCGTGAGCGTGAAGGGCATC  
TACAAGCAGATGCCAGGCTGCTTCAACTTCCTGCGGAAGAAGCTGTCTTCAAGACCAGC  
GCCTCCAGTGCACCAATTATGCTTTGCTTAAGCTGGCAGGCGATGTGGAATCAAACCCG  
GGTCTTGGGTACAGGTGGAGACCATCTCTCTGGCGACGGGAGAACATTTCTAAAAGG  
GGCCAAACATGCGTGGTTCACTATACCGGTATGCTGGAGGATGGCAAAAAGTAGACTCC  
AGCCGGGATAGAAAACAAACCCCTTAAGTTCATGCTGGGTAAGCAGGAAGTTATACGGGC  
TGGGAAGAGGGAGTAGCTCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCTCACCG  
GACTACGCCTACGGCGCTACCGGCCACCCTGGCATTATACCACCCCATGCAACTCTCGTC  
TTCGATGTTGATGTGCTCAAACATGGAATCAGGCGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGCGGCAGC  
ATGCTGGAGGGCGTGCAGGTGGAGACCATCAGCCCAGGCGACGGCAGAACCTTCCCCAAG  
AGAGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTATACCGGCATGCTGGAGGACGGCAAGAAGTTTCGAC  
AGCAGCCGCGACCGCAATAAGCCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAGGAGGTGATCAGA  
GGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGAGCGTGGGCCAGAGAGCCAAGCTGACCATCAGC  
CCCCACTACGCCTATGGCGCCACCGGCCACCCCGGCATCATCCACCCACGCCACCCTG  
GTGTTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGAGTCCTGA

[0225]

[0226] 카스파제 서열(들) 또는 FRB 서열과 같이 고도의 유사성을 갖는 핵산 서열은 재조합을 회피하기 위해 코돈 워블 링될 수 있다.

[0227] **핵산 컨스트럭트**

[0228] 본 발명은 또한 하기를 포함하는 핵산 컨스트럭트를 제공한다:

[0229] i) FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및

[0230] ii) mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 코딩하 는 제2 핵산 서열.

[0231] 본 발명은 또한 1종 이상의 키메라 단백질(들) 및 추가의 관심있는 핵산 서열(NOI)을 코딩하는 핵산 서열을 포 함하는 핵산 컨스트럭트를 제공한다. 본 NOI는 예를 들면 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩한다.

[0232] 핵산 서열은 2종 이상의 핵산 서열의 공동 발현을 허용하는 서열에 의해 연결될 수 있다. 예를 들면, 컨스트럭 트는 내부 프로모터, 내부 리보솜 진입 서열(IRES) 서열 또는 절단 부위를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 절 단 부위는 폴리펩타이드가 생산될 때 임의의 외부 절단 활성의 필요 없이 별개의 단백질로 즉시 절단되도록 자 가 절단될 수 있다.

[0233] 서열 번호 16 또는 17로서 나타난 서열을 가지는, 구제역 바이러스(FMDV) 2a 자가 절단 펩타이드를 포함하여, 다양한 자가 절단 부위가 공지되어 있다:

[0234] 서열 번호 16

[0235] RAEGRGSLLTCGDVEENPGP .

- [0236] 또는
- [0237] 서열 번호 17
- [0238] QCTNYALLKLAGDVESNPGP
- [0239] 공동 발현 서열은 내부 리보솜 진입 서열(IRES)일 수 있다. 공동 발현 서열은 내부 프로모터일 수 있다.
- [0240] **T 세포 수용체(TCR)**
- [0241] T 세포 수용체 또는 TCR은 구조적 적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 T 세포의 표면에서 발견되는 분자이다. TCR과 항원 사이의 결합은 상대적으로 낮은 친화도로 퇴화된다: 많은 TCR이 동일한 항원을 인식하고 많은 항원이 동일한 TCR에 의해 인식된다.
- [0242] TCR은 2개의 상이한 단백질 사슬로 구성되며, 즉 이것은 이종이량체이다. T 세포의 95%에서, 이것은 알파( $\alpha$ ) 및 베타( $\beta$ ) 사슬로 구성되는 반면 T 세포의 5%에서는 감마 및 델타( $\gamma/\delta$ ) 사슬로 구성된다. 이 비율은 개체 발생 및 이환 상태에서 변한다.
- [0243] TCR이 항원성 펩타이드 및 MHC(펩타이드/MHC)와 결합할 때, T 림프구는 관련 효소, 보조 수용체, 특수화된 어댑터 분자 및 활성화되거나 방출된 전사 인자에 의해 매개되는 일련의 생화학적 사건을 통해 활성화된다.
- [0244] 본 발명의 핵산 컨스트럭트 또는 벡터는 TCR  $\alpha$  사슬, TCR  $\beta$  사슬, TCR  $\gamma$  사슬 또는 TCR  $\delta$  사슬을 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이것은 예를 들면, TCR  $\alpha$  사슬을 코딩하는 핵산 서열 및 TCR  $\beta$  사슬을 코딩하는 핵산 서열; 또는 TCR  $\gamma$  사슬을 코딩하는 핵산 서열 또는 TCR  $\delta$  사슬을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 두 핵산 서열은 두 TCR 사슬, 예컨대 내부 프로모터, IRES 서열 또는 절단 부위 예컨대 자가-절단 부위의 공동 발현을 가능하게 하는 서열에 의해 연결될 수 있다.
- [0245] **키메라 항원 수용체(CAR)**
- [0246] 관심있는 핵산 서열(NOI)은 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩할 수 있다.
- [0247] 고전적 CAR는 세포의 항원 인식 도메인(결합제)을 세포 내 신호전달 도메인(엔도도메인)에 연결시키는 키메라성 유형 I 막통과 단백질이다. 결합제는 전형적으로 단클론성 항체(mAb)로부터 유래된 단일 사슬 가변 단편(scFv)이지만, 리간드와 같은 항원 결합 부위를 포함하는 다른 포맷에 기초될 수 있다. 막으로부터 결합제를 분리하고 적절한 배향을 허용하기 위해서는 스페이서 도메인이 필요할 수 있다. 사용된 일반적인 스페이서 도메인은 IgG1의 Fc이다. 보다 콤팩트한 스페이서는 예를 들면 항원에 의존하여 CD8 $\alpha$ 로부터 줄기와 심지어 단지 IgG1 힌지 단독만으로 충분할 수 있다. 막 통과 도메인은 세포막의 단백질을 고정시키고 스페이서를 세포내 신호전달 도메인을 포함하거나 이들과 결합할 수 있는 엔도도메인에 연결시킨다.
- [0248] 초기 CAR 디자인은 Fc  $\epsilon$  R1 또는 CD3  $\xi$ 의  $\gamma$  사슬의 세포내 부분으로부터 유도된 세포내 신호전달 도메인을 가진다. 결과적으로, 이들 제1 세대 수용체는 면역학적 신호 1을 전달했는데, 동종 표적 세포의 T 세포 사멸을 유발하기에 충분했지만 T 세포를 완전히 활성화시키지 못해서 증식하고 생존하였다. 이 제한을 극복하기 위해 화합물 신호전달 도메인이 구축되었다: CD3  $\xi$ 의 것에 T 세포 공동 자극 분자의 세포내 부분의 융합은 항원 인식 후 활성화 및 공동 자극 신호를 동시에 전송할 수 있는 제2 세대 수용체를 초래한다. 가장 통상적으로 사용된 공동 자극 도메인은 CD28의 것이다. 이것은 가장 강력한 공동 자극 신호 - 즉 T 세포 증식을 촉발하는 면역학적 신호 2를 공급한다. 생존 신호를 전달하는 밀접하게 관련된 OX40 및 41BB와 같은, TNF 수용체 계열 엔도도메인을 포함하는 일부 수용체가 또한 기술되었다. 활성화, 증식 및 생존 신호를 전달할 수 있는 세포내 신호 전달 도메인을 갖는 더욱더 강한 제3 세대 CAR가 기술되었다.
- [0249] CAR 코딩 핵산은, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포로 이동될 수 있다. 이런 식으로, 입양 세포 이식을 위한 다수의 항원 특이적 T 세포가 생성될 수 있다. CAR이 표적 항원에 결합할 때, 이것은 그것이 발현되는 T 세포에 활성화 신호를 전달한다. 따라서, CAR은 T 세포의 특이성 및 세포독성이 표적화된 항원을 발현하는 세포를 향하도록 지시한다.
- [0250] **벡터**
- [0251] 제3 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열 또는 핵산 컨스트럭트를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0252] 본 발명은 또한 본 발명의 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 핵산 컨스트럭트(들) 및 선택적으로 하나 이상의 추가의 관심있는 핵산 서열(NOI)을 포함하는 벡터 또는 벡터의 키트를 제공한다. 이러한 벡터는 핵산 서열(들) 또

는 핵산 컨스트럭트(들)을 숙주 세포 내로 도입하기 위해 사용될 수 있어, 이것은 본 발명의 제1 측면에 따른 하나 이상의 키메라 단백질(들) 및 선택적으로 하나 이상의 다른 관심있는 단백질(POI)을 발현한다. 본 키트는 또한 CID를 포함할 수 있다.

- [0253] 본 벡터는 예를 들면, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터, 또는 트랜스포존 기반 벡터 또는 합성 mRNA일 수 있다.
- [0254] 본 벡터는 T 세포를 형질감염 또는 형질도입시킬 수 있다.
- [0255] NOI는 예를 들면, 벡터가 표적 세포를 형질도입하는 데 사용될 때 표적 세포가 키메라 단백질 및 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 공동 발현하도록 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체를 코딩할 수 있다.
- [0256] **세포**
- [0257] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면에 따른 키메라 단백질을 포함하는 세포에 관한 것이다.
- [0258] 본 세포는 본 발명의 제1 측면의 제1 실시형태에 따른 두 이중이량체화 도메인을 갖는 키메라 단백질을 발현할 수 있다.
- [0259] 본 세포는 두 키메라 단백질을 발현할 수 있다; FK506 결합 단백질(FKBP)을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 하나; 및 mTOR의 FRB 도메인을 포함하는 이중이량체화 도메인과 카스파제 도메인을 포함하는 하나로, 본 발명의 제1 측면의 제2 실시형태에 따름.
- [0260] 다음 두 단백질을 발현하는 세포가 또한 제공된다:
- [0261] Ht1-Casp 및 Ht2-Ht2
- [0262] 여기서, Ht1-Casp는 카스파제 도메인(Casp) 및 제1 이중이량체화 도메인(Ht1)을 포함하는 키메라 단백질이고; Ht2-Ht2는 두 제2 이중이량체화 도메인(Ht2)을 포함하는 계면 단백질이며, 이량체화의 화학적 유발제(CID)의 존재 하에, 한 쌍의 키메라 단백질 Ht1-Casp9가, 각 키메라 단백질로부터의 Ht1이 계면 단백질로부터의 Ht2 도메인과 이중이량체화하여, 두 카스파제 도메인의 동중이량체화를 유발하도록 상호작용하도록 된다(도 1d 참고).
- [0263] 본 세포는 예를 들면, 면역 세포 예컨대 T 세포 또는 자연 살해(NK) 세포일 수 있다.
- [0264] 본 세포는 줄기세포 예컨대 조혈모세포일 수 있다.
- [0265] 세포 매개 면역력에서 중심적 역할을 하는 림프구의 유형인 T 세포 또는 T 림프구. 이들은 세포 표면 상의 T 세포 수용체(TCR)의 존재에 의해, 다른 림프구, 예컨대 B 세포 및 천연 살해 세포(NK 세포)와 구별될 수 있다. 아래에 요약된 바와 같이 다양한 유형의 T 세포가 있다.
- [0266] 헬퍼 T 도움 세포(TH 세포)는 형질 세포 및 기억 B 세포 안으로 B 세포의 성숙, 및 세포독성 T 세포와 대식세포의 활성화를 포함하여 면역적 과정에서 다른 백혈구를 돕는다. TH 세포는 그것의 표면에 CD4를 발현한다. TH 세포는 이들이 항원 제시 세포(APC)의 표면에 MHC 부류 II 분자에 의해 펩타이드 항원으로 제시될 때 활성화된다. 이들 세포들은 TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 또는 TFH를 포함하여 여러 개의 하위유형 중 하나로 분화할 수 있어, 상이한 유형의 면역 반응을 촉진시키는 상이한 사이토카인을 분비한다.
- [0267] 세포용해 T 세포(TC 세포, 또는 CTL)는 바이러스로 감염된 세포와 종양 세포를 파괴하며 이식 거부에도 또한 연루된다. CTL은 그것의 표면에 CD8을 발현한다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면에 존재하는 MHC 부류 I과 관련된 항원에 결합함에 의해 그것의 표적을 인식한다. 조절 T 세포에 의해 분비되는 IL-10, 아데노신 및 다른 분자를 통해, CD8+ 세포는 실험적 자가면역 뇌척수염과 같은 자가면역 질환을 예방하는 아네르기의 상태로 불활성화될 수 있다.
- [0268] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후 장기간 지속되는 항원 특이적 T 세포의 서브셋이다. 그들은 그것의 동족 항원에 재노출될 때 많은 수의 이펙터 T 세포로 빠르게 확장되며 따라서 면역계에 과거의 감염에 대한 "기억"을 제공한다. 기억 T 세포는: 중심 기억 T 세포(TCM 세포) 및 두 유형의 이펙터 기억 T 세포(TEM 세포 및 TEMRA 세포)의 3가지 하위유형을 포함한다. 기억 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 중 하나일 수 있다. 기억 T 세포는 전형적으로 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.
- [0269] 이전에 억제제 T 세포로 알려진 조절 T 세포(Treg 세포)는 면역학적 내성의 유지에 결정적이다. 그것의 주요 역할은 면역 반응의 끝날 무렵에 T 세포 매개된 면역력을 차단하고 흉선에서 음성 선택의 과정을 벗어난 자동 반

응성 T 세포를 억제하는 것이다.

