



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0043780  
(43) 공개일자 2024년04월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/725 (2006.01) A61K 31/4545 (2006.01)  
A61K 31/496 (2024.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07D 401/14 (2006.01)  
C07D 417/14 (2006.01) C07D 471/04 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/7051 (2013.01)  
A61K 31/4545 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7007065  
(22) 출원일자(국제) 2022년08월05일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년02월29일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/074589  
(87) 국제공개번호 WO 2023/015283  
국제공개일자 2023년02월09일
- (30) 우선권주장  
63/230,225 2021년08월06일 미국(US)
- (71) 출원인  
셀진 코퍼레이션  
미합중국 뉴저지주 07901 쉐미트 모리스 애비뉴 86
- (72) 발명자  
캐럴, 크리스토퍼 윌튼  
미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드  
다고스티노, 라우라 아쿨리안  
미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이귀동

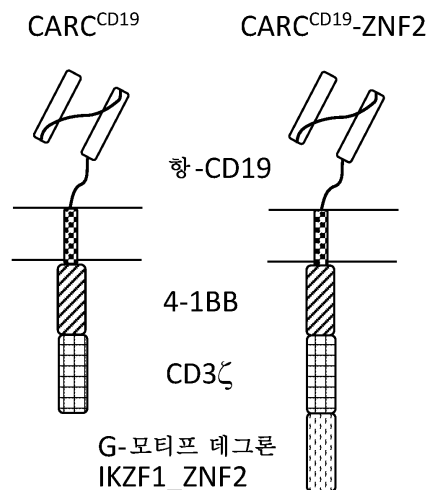
전체 청구항 수 : 총 96 항

(54) 발명의 명칭 조작된 단백질의 선택적 분해를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시내용은 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드, 화합물, 조성물, 및 그의 제조 방법 및 세포에서 조작된 단백질을 분해하기 위한 용도에 관한 것이다. 분해 도메인은 서열 FCX1X2CGX3X4, 바람직하게는 FCNQCGAS를 포함한다. 폴리펩티드는 바람직하게는 이러한 분해 도메인 또는 태그를 포함하는 CAR이고, 분해제에 의해 분해된다. 분해제는 분해 도메인에 결합하고 또한 세레블론에 결합하는 소분자이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

*A61K 31/496* (2024.01)

*A61K 39/4611* (2023.05)

*A61K 39/4631* (2023.05)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07D 401/14* (2013.01)

*C07D 417/14* (2013.01)

*C07D 471/04* (2022.08)

*C07K 14/4702* (2013.01)

*C12N 5/0636* (2023.05)

(72) 발명자

**류, 하이보**

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈  
스 라인 로드

**산무가순다람, 비라바후**

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈  
스 라인 로드

**바라자스, 브룩**

미국 08543 뉴저지 프린스턴 루트 206 앤드 프로빈  
스 라인 로드

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드로서, 여기서 분해 도메인은 아미노산 서열  $FCX_1X_2CGX_3X_4$  (서열식별번호: 1)을 포함하고, 여기서:

$X_1$ 은 아스파라긴, 아스파르테이트, 글리신, 글루타민, 메티오닌, 히스티딘, 트립토판, 이소류신, 아르기닌, 류신, 발린, 트레오닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,

$X_2$ 는 글루타민, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 이소류신, 발린, 및 메티오닌으로부터 선택되고,

$X_3$ 은 알라닌, 세린, 시스테인, 아르기닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 및 글리신으로부터 선택되고,

$X_4$ 는 세린, 메티오닌, 리신, 이소류신, 발린, 히스티딘, 글루타민, 아르기닌, 페닐알라닌, 및 트립토판으로부터 선택되는 것인

조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

$X_1$ 이 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 히스티딘, 트립토판, 이소류신, 아르기닌, 류신, 발린, 트레오닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고,

$X_2$ 가 글루타민, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 이소류신, 및 메티오닌으로부터 선택되고,