- [0270] 천연 발생 Treg 세포 및 적응성 Treg 세포의 두 가지 주요한 클래스의 CD4+ Treg 세포가 기술되어있다.
- [0271] 천연 발생 Treg 세포(CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포로도 공지됨)는 흉선에서 발생하며 TSLP로 활성화된 골수(CD11c+)와 형질세포양(CD123+) 수지상 세포 양자로 T 세포를 발생시키는 사이에 상호작용과 연결된다. 천연 발생 Treg 세포는 FoxP3으로 불리는 세포내 분자의 존재에 의해 다른 T 세포와 구별될 수 있다. FOXP3 유전자의 돌연변이는 조절 T 세포 발달을 방지할 수 있어, 치명적인 자가면역 질환 IPEX를 유발한다.
- [0272] 적응성 Treg 세포(Tr1 세포 또는 Th3 세포로도 공지됨)는 정상의 면역 반응 도중에 발생할 수 있다.
- [0273] 천연 살해 세포(또는 NK 세포)는 선천성 면역계의 일부를 형성하는 세포용해 세포의 한 유형이다. NK 세포는 MHC 독립 방식으로 바이러스로 감염된 세포로부터 타고난 신호에 신속한 반응을 제공한다
- [0274] NK 세포(선천성 림프양 세포의 군에 속함)는 큰 과립 림프구(LGL)로 정의되고 B 및 T 림프구를 발생하는 일반 림프양 조상세포로부터 분화된 제3 종류의 세포를 구성한다. NK 세포는 이들이 그 후, 순환으로 되는 골수, 림프절, 비장, 편도 및 흉선에서 분화되고 성숙하는 것으로 알려져 있다.
- [0275] 줄기세포는 특수 세포로 분화할 수 있는 미분화 세포이다. 포유동물에는 두 가지 넓은 유형의 줄기세포가 있다: 배반포의 내부 세포 덩어리로부터 단리된 배아 줄기세포 및 다양한 조직에서 발견되는 성체 줄기세포. 성인 유기체에서 줄기세포와 선조 세포는 성체 조직을 보충하는 신체에 대해 치유 시스템으로 작용한다. 발달하는 배아에서 줄기세포는 외배엽, 내배엽 및 중배엽(유도 만능 줄기세포 참고) 같은 모든 특수화된 세포로 분화할 수 있지만, 또한 혈액, 피부 또는 장 조직과 같은 재생성 기관의 정상적 턴오버를 유지한다.
- [0276] 인간에서 자가조직 성체 줄기세포의 세 가지 공지된 접근가능한 공급원이 있다:
- [0277] 1. 채취, 즉 골 안으로 드릴링함에 의해 추출을 요하는 골수.
- [0278] 2. 지방 흡인에 의한 추출을 요하는 지방 조직.
- [0279] 3. 분리반출법을 통한 추출을 요하는 혈액으로, 여기서 혈액은 공여자로부터 인출되고 줄기세포를 추출하고 공여자에게 혈액의 다른 부분을 돌려보내는 기계를 통과한다.
- [0280] 성체 줄기세포는 예를 들면, 골수 이식에서와 같이 의학 요법에 빈번하게 사용된다. 줄기세포는 이제 근육이나 신경과 같은 다양한 조직의 세포와 일치된 특성을 가진 특화된 세포 유형으로 인공적으로 성장 및 전환(분화)될 수 있다. 배아 세포주 및 체세포-세포 핵전이 또는 탈분화를 통해 생성된 자가조직 배아 줄기세포는 또한 세포 요법을 위한 특화된 세포 유형을 생성하는 데 사용될 수 있다.
- [0281] 조혈모세포(HSC)는 모든 다른 혈구를 생성시키고 중배엽으로부터 유도된 혈구이다. 이들은 대부분 뼈의 코어에 함유된 적색 골수에 위치하고 있다.
- [0282] 이들은 골수(단핵구 및 대식세포, 중성구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구/혈소판, 수지상 세포), 및 림프양 계통(T 세포, B 세포, NK 세포)을 생기게 한다. 조혈 조직은 장기간 및 단기간 재생 능력을 지닌 세포와 얽힌 다능성, 협능성 및 단능성 조상세포를 함유한다.
- [0283] HSC는 이중 집단이다. 세 가지 부류의 줄기세포가 존재하며, 혈액에서 림프양 대 골수계통의 자손의 그것의 비(L/M)로 구별된다. 골수 편향된(My-bi) HSC는 낮은 L/M 비(0과 3 사이)를 가지는 반면 림프양 편향된(Ly-bi) HSC는 큰 비(> 10)를 나타낸다. 제3 범주는 균형있는(Bala) HSC로 구성되며, 그의 L/M 비는 3 내지 10 사이이다. 단지 골수 편향된 및 균형있는 HSC 만이 내구성 자기 재생 특성을 가진다.
- [0284] 본 발명의 키메라 단백질 발현 세포는 임의의 상기 언급된 세포 유형일 수 있다.
- [0285] 본 발명의 제1 측면에 따른 1종 이상의 키메라 단백질(들)을 발현하는 T 또는 NK 세포는 환자 자신의 말초 혈액(제1 당사자)으로부터 또는 공여체 말초 혈액(제2 당사자)으로부터 이식된 조혈모세포, 또는 비연결된 공여체(제3 당사자)로부터 말초 혈액의 설정에서 생체 외에서 생성될 수 있다.
- [0286] 대안적으로, 본 발명의 제1 측면에 따른 1종 이상의 키메라 단백질(들)을 발현하는 T 또는 NK 세포는 유도성 선조 세포 또는 배아 선조 세포의 생체외 분화로부터 T 세포로 유도될 수 있다. 대안적으로, 그것의 용혈적 기능을 보유하고 치료제로서 작용할 수 있는 불멸화된 T 세포주를 사용할 수 있다.
- [0287] 모든 이들 실시형태에서, 키메라 단백질(들) 발현 세포는 바이러스 벡터로 형질도입 또는 DNA 또는 RNA로 형

질감염과 같은 수단에 의해, 키메라 단백질, 또는 각각의 키메라 단백질 및 선택적으로 NOI를 코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입함에 의해 생성된다.

[0288] 본 발명의 세포는 대상체로부터 생체의 T 또는 NK 세포일 수 있다. T 또는 NK 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플로부터의 것일 수 있다. T 또는 NK 세포는, 예를 들면 항-CD3 단클론성 항체로 처리에 의해, 본 발명의 제1 측면에 따른 1종 이상의 키메라 단백질(들)을 코딩하는 핵산으로 형질도입되기 전에 활성화되고/되거나 팽창될 수 있다.

[0289] 본 발명의 T 또는 NK 세포는:

[0290] (i) 상기 열거된 대상체 또는 다른 공급원으로부터 T 또는 NK 세포-함유 샘플의 분리; 및

[0291] (ii) 본 발명의 제2 측면에 1종 이상의 핵산 서열(들)로 상기 T 또는 NK 세포의 형질도입 또는 형질감염에 의해 제작될 수 있다.

[0292] 본 발명은 또한 본 발명의 제1 측면에 따른 1종 이상의 키메라 단백질(들)을 포함하는 T 또는 NK 세포 및 CID를 포함하는 키트를 제공한다.

[0293] 약학 조성물

[0294] 본 발명은 또한 본 발명의 제4 측면에 따른 복수의 세포를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 약학 조성물은 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 본 약학 조성물은 선택적으로 1종 이상의 추가의 약학적으로 활성 폴리펩타이드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 그와 같은 제형은 예를 들면, 정맥내 주입에 적합한 형태로 될 수 있다.

[0295] 방법

[0296] 본 발명은 또한 본 발명의 제3 측면에 따른 벡터를 갖는 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계를 포함하는 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 제작하는 방법을 제공한다.

[0297] 벡터는 예를 들면, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0298] 본 발명은 또한 CID, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체에 세포를 노출시키는 단계를 포함하는 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 결실시키는 방법을 제공한다. 세포는 생체내 또는 시험관 내에서 CID에 노출될 수 있다. 세포의 결실은 카스파제 도메인의 CID 유도된 동종이량체화가 따르는, 카스파제 활성화에 의해 유도된 세포자멸사에 의해 유발될 수 있다.

[0299] CID는 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 본 약학 조성물은 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함할 수 있다. 본 약학 조성물은 선택적으로 1종 이상의 추가의 약학적으로 활성 폴리펩타이드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 그와 같은 제형은 예를 들면, 정맥내 주입에 적합한 형태로 될 수 있다.

[0300] 본 발명은 또한 대상체에게 CID, 예컨대 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포의 투여에 의해 유발된 대상체에서 병리적 면역 반응을 예방하고/하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0301] 상기 병리적 면역 반응은 하기 군으로부터 선택될 수 있다: 이식편 대 숙주 질환; 종양 이외의 표적에 작용하는 독성; 면역 활성화 증후군; 및 림프증식성 질환.

[0302] 본 발명은 또한 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포의 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다. 상기 세포는 상기에서 정의된 바와 같은 약학 조성물의 형태로 될 수 있다.

[0303] 본 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0304] (i) 본 발명의 제3 측면에 따른 벡터로 대상체로부터 분리된 세포의 샘플을 형질도입 또는 형질감염시키는 단계, 및

[0305] (ii) 상기 형질도입된/형질감염된 세포를 환자에 투여하는 단계.

[0306] 질환을 치료하는 방법은 본 발명의 치료 용도에 관한 것이다. 본 명세서에서, 상기 세포는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 완화, 감소 또는 개선하고/하거나 질환의 진행을 늦추거나, 감소시키거나 또는 차단하기 위해 현존하는 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다.

- [0307] 질환을 예방하는 방법은 본 발명의 면역 세포의 예방적 용도에 관한 것이다. 본 명세서에서, 이러한 세포는 질환의 원인을 방지하거나 손상하기 위해 또는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상의 전개를 감소하거나 방지하기 위해 아직 질환에 걸리지 않고/않거나 질환의 임의의 증상을 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 대상체는 질환에 걸리기 쉬운 경향이 있거나 질환의 발병 위험이 있다고 생각될 수 있다.
- [0308] 본 발명에 의해 제공되는 질환을 치료하는 방법은 질환의 진행을 모니터링하고 임의의 독성 활성을 모니터링하고 허용 가능한 수준의 질환 진행 및 독성 활성을 제공하도록 대상체에게 투여된 CID의 용량을 조절하는 것을 포함할 수 있다.
- [0309] 질환의 진행을 모니터링하는 것은 경시적으로 질환과 관련된 증상을 평가하여 그들이 감소하는/개선하는 또는 증가하는/악화하는 지를 결정하는 것을 의미한다.
- [0310] 독성 활성은 대상체에게 그것의 투여에 따른 본 발명의 세포에 의해 유발된 역효과에 관한 것이다. 독성 활성은 예를 들어 면역학적 독성, 담도성 독성 및 호흡기 곤란 증후군을 포함할 수 있다.
- [0311] 특히 본 발명은 하기 단계를 포함하는 대상체에서 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다:
- [0312] (i) 상기 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포를 투여하는 단계;
- [0313] (ii) 병리적 면역 반응의 발달에 대해 상기 대상체를 모니터링하는 단계; 및
- [0314] (iii) 상기 대상체가 병리적 면역 반응을 발달시키고 있거나 발달시켰다는 징후를 나타낼 경우, 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 상기 피험체에게 투여하는 단계.
- [0315] 본 발명은 질환을 치료하고/하거나 예방하는 데 사용하기 위한 본 발명의 세포를 제공한다.
- [0316] 본 세포는 예를 들면, 조혈모세포 이식, 림프구 주입 또는 입양 세포 이식에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0317] 본 발명은 또한 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에 본 발명의 세포의 사용에 관한 것이다.
- [0318] 본 발명은 또한 독성 활성의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 제1 측면에 따른 키메라 단백질을 이량체화하는 것을 유도할 수 있는 CID 제제를 제공한다.
- [0319] 본 발명은 또한 세포에서 본 발명의 제1 측면에 따른 키메라 단백질의 한 쌍의 카스파제 도메인을 활성화하는 데 사용하기 위한 CID 제제를 제공한다.
- [0320] 본 발명의 세포 및 방법에 의해 치료되고/되거나 예방되는 질환은 감염, 예컨대 바이러스성 감염일 수 있다.
- [0321] 본 발명의 방법은 또한 예를 들면 자가면역 질환, 알러지 및 이식편 대 숙주 거부에서 병원성 면역 반응의 조절을 위한 것일 수 있다.
- [0322] 본 발명의 세포가 TCR 또는 CAR을 발현하는 경우, 이들은 암성 질환, 예컨대 방광암, 유방암, 결장암, 자궁내막암, 신장암(신장 세포), 백혈병, 폐암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암 및 갑상선암의 치료에 유용할 수 있다.
- [0323] 본 발명의 TCR/CAR 발현 세포는 표적 세포, 예컨대 암 세포를 사멸시킬 수 있다.
- [0324] 본 발명은 또한 대상체에게 본 발명의 제4 측면에 따른 세포의 투여에 의해 유발된 병리적 면역 반응을 예방하거나 치료하는 데 사용하기 위한 라파마이신 또는 라파마이신 유사체를 제공한다.
- [0325] 본 발명의 세포는 변형된 또는 비변형된 세포가 환자에게 투여되는 임의의 세포성 요법에 사용될 수 있다. 세포성 요법의 예는 CD34+ 줄기세포 이식 후 입양 T 세포 전이이다. 줄기세포 전이 후 T 세포를 투여하는 것은 수령체 환자의 면역계의 재구성을 가속하는 것을 돕는다. 매칭된 관련이 있거나 관련이 없는 공여체가 이용불가능하거나 광범위한 공여체 검색에 대해 질병이 너무 공격적일 경우 HLA 홀배수동종 가족 공여체의 사용이 효과적일 수 있다. 이러한 공여체는 부모, 형제 자매 또는 제2 등급 친척이 될 수 있다. 이러한 주입은 면역 회복을 증진할 수 있고 이로써 바이러스 감염을 줄이고 재발하는 백혈병 세포를 제거할 수 있다. 그러나, 공여체 줄기세포 이식편에서 동족반응성 T 세포의 공존은 공여체 세포가 수령체에 대해 반응하여 이식편 대 숙주 질환(GvHD)을 유발할 수 있어, 수령체의 피부, 소화관, 간, 및 다른 기관을 점진적으로 손상을 줄 수 있다.
- [0326] 세포 요법의 다른 예는 원상태 세포 또는 이중성 유전자를 발현하도록 유전자 상으로 조작된 세포를 포함한다. 이들 치료는 혈액 장애를 포함하는 많은 장애에 사용되지만 이들 요법은 부작용이 있을 수 있다. 또 다른 방법으로, 예를 들어, 간엽 간질 세포와 같은 많은 유형의 성숙 세포로 분화할 수 있는 미성숙 선조 세포가 이환 세

포의 기능을 대체함으로써 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 세포성 요법에 사용된 공여체 세포의 가능한 부정적 효과를 제거하기 위한 신속하고 유효한 기전을 제공한다.

[0327] 본 발명은, 본 발명에 따른 백터로 공여체 세포 배양에 인간 공여체 T 세포를 형질감염시키거나 형질도입하는 단계; 형질도입되거나 형질감염된 공여체 T 세포를 환자에게 투여하는 단계; 그 뒤에 환자에서 이식편 대 숙주 질환의 존재 또는 부재를 검출하는 단계; 및 이식편 대 숙주 질환의 존재가 검출된 환자에게 이량체화의 화학적 유발제(CID)를 투여하는 단계를 포함하는, 공여체 T 세포 이식에 따른 인간 환자에서 이식편 대 숙주 질환의 효과를 감소시키는 방법을 제공한다. T 세포는 비 동족감손(non-allodeplete)될 수 있다.

[0328] 본 발명은 인간 환자에게 흉배수동종 줄기세포 이식을 투여하는 단계; 및 환자에게 흉배수동종 공여체 T 세포를 투여하는 단계를 포함하는 줄기세포 이식의 방법을 제공하며, 여기서 상기 T 세포는 본 발명에 따른 백터로 흉배수동종 공여체 세포 배양에서 형질감염되거나 형질도입된다.

[0329] 상기 세포는 공여체 세포 배양에서 비 동족감손된 인간 공여체 T 세포일 수 있다.

[0330] 본 발명은 또한 인간 환자에게 흉배수동종 줄기세포 이식을 투여하는 단계; 및 환자에게 비 동족감손된 흉배수동종 공여체 T 세포를 투여하는 단계를 포함하는 줄기세포 이식의 방법을 제공하며, 여기서 상기 T 세포는 본 발명에 따른 백터로 흉배수동종 공여체 세포 배양에서 형질감염되거나 형질도입된다.

[0331] 흉배수동종 줄기세포 이식은 CD34+ 흉배수동종 줄기세포 이식일 수 있다. 인간 공여체 T 세포는 환자의 T 세포이 흉배수동종일 수 있다. 환자는 줄기세포 이식에 의해 완화될 수 있는 임의의 질환 또는 장애일 수 있다. 환자는 고형 종양 또는 혈액이나 골수암과 같은 암을 가질 수 있다. 환자는 혈액 또는 골수 질환을 가질 수 있다. 환자는 겸상 적혈구 빈혈 또는 이염성 백질이영양증을 가질 수 있다.

[0332] 공여체 세포 배양은 골수 샘플 또는 말초 혈액으로부터 제조될 수 있다. 공여체 세포 배양은 공여체 말초 혈액 단핵 세포로부터 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 공여체 T 세포는 형질감염 또는 형질도입 전에 공여체 세포 배양으로부터 동종감손된다. 형질도입된 또는 형질감염된 T 세포는 환자에게 투여 전에 IL-2의 존재 하에 배양될 수 있다.

[0333] 본 발명은 이제 본 발명을 수행함에 있어 당해 분야의 숙련가를 돕기 위해 제공되는 것으로 의미되고 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는 실시예의 방식에 의해 추가로 기술될 것이다.

## [0334] 실시예

### [0335] 실시예 1 - 키메라 단백질을 발현하는 T 세포의 생성

[0336] T 세포를 다양한 컨스트럭트로 형질도입시켰다. 2-분자 rapCasp9(도 1a)에 대해, T 세포를 다음 두 백터로 형질도입시켰다: 내부 리보솜 진입 서열을 이용하여, 녹색 형광 단백질 eGFP와 공동 발현되는 FKBP12-Casp9를 코딩하는 것과 청색 형광 단백질 eBFP2와 공동 발현되는 FRB-Casp9를 코딩하는 다른 것. 한 분자 rapCasp9(도 1b)에 대해, T 세포를 eGFP와 공동 발현된 각각의 rapCasp9를 코딩하는 단 하나의 백터로 형질도입시켰다. FKBP12-Casp9 및 FRB-FRBw를 제공한 컨스트럭트는 트리-시스템 카세트에 코딩되었고, 이로써 FKBP12-Casp9 및 FRB-FRBw는 FMD-2A 유사 펩타이드를 사용하여 공동 발현되었고 eGFP는 IRES와 공동 발현되었다. T 세포를 의도적으로 단지 부분적으로 형질도입시켰으므로, 세포 배양물 내에서 일정 비율의 세포가 내부 음성 대조군으로 작용하도록 비형질도입된 상태로 남아 있었다. 추가의 대조군으로서, 형질도입된 세포에 대한 라파마이신의 비특이적 효과를 배제하기 위해, T 세포를 eGFP만을 코딩하는 백터로 형질도입시켰다.

### [0337] 실시예 2 - 라파마이신을 이용한 키메라 단백질을 발현하는 세포의 결실 테스트

[0338] T 세포를 다양한 농도의 라파마이신에 노출시키고 48시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, T 세포를 아넥신-V 및 7AAD로 염색하고, 유세포분석법에 의해 분석하였다. 생세포를 게이팅하고 형광 단백질을 발현하는 세포의 집단을 조사함으로써, 형질도입 집단과 비형질도입 집단의 생존율을 명확하게 측정할 수 있었다. 이중 FRB-Casp9 및 FKBP12-Casp9 접근법은 예상대로 단지 이중 양성 세포의 유효한 결실을 유도하였다. FKBP12-FRB-Casp9 컨스트럭트는 단일 양성 세포의 유효한 결실을 유도하였다. FKBP12-Casp9-FRB 컨스트럭트는 최소한의 결실을 유도하였다. FKBP12-Casp9/FRB-FRBw는 단일 양성 세포의 유효한 결실을 유도하였다. 대조군은 특이적 결실을 유도하지 않았다(도 2 및 도 3).

### [0339] 실시예 3 - 컨스트럭트의 확장된 세트의 테스트

[0340] 도 5에 도시된 컨스트럭트를 생성하여 주르카트 세포 내로 형질도입시켰다. 형질도입된 세포는 집단 내에 컨스

트럭트 양성 세포와 음성 세포를 둘 다 갖도록 비형질도입(NT) 세포와 혼합하였다. 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM 및 1000 nM 농도로 라파마이신을 첨가하고, 세포를 24 시간 동안 배양하였다. 회수한 후, 세포를 PI 및 아넥신 V로 염색하고 FACS로 분석하였다. 결과는 도 6 내지 9에 도시되어 있고 도 10에 요약되어 있다.

[0341] 본 발명의 제1 측면의 제1 실시형태에 따라 정의된 입체배치를 갖는 컨스트럭트, 즉 MP20244는 이 어세이에서 아주 잘 수행하여, 1 nM을 포함하여 그 이상의 라파마이신의 모든 농도에서 형질감염된 세포의 매우 효율적인 사멸을 제공하였다.

[0342] 본 발명의 제1 측면의 제2 실시형태에 따라 정의된 입체배치를 갖는 한 쌍의 컨스트럭트, 즉 MP20206 및 MP20207 또한 아주 잘 수행하여, 1 nM을 포함하여 그 이상의 라파마이신의 모든 농도에서 형질감염된 세포의 매우 효율적인 사멸을 제공하였다.

[0343] 본 발명의 제1 측면의 제3 실시형태에 따라 정의된 입체배치를 갖는 컨스트럭트, 즉 MP20265 또한 잘 수행하여, 1 nM 라파마이신에서 약간의 사멸 및 10 nM을 포함하여 그 이상의 라파마이신의 농도에서 효율적인 사멸을 제공하였다.

[0344] 본 발명의 제1 측면의 제4 실시형태에 따라 정의된 입체배치를 갖는 컨스트럭트, 즉 MP20263, MP20264 및 MP21067은 1 nM 라파마이신에서 잘 수행하였지만, 보다 높은 농도의 라파마이신에서 사멸은 보다 덜 효율적이었다.

#### [0345] 실시예 4 - 템시폴리무스를 이용한 컨스트럭트 테스트

[0346] 실시예 3에 기재된 것과 동일한 실험으로, 도 5에 도시된 컨스트럭트를 발현하는 세포를 라파마이신과 라파마이신 유사체인 템시폴리무스 둘 다로 처리하였다.

[0347] 실시예 3에 개요를 정리한 실험에서와 같이, 형질도입된 주르카트 세포를 비형질도입(NT) 세포와 혼합하여, 컨스트럭트를 발현하는 세포 및 비형질도입 세포 둘 다를 포함하는 집단을 얻었다.

[0348]  $2 \times 10^5$  개 세포/웰 농도의 세포를 처리하지 않거나 하기 농도의 라파마이신 또는 템시폴리무스로 처리하였다: (라파마이신 또는 템시폴리무스 중 어느 하나) 0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM, 10 nM.

[0349] 세포를 24 시간 동안 배양한 후, 아넥신 V 및 PI로 염색하고, FACS로 분석하였다. 결과는 도 11에 도시되어 있다.

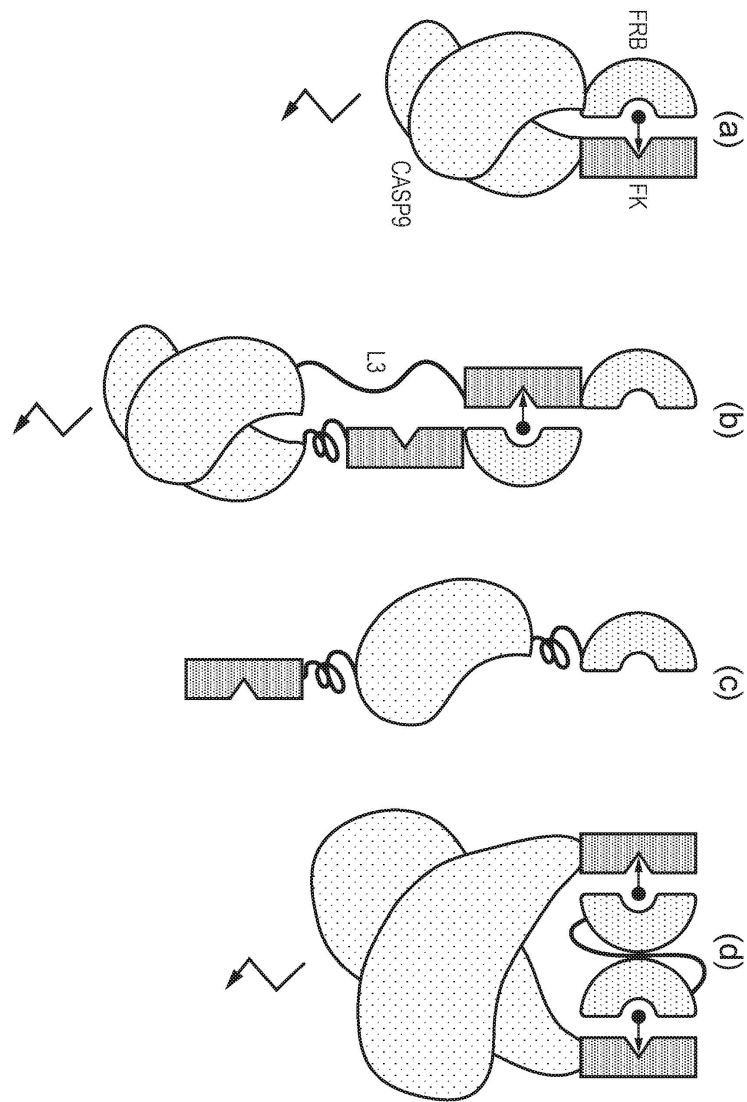
[0350] 앞서 라파마이신의 존재 하에 관찰된 것과 같이, 템시폴리무스의 존재 하에, 도 5에 도시된 다양한 컨스트럭트에 대해 동일한 패턴의 주르카트 세포 사멸이 관찰되었다.

[0351] 특히, 본 발명의 제1 측면의 제1 실시형태에 따라 정의된 입체배치를 갖는 컨스트럭트 MP20244; 및 본 발명의 제1 측면의 제2 실시형태에 따라 정의된 입체배치를 갖는 컨스트럭트 쌍 MP20206와 MP20207 양자는 잘 수행하였다. 둘 다 1 nM을 포함한 상기 템시폴리무스의 모든 농도에서 형질감염된 세포의 효율적인 사멸을 제공하였다.

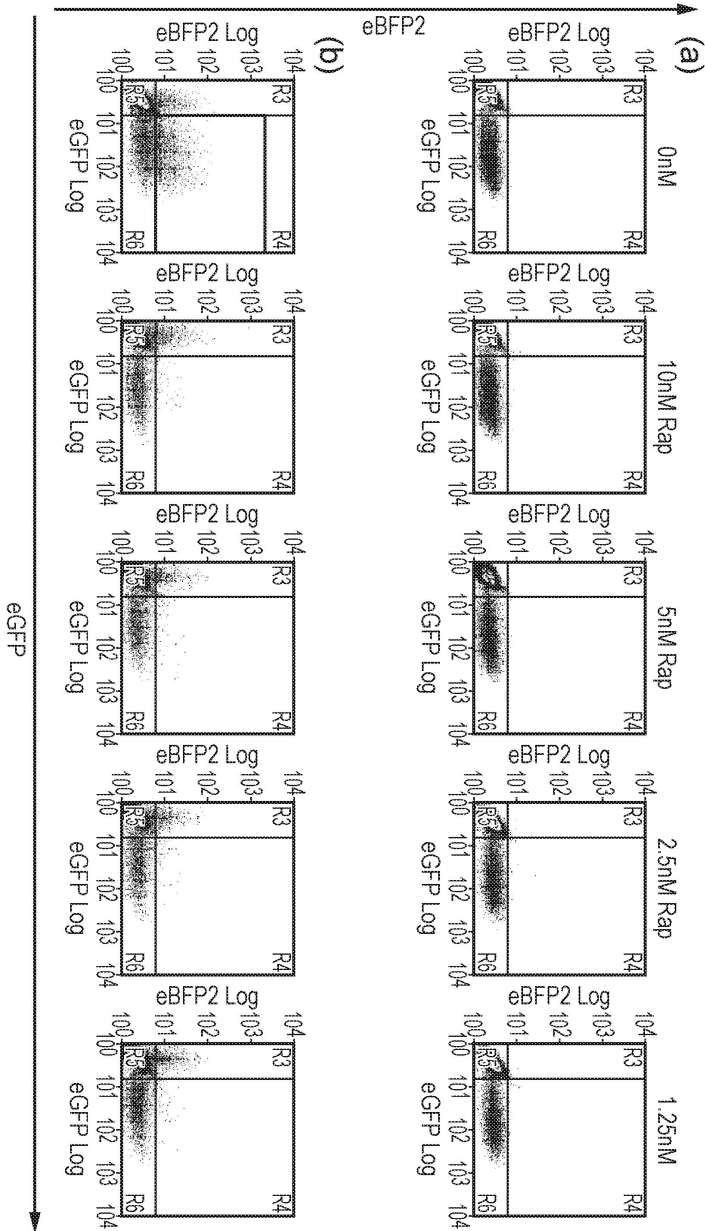
[0352] 상기 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. 본 발명의 기술된 방법 및 시스템의 다양한 변형 및 변경은 본 발명의 범주 및 사상을 벗어나지 않고 당해 분야의 기술자에게 명백할 것이다. 비록 본 발명은 특정한 바람직한 실시형태와 관련하여 기재되었지만, 청구된 바와 같은 본 발명은 이러한 특정 실시형태에 부당하게 한정되지 않아야 한다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 분자 생물학 또는 관련 분야의 기술자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위해 기술된 방식의 다양한 변형은 하기 청구 범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.

도면

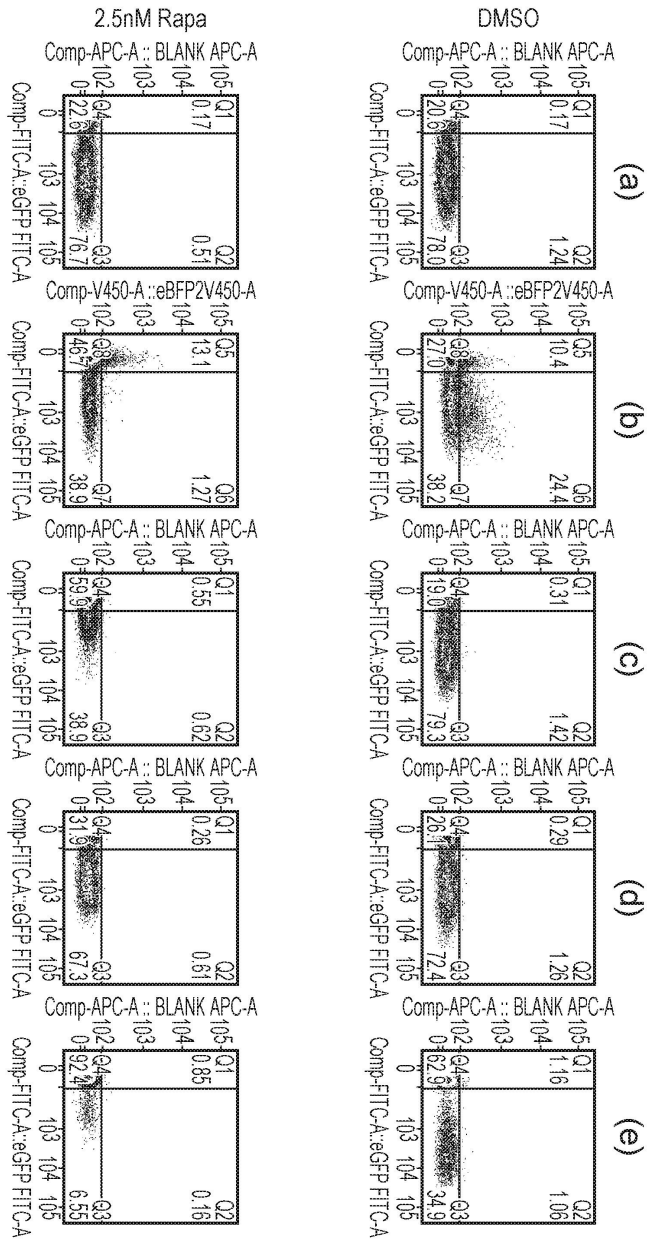
도면1



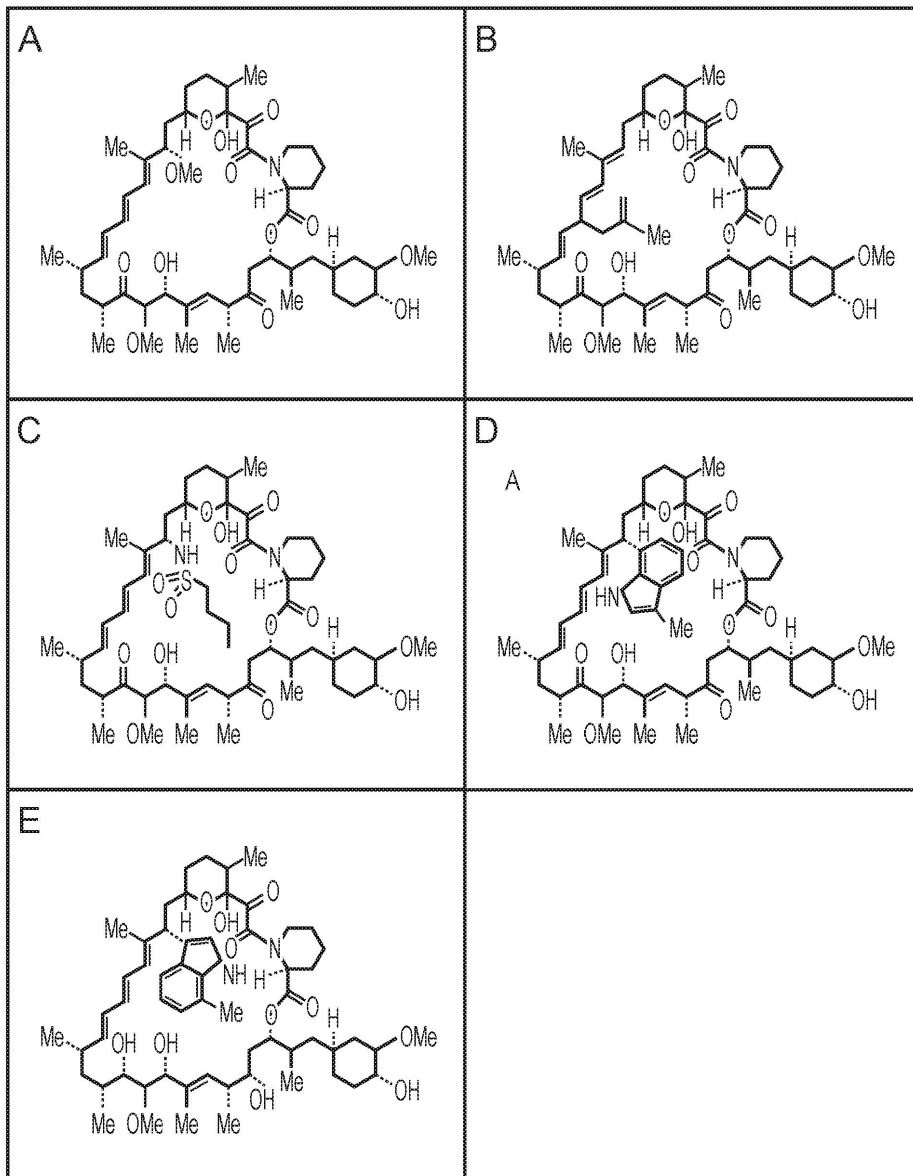
도면2



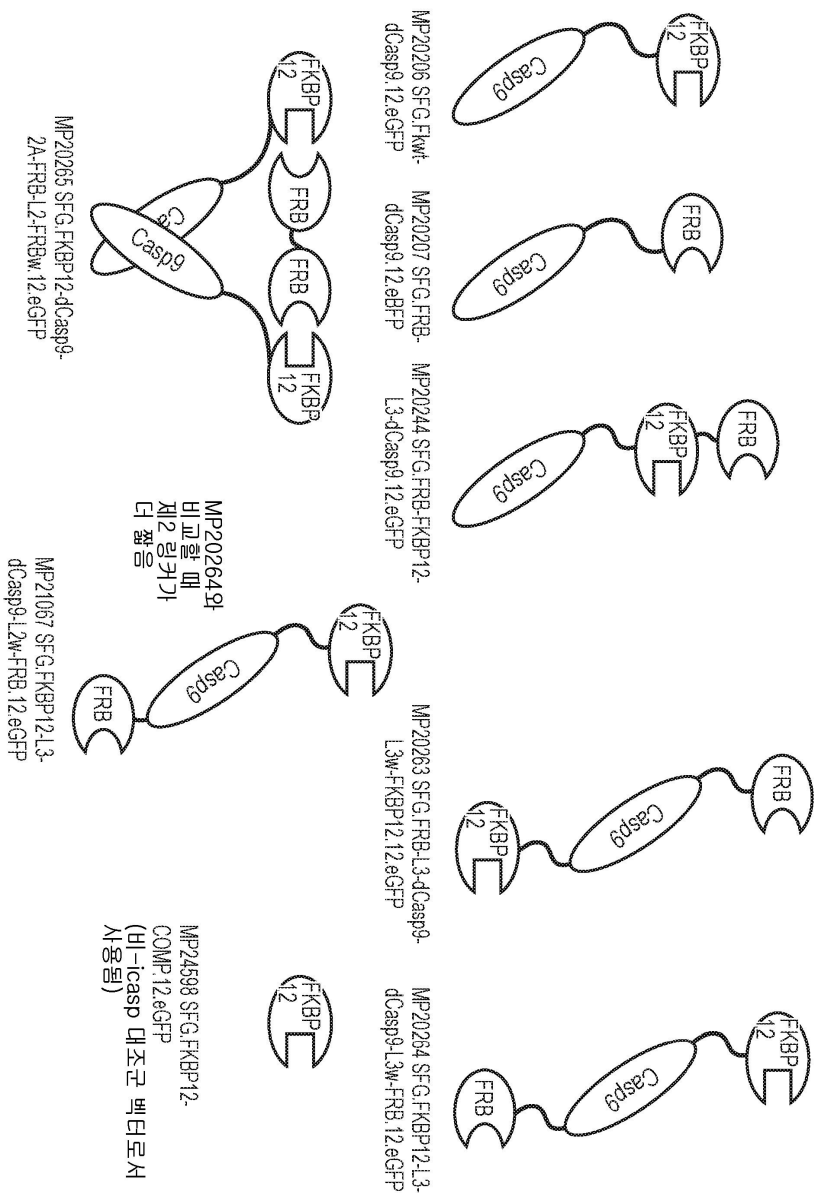
도면3



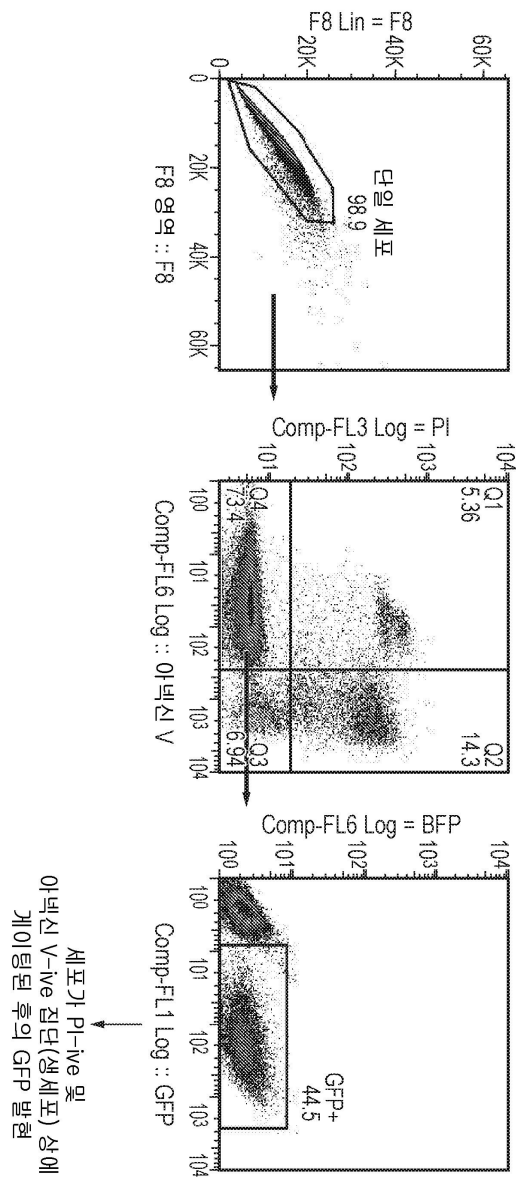
도면4



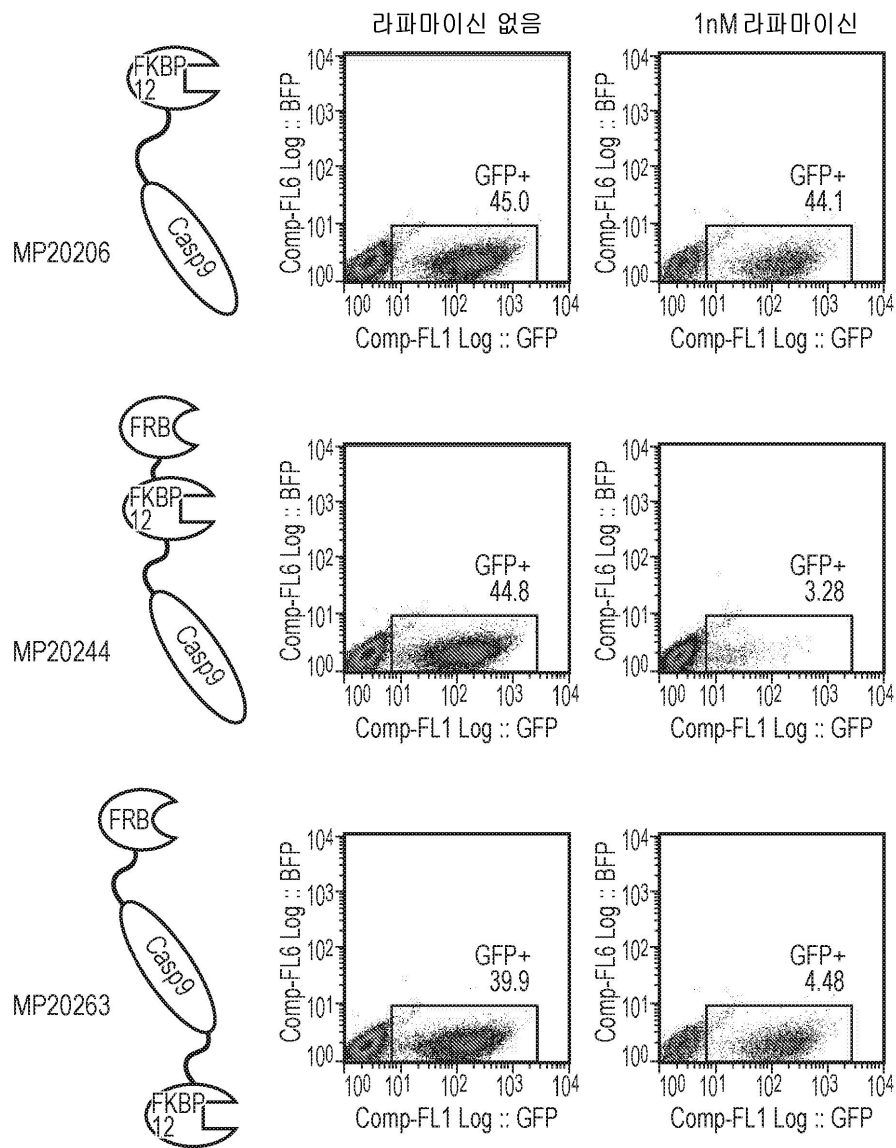
도면5



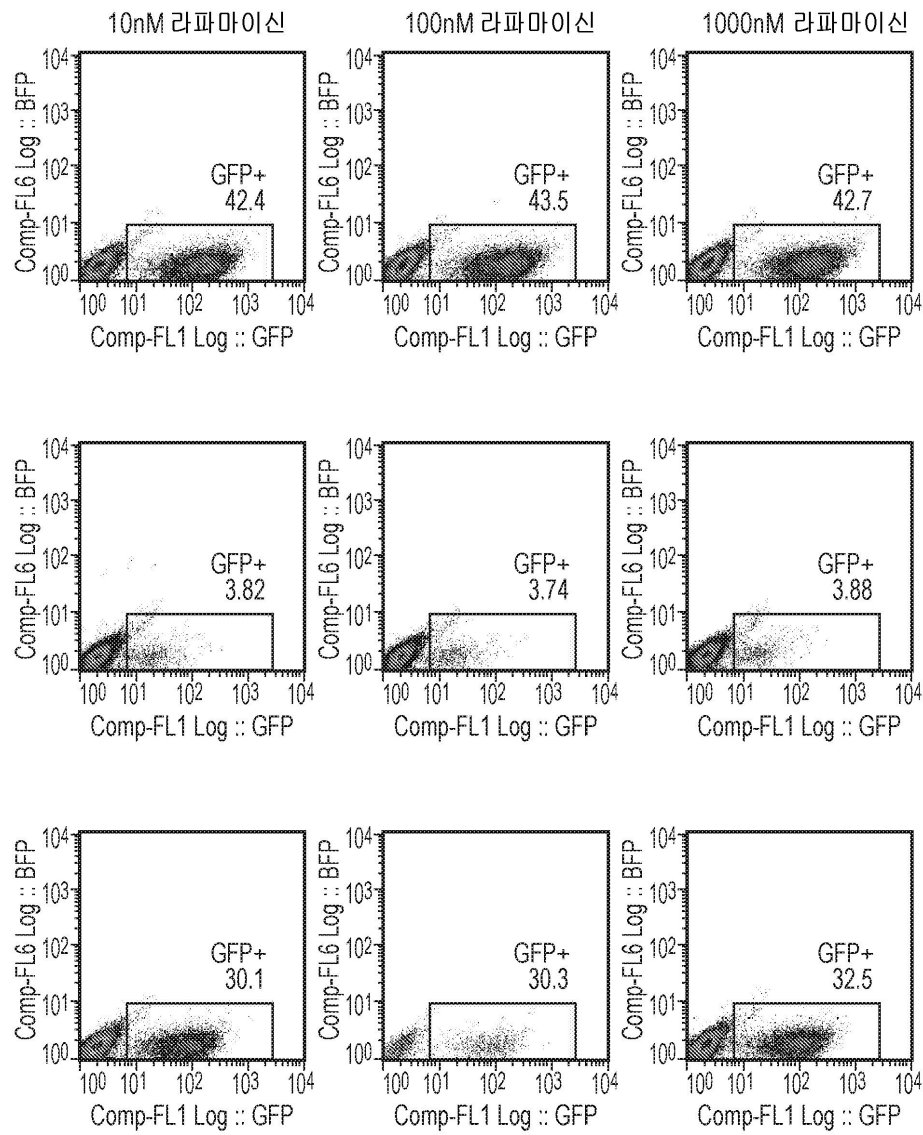
도면6



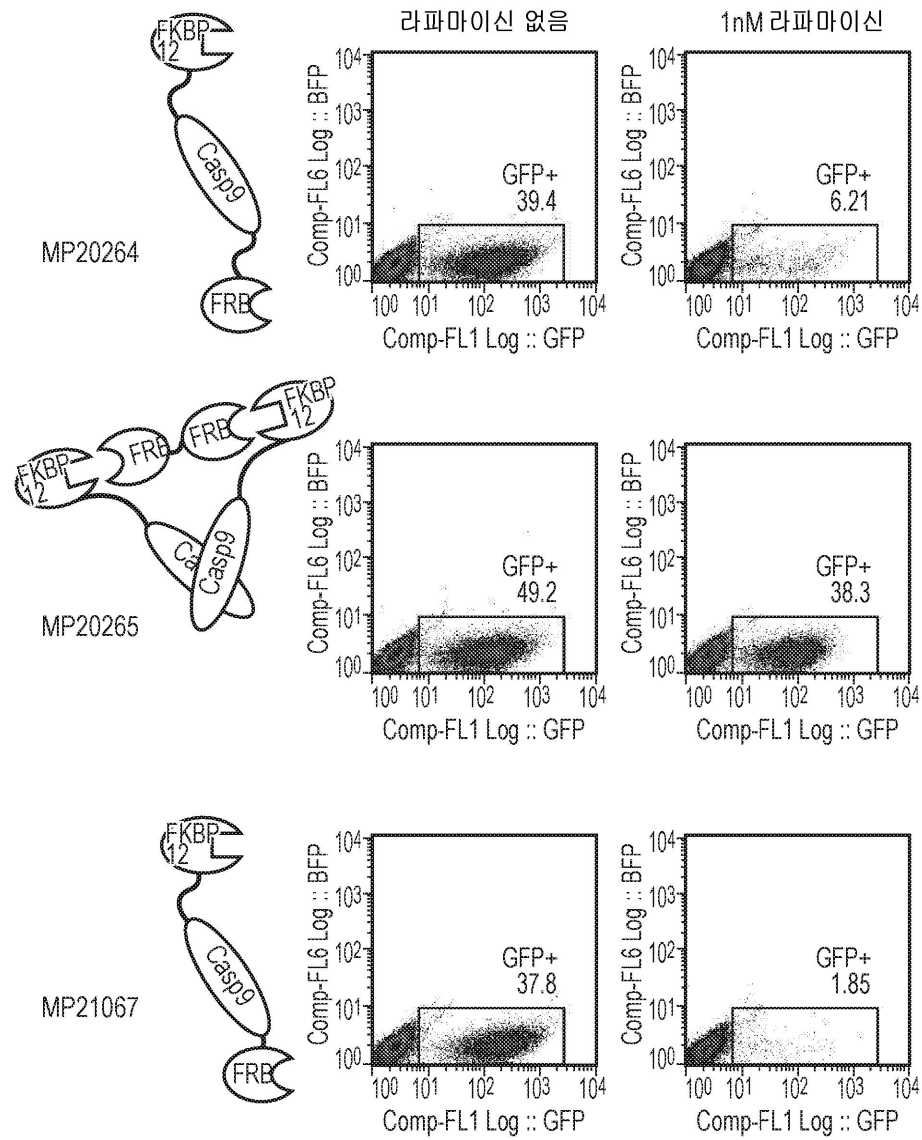
도면7a



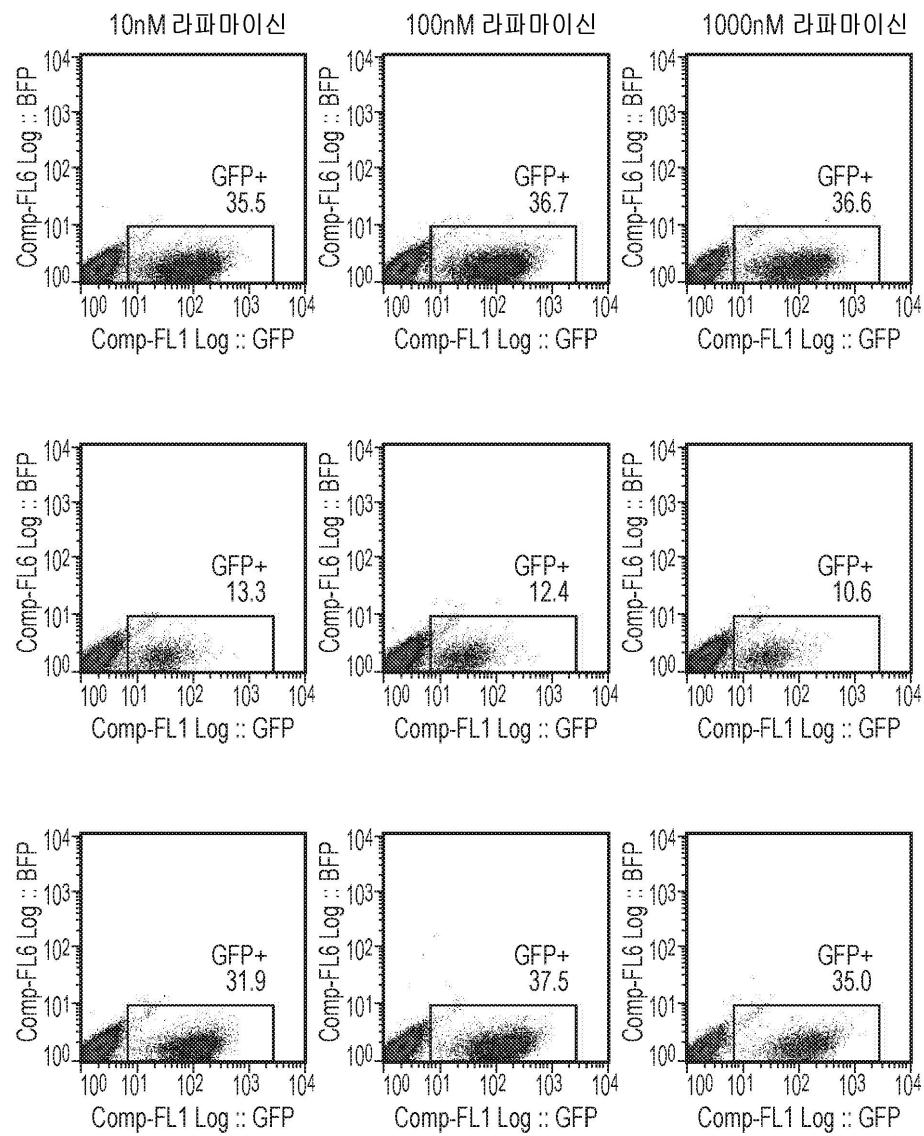
도면7b



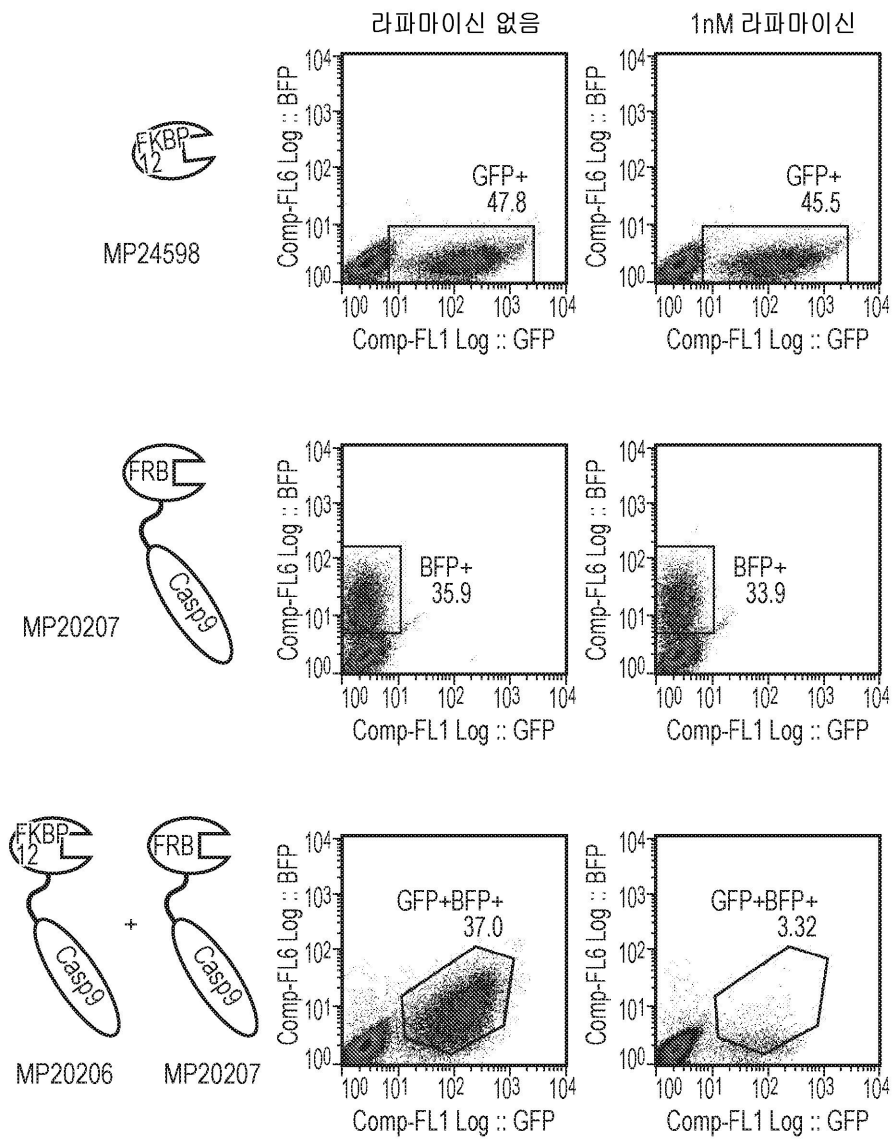
도면8a



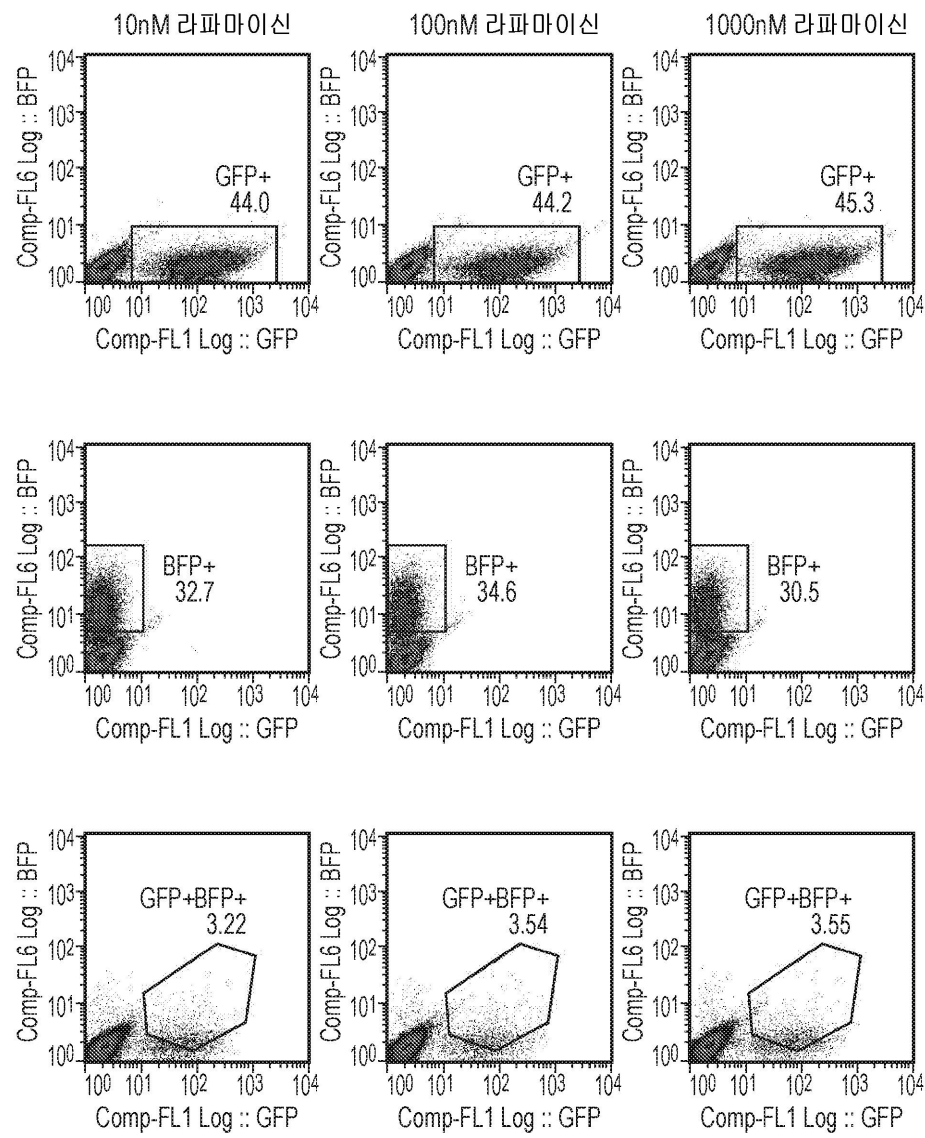
도면8b



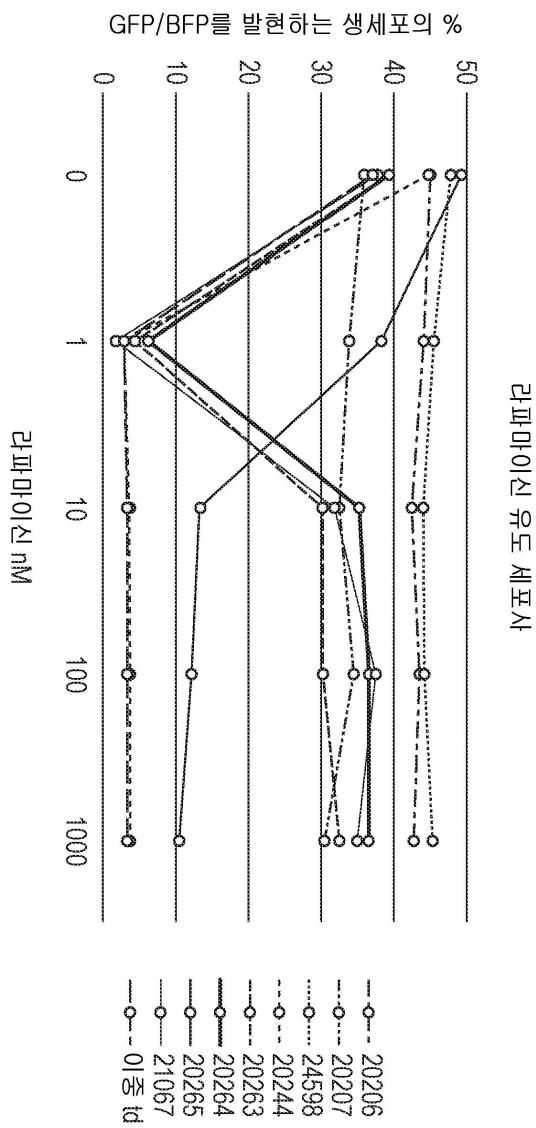
도면9a



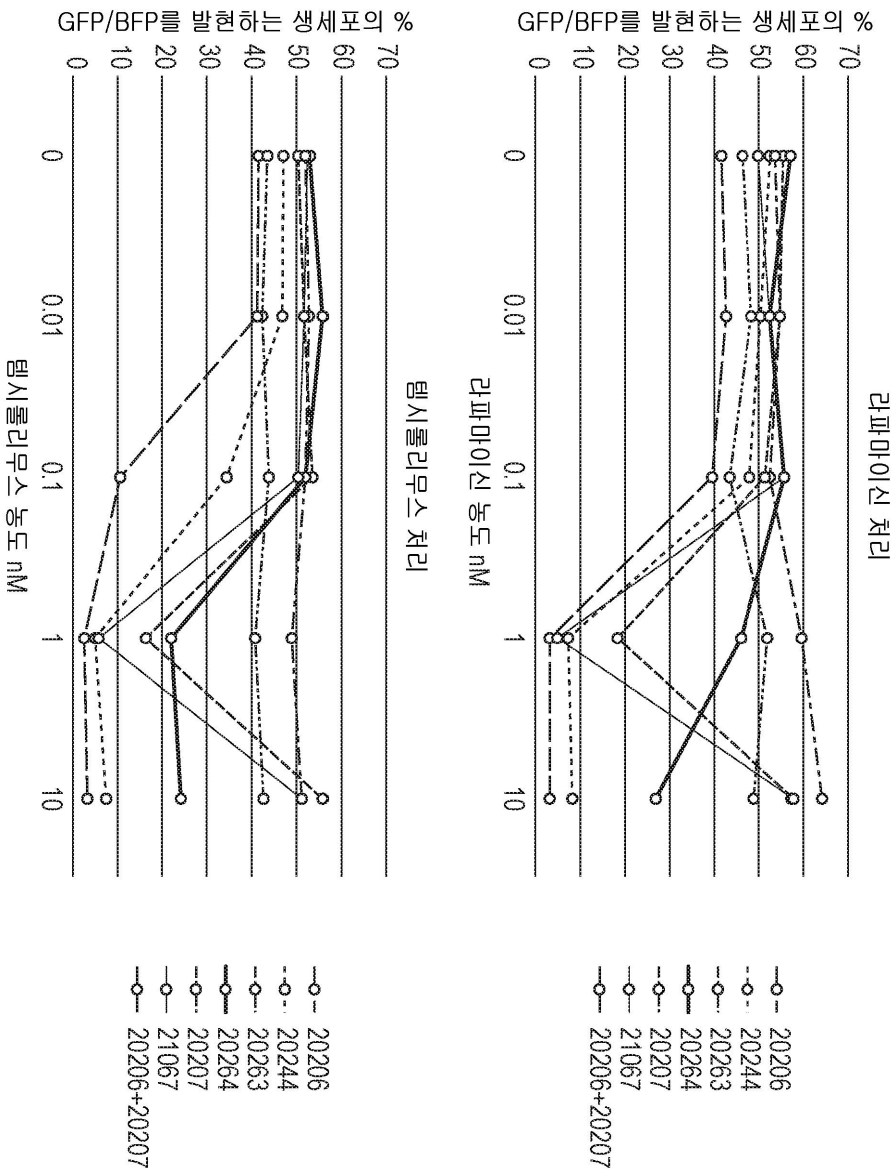
도면9b



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> UCL Business PLC  
Syncona Partners LLP
- <120> CHIMERIC PROTEIN
- <130> P106629PCT
- <150> GB 1503133.9
- <151> 2015-02-24
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 517

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric protein FRB-FKBP12-L3-dCasp9

<400> 1

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu

50 55 60

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp

65 70 75 80

Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser

85 90 95

Lys Leu Glu Tyr Ser Gly Gly Gly Ser Leu Glu Gly Val Gln Val Glu

100 105 110

Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr

115 120 125

Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp

130 135 140

Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln

145 150 155 160

Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly

165 170 175

Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr

180 185 190

Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val

195 200 205

Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

210

215

220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala

225

230

235

240

Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met

245

250

255

Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg

260

265

270

Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys

275

280

285

Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly

290

295

300

Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln

305

310

315

320

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

325

330

335

Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr

340

345

350

Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly

355

360

365

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

370

375

380

Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr

385

390

395

400

Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr

405

410

415

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

420

425

430

Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro

435

440

445

Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu

450                      455                      460  
Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln

465                      470                      475                      480  
Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr

485                      490                      495  
Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe

500                      505                      510  
Lys Thr Ser Ala Ser

515

<210> 2

<211> 402

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric protein FKBP12-dCasp9

<400> 2

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg

1                      5                      10                      15  
Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met

20                      25                      30  
Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro

35                      40                      45  
Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu

50                      55                      60  
Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser

65                      70                      75                      80  
Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro

85                      90                      95  
His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly

100                      105                      110  
Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser

115                      120                      125

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys

130

135

140

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

145

150

155

160

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg

165

170

175

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr

180

185

190

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His

195

200

205

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

210

215

220

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys

225

230

235

240

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

245

250

255

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly

260

265

270

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

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val

325

330

335

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

340

345

350

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu

355

360

365

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

370 375 380  
Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser

385 390 395 400  
Ala Ser

<210> 3

<211> 392

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric protein FRB-dCasp9

<400> 3

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe  
20 25 30  
Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr

35 40 45  
Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu  
50 55 60  
Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp  
65 70 75 80  
Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser  
85 90 95  
Lys Leu Glu Tyr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp

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

Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu

165 170 175

Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu

180 185 190

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

195 200 205

Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val

260 265 270

Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro

275 280 285

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

290 295 300

Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser

305 310 315 320

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

325 330 335

Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu

340 345 350

Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys

355 360 365

Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys

370 375 380

Leu Phe Phe Lys Thr Ser Ala Ser

385 390

<210> 4

<211> 651

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric protein FKBP12-dCasp9-2A-FRB-FRBw

<400> 4

Met Leu Glu Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg

1 5 10 15

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met

20 25 30

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro

35 40 45

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu

50 55 60

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Val Asp Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser

115 120 125

Leu Arg Gly Asn Ala Asp Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Arg Thr Arg Thr Gly Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg

165 170 175

Arg Phe Ser Ser Leu His Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr

180 185 190

Ala Lys Lys Met Val Leu Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His

195 200 205

Gly Ala Leu Asp Cys Cys Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln  
210 215 220

Ala Ser His Leu Gln Phe Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys  
225 230 235 240

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys  
245 250 255

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly  
260 265 270

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu  
275 280 285

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln  
290 295 300

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro  
305 310 315 320

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val  
325 330 335

Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp  
340 345 350

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu  
355 360 365

Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met  
370 375 380

Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser  
385 390 395 400

Ala Ser Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val  
405 410 415

Glu Ser Asn Pro Gly Pro Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly  
420 425 430

Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr  
435 440 445

Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg

450                      455                      460  
 Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly  
 465                      470                      475                      480  
 Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu  
                          485                      490                      495  
 Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile  
                          500                      505                      510  
 Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu  
                          515                      520                      525  
  
 Glu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Leu Glu Gly  
                          530                      535                      540  
 Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys  
 545                      550                      555                      560  
 Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly  
                          565                      570                      575  
 Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met  
                          580                      585                      590  
  
 Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln  
                          595                      600                      605  
 Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala  
                          610                      615                      620  
 Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu  
 625                      630                      635                      640  
 Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Ser  
                          645                      650  
  
 <210> 5  
 <211> 416  
  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Met Asp Glu Ala Asp Arg Arg Leu Leu Arg Arg Cys Arg Leu Arg Leu

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Val | Glu | Glu | Leu |
| Gln | Val | Asp | Gln |
| Leu | Trp | Asp | Ala |
| Leu | Leu | Ser | Ser |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Glu | Leu | Phe | Arg |
| Pro | His | Met | Ile |
| Glu | Asp | Ile | Gln |
| Arg | Ala | Gly | Ser |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Ser | Arg | Arg |
| Asp | Gln | Ala | Arg |
| Gln | Leu | Ile | Ile |
| Asp | Leu | Glu | Thr |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Arg | Gly | Ser | Gln |
| Ala | Leu | Pro | Leu |
| Phe | Ile | Ser | Cys |
| Leu | Glu | Asp | Thr |
| 65  | 70  | 75  | 80  |
| Gly | Gln | Asp | Met |
| Leu | Ala | Ser | Phe |
| Leu | Arg | Thr | Asn |
| Arg | Gln | Ala | Ala |
| 85  | 90  | 95  |     |
| Lys | Leu | Ser | Lys |
| Pro | Thr | Leu | Glu |
| Asn | Leu | Thr | Pro |
| Val | Val | Leu | Arg |
| 100 | 105 | 110 |     |
| Pro | Glu | Ile | Arg |
| Lys | Pro | Glu | Val |
| Leu | Arg | Pro | Glu |
| Thr | Pro | Arg | Pro |
| 115 | 120 | 125 |     |
| Val | Asp | Ile | Gly |
| Ser | Gly | Gly | Phe |
| Gly | Asp | Val | Gly |
| Ala | Leu | Glu | Ser |
| 130 | 135 | 140 |     |
| Leu | Arg | Gly | Asn |
| Ala | Asp | Leu | Ala |
| Tyr | Ile | Leu | Ser |
| Met | Glu | Pro | Cys |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | His | Cys | Leu |
| Ile | Ile | Asn | Asn |
| Val | Asn | Phe | Cys |
| Arg | Glu | Ser | Gly |
| 165 | 170 | 175 |     |
| Leu | Arg | Thr | Arg |
| Thr | Gly | Ser | Asn |
| Ile | Asp | Cys | Glu |
| Lys | Leu | Arg | Arg |
| 180 | 185 | 190 |     |
| Arg | Phe | Ser | Ser |
| Pro | His | Phe | Met |
| Val | Glu | Val | Lys |
| Gly | Asp | Leu | Thr |
| 195 | 200 | 205 |     |
| Ala | Lys | Lys | Met |
| Val | Leu | Ala | Leu |
| Leu | Glu | Leu | Ala |
| Gln | Gln | Asp | His |
| 210 | 215 | 220 |     |
| Gly | Ala | Leu | Asp |
| Cys | Cys | Val | Val |
| Val | Ile | Leu | Ser |
| His | Gly | Cys | Gln |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Ala | Ser | His | Leu |
| Gln | Phe | Pro | Gly |
| Ala | Val | Tyr | Gly |
| Thr | Asp | Gly | Cys |
| 245 | 250 | 255 |     |

Pro Val Ser Val Glu Lys Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys  
260 265 270

Pro Ser Leu Gly Gly Lys Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly  
275 280 285

Gly Glu Gln Lys Asp His Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu  
290 295 300

Asp Glu Ser Pro Gly Ser Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln  
305 310 315 320

Glu Gly Leu Arg Thr Phe Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro  
325 330 335

Thr Pro Ser Asp Ile Phe Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val  
340 345 350

Ser Trp Arg Asp Pro Lys Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp  
355 360 365

Asp Ile Phe Glu Gln Trp Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu  
370 375 380

Leu Arg Val Ala Asn Ala Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met  
385 390 395 400

Pro Gly Cys Phe Asn Phe Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser  
405 410 415

<210> 6

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Leu Ala Tyr Ile Leu Ser 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 Phe Asn Phe  
                     260                      265                      270  
 Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser  
                     275                      280

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP12 domain

<400> 7

```

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 Phe 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
          100         105

```

<210> 8

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> wild-type FRB segment of mTOR

<400> 8

```

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu
1           5           10          15
Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe
          20          25          30
Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr
          35          40          45
Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu
          50          55          60

```

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp

65                      70                      75                      80

Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser

85                      90                      95

Lys Leu Glu Ser

100

<210> 9

 $\langle 211 \rangle$  100

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220><223> FRB with T to L substitution at 2098 which allows binding to

AP21967

&lt;400&gt; 9

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu

1                      5                      10                      15

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

20                      25                      30

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

35                      40                      45

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu

50                      55                      60

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp

65                      70                      75                      80

Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser

85 90 95

Lys Leu Glu Ser

100

 $\langle 210 \rangle$  10

$\langle 211 \rangle$  100

<212> PRT

### <213> Artificial Sequence

<220><223> FRB segment of mTOR with T to H substitution at 2098 and to W at

F at residue 2101 of the full mTOR

<400> 10

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe  
20 25 30

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr  
35 40 45

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu  
50 55 60

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp  
65 70 75 80

Leu His Gln Ala Phe Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser  
85 90 95

Lys Leu Glu Ser  
100

<210> 11

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB segment of mTOR with K to P substitution at residue 2095 of  
the full mTOR

<400> 11

Met Ala Ser Arg Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe  
20 25 30

Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr  
35 40 45

Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu  
50 55 60

Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Pro Asp  
65 70 75 80

Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser

85

90

95

Lys Leu Glu Ser

100

<210> 12

<211> 1554

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB-FKBP12-L3-Casp9 nucleotide sequence

<400> 12

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atggcttcta gaatcctctg gcatgagatg tggcatgaag gcctggaaga ggcattctgt | 60   |
| ttgtactttg gggaaaggaa cgtgaaaggc atgtttgagg tgctggagcc ctgcatgct  | 120  |
| atgatggaac ggggccccca gactctgaag gaaacatcct ttaatcaggc ctatggtcga | 180  |
| gatttaatgg aggcccaaga gtggtgcagg aagtacatga aatcaggga tgtcaaggac  | 240  |
| ctcctccaag cctgggacct ctattatcat gtgttccgac gaatctcaa gctcgagtat  | 300  |
| agcggcggcg gcagcctgga gggcgtgcag gtggagacca tcagcccagg cgacgcaga  | 360  |
| accttcccc agagaggcca gacctgcgtg gtgcaactata ccggcatgct ggaggacggc | 420  |
| aagaagttcg acagcagccg cgaccgcaat aagcccttca agttcatgct gggcaagcag | 480  |
| gaggtgatca gaggtgga ggaggcgtg gccagatga gcgtgggcca gagagccaag     | 540  |
| ctgaccatca gccccgacta cgcctatggc gccaccggcc acccggcat catccaccc   | 600  |
| cacgccaccc tgggtgttga tgtggagctg ctgaagctgg agtccggcgg aggcgggtct | 660  |
| ggaggaggcg gcagcggcgg cggcgggtca ggcgtggatg gcttcggcga cgtgggagcc | 720  |
| ctggagagcc tgagaggcaa cgccgatctg gcctacatcc tgagcatgga gccctgtggc | 780  |
| cactgcctga tcatcaacaa cgtgaacttc tgccgggaga gcggcctcg gaccggacc   | 840  |
| ggcagcaaca tcgactgcga gaagctgagg aggcgcttct cctccctgca ctttatggtg | 900  |
| gaggtgaaag gcgatctgac tgccaagaaa atggtgctgg ccctgctgga gctggcccag | 960  |
| caggaccag gagccctgga ttgctgtgtg gtggtgatcc tgtcccacgg ctgccaggcc  | 1020 |
| agccacctgc agttccccgg agccgtgtac ggcaccgacg gctgtcccg gtccgtggag  | 1080 |
| aagatcgtga acatcttcaa cggcacctcc tgccccctcc tgggcggcaa gcccagctg  | 1140 |
| ttctttatcc aggcctgtgg cggcagacag aaggaccag gctttgaggt ggccagcacc  | 1200 |
| tccccgagg acgagagccc aggcagcaac cccgagccc acgccaccc cttccaggag    | 1260 |

ggcctgcgca ccttcgacca gctggacgcc atcagcagcc tgcccacccc cagcgacatc 1320  
 ttcgtgagct acagcacctt tcccggcttc gtgagctggc gcgatcccaa gtccggctct 1380  
 tggatatgtg agacctgga cgacatcttt gagcagtggg ctcatagcga ggacctgcag 1440  
 agcctgctgc tgcgcgtggc caatgccgtg agcgtgaagg gcatctacaa gcagatgcca 1500

ggctgcttca acttctcgcg gaagaagctg tttttcaaga ccagcgcctc ctga 1554

<210> 13

<211> 1209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP12-dCasp9 nucleotide sequence

<400> 13

atgctggagg gcgtgcaggt ggagaccatc agcccaggcg acggcagaac ctcccccaag 60  
 agaggccaga cctgcgtggt gcactatacc ggcatgctgg aggacggcaa gaagttcgac 120  
 agcagccgcg accgcaataa gcccttcaag ttcattgctgg gcaagcagga ggtgatcaga 180  
 ggctgggagg agggcgtggc ccagatgagc gtgggcccaga gagccaagct gaccatcagc 240

cccgactacg cctatggcgc caccggccac cccggcatca tcccaccca cgcaccctg 300  
 gtgtttgatg tggagctgct gaagctggag tccggaggcg gctccggcgt ggatggcttc 360  
 ggcgactggt gagccctgga gacctgaga ggcaacgccg atctggccta catcctgagc 420  
 atggagccct gtggccactg cctgatcatc aacaacgtga acttctgccg ggagagcggc 480  
 ctgcggaccc ggaccggcag caacatcgac tgcgagaagc tgaggaggcg cttctcctcc 540  
 ctgcacttta tggaggaggt gaaaggcgat ctgactgcca agaaaatggt gctggccctg 600  
 ctggagctgg cccagcagga ccacggagcc ctggattgct gtgtggtggt gatcctgtcc 660

cacggctgcc aggccagcca cctgcagttc cccggagccg tgtacggcac cgacggctgt 720  
 cccgtgtccg tggagaagat cgtgaacatc ttcaacggca cctcctgccc ctccctgggc 780  
 ggcaagccca agctgttctt tatecaggcc tgtggcggcg agcagaagga ccacggcttt 840  
 gaggtggcca gcacctccc cgaggacgag agcccaggca gcaaccccga gcccgcgccc 900  
 acccccttcc aggagggcct gcgcaccttc gaccagctgg acgccatcag cagcctgccc 960  
 acccccagcg acatcttctg gagctacagc acctttcccg gcttcgtgag ctggcgcgat 1020  
 cccaagtccg gctcttggtg tgtggagacc ctggacgaca tctttgagca gtgggctcat 1080

agcgaggacc tgagagacct gctgctgcgc gtggccaatg ccgtgagcgt gaaggcctc 1140  
 tacaagcaga tgccaggctg cttcaacttc ctgcggaaga agctgttctt caagaccagc 1200

gcctcctga 1209

<210> 14

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB-dCasp9 nucleotide sequence

<400> 14

atggcttcta gaatcctctg gcatgagatg tggcatgaag gcctggaaga ggcattctgt 60

ttgtactttt gggaaaggaa cgtgaaaggc atgtttgagg tgctggagcc ctgcatgct 120

atgatggaac ggggccccca gactctgaag gaaacatcct ttaatcaggc ctatggtcga 180

gatttaatgg aggcccaaga gtggtgcagg aagtacatga aatcaggga tgtcaaggac 240

ctcctccaag cctgggacct ctattatcat gtgttccgac gaatctcaa gctcgagtat 300

agcggcggcg gcagcggcgt ggatggcttc ggcgacgtgg gagccctgga gacctgaga 360

ggcaacgcg atctggccta catctgagc atggagccct gtggccactg cctgatcatc 420

aacaacgtga acttctgccg ggagagcggc ctgcggaccc ggaccggcag caacatcgac 480

tgcgagaagc tgaggaggcg cttctcctcc ctgcacttta tggaggaggt gaaaggcgat 540

ctgactgcca agaaaatggt gctggccctg ctggagctgg cccagcagga ccacggagcc 600

ctggattgct gtgtgggtgt gatcctgtcc cacggctgcc aggccagcca cctgcagttc 660

cccggagccg tgtacggcac cgacggctgt cccgtgtccg tggagaagat cgtgaacatc 720

ttcaacggca cctcctgccc ctccctgggc ggcaagccca agctgttctt tatccaggcc 780

tgtggcggcg agcagaagga ccacggcttt gaggtggcca gcacctccc cgaggacgag 840

agcccaggca gcaacccga gcccagccc acccccttc aggaggcct gcgcaccttc 900

gaccagctgg acgcatcag cagcctgccc acccccagcg acatcttcgt gagctacagc 960

acctttccc gcttcgtgag ctggcgcgat cccaagtccg gctcttggtg tgtggagacc 1020

ctggacgaca tctttgagca gtgggtcat agcgaggacc tgcagagcct gctgctgcgc 1080

gtggccaatg ccgtgagcgt gaagggcac tacaagcaga tgccaggctg cttcaacttc 1140

ctgcggaaga agctgttctt caagaccagc gcctcctga 1179

<210> 15

<211> 1956

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP12-Casp9-2A-FRB-FRBw nucleotide sequence

<400> 15

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atgctggagg gcgtgcaggt ggagaccatc agcccaggcg acggcagaac cttccccaag | 60   |
| agaggccaga cctgcgtggt gcactatacc ggcatgctgg aggacggcaa gaagttcgac | 120  |
|                                                                   |      |
| agcagccgcg accgcaataa gcccttcaag ttcatgctgg gcaagcagga ggtgatcaga | 180  |
| ggctgggagg agggcgtggc ccagatgagc gtgggccaga gagccaagct gaccatcagc | 240  |
| cccactacg cctatggcgc caccggccac cccggcatca tcccaccca cggcacctg    | 300  |
| gtgtttgatg tggagctgct gaagctggag tccggaggcg gctccggcgt ggatggcttc | 360  |
| ggcgactgg gagccctgga gagcctgaga ggcaacgccg atctggccta catcctgagc  | 420  |
| atggagccct gtggccactg cctgatcatc aacaacgtga acttctgccg ggagagcggc | 480  |
| ctgcggaccc ggaccggcag caacatcgac tgcgagaagc tgaggaggcg cttctcctcc | 540  |
|                                                                   |      |
| ctgcacttta tggtaggagt gaaaggcgat ctgactgcca agaaaatggt gctggccctg | 600  |
| ctggagctgg cccagcagga ccacggagcc ctggattgct gtgtggtggt gatcctgtcc | 660  |
| cacggctgcc aggccagcca cctgcagttc cccggagccg tgtacggcac cgacggctgt | 720  |
| cccgtgtccg tggagaagat cgtgaacatc ttcaacggca cctcctgccc ctccctgggc | 780  |
| ggcaagccca agctgttctt tatccaggcc tgtggcggcg agcagaagga ccacggcttt | 840  |
| gaggtggcca gcacctccc cgaggacgag agcccaggca gcaaccccga gcccacgcc   | 900  |
| accccttcc aggagggcct gcgcaccttc gaccagctgg acgcatcag cagcctgccc   | 960  |
|                                                                   |      |
| acccccagcg acatcttctg gagctacagc acctttcccg gcttcgtgag ctggcgcat  | 1020 |
| cccaagtccg gctcttggtg tgtggagacc ctggacgaca tctttgagca gtgggctcat | 1080 |
| agcgaggacc tgcagagcct gctgctgcgc gtggccaatg ccgtgagcgt gaaggcctc  | 1140 |
| tacaagcaga tgccaggctg cttcaacttc ctgcggaaga agctgttctt caagaccagc | 1200 |
| gcctcccagt gcaccaatta tgctttgctt aagctggcag gcgatgtgga atcaaacccg | 1260 |
| ggtcctgggg tacaggtgga gaccatctct cctggcgacg ggagaacatt tcctaaaagg | 1320 |
| ggccaaacat gcgtggttca ctataccggt atgctggagg atggcaaaaa agtagactcc | 1380 |
|                                                                   |      |
| agccgggata gaaacaaacc ctttaagttc atgctgggta agcaggaagt tatacggggc | 1440 |
| tgggaagagg gtagtctca gatgtctgtg ggccagaggg ccaagctgac catctcaccg  | 1500 |
| gactacgct acggcgctac cgccaccct ggcatatac caccatgc aactctctc       | 1560 |
| ttcgatgttg agttgctcaa actggaatca ggcggaggcg ggtctggagg aggcggcagc | 1620 |
| atgctggagg gcgtgcaggt ggagaccatc agcccaggcg acggcagaac cttccccaag | 1680 |
| agaggccaga cctgcgtggt gcactatacc ggcatgctgg aggacggcaa gaagttcgac | 1740 |

agcagccgcg accgcaataa gcccttcaag ttcattgctgg gcaagcagga ggtgatcaga 1800

ggctgggagg agggcgtggc ccagatgagc gtgggccaga gagccaagct gaccatcagc 1860

cccgaactacg cctatggcgc caccggccac ccgggcatca tcccaccca cgccaccctg 1920

gtgtttgatg tggagctgct gaagctggag tcctga 1956

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 16

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

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 17

<211> 20

<

212> PRT

<213> Foot-and-mouth disease virus

<400> 17

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20