$X_3$ 이 알라닌, 세린, 시스테인, 및 글리신으로부터 선택되고,

$X_4$ 가 세린, 메티오닌, 히스티딘, 글루타민, 아르기닌, 페닐알라닌, 및 트립토판으로부터 선택되는 것인

조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 분해 도메인이 아미노산 서열  $FCX_1X_2CGX_3X_4X_5$  (서열식별번호: 2)를 포함하고, 여기서:

$X_5$ 는 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 티로신, 시스테인, 및 글루타민으로부터 선택되는 것인

조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,  $X_5$ 가 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 티로신, 및 글루타민으로부터 선택되는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,  $X_5$ 가 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 류신, 티로신, 및 글루타민으로부터 선택되는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 6

제3항에 있어서,  $X_5$ 가 페닐알라닌인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,  $X_1$ 이 아스파라긴인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,  $X_2$ 가 글루타민인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,  $X_3$ 이 알라닌 또는 세린인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,  $X_3$ 이 알라닌인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,  $X_4$ 가 세린인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 분해 도메인이 아미노산 서열 FCNQCGAS (서열식별번호: 3)를 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 적어도 1개의 아연 핑거 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 분해 도메인이 2개의 아연 핑거 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나 또는 각각의 아연 핑거 도메인이 독립적으로 서열식별 번호: 20-47 및 58로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 인간 이카로스, 헬리오스, 아이올로스, 또는 에오스의 아연 핑거 2 (ZNF2)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 분해 도메인이 제2 아연 핑거 도메인을 포함하며, 여기서 제2 아연 핑거 도메인은 인간 이카로스, 헬리오스, 아이올로스, 또는 에오스의 아연 핑거 1 (ZNF1) 또는 ZNF3에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 인간 이카로스, 헬리오스, 아이올로스 또는 에오스의 아연 핑거 2 (ZNF2) 및 아연 핑거 3 (ZNF3)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노

산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 서열식별번호: 21, 27, 32, 및 38로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 서열식별번호: 15, 60, 61, 및 62로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 서열식별번호: 6, 63, 64, 및 65로부터 선택된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드:

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHSGEKPFGKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 5);

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHSGEKPFGKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 66);

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHTGEKPFGKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 67); 및

GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHSGEKPFGKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 68).

#### 청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 하기로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드:

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFGKCHLCNYACRRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 7);

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFGKCPFCSYACRRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 69);

GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFGKCHLCNYACQRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 70);

및 GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFGKCPFCNYACRRRDALTGHLRTHS (서열식별번호: 71).

#### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폴리펩티드가 분해제의 존재 하에 유비퀴틴화되고, 여기서 분해제는 분해 도메인에 결합하는 소분자인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폴리펩티드가 분해제의 존재 하에 분해되고, 여기서 분해제는 분해 도메인에 결합하는 소분자인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 26

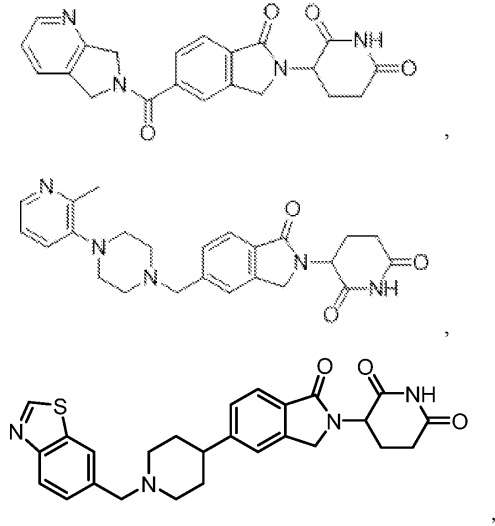
제24항 또는 제25항에 있어서, 분해제가 또한 세레블론에 결합하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 분해제가 분해 도메인, 분해제 및 세레블론을 포함하는 복합체를 매개하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 분해제가 하기로부터 선택된 화합물인 조작된 폴리펩티드:



및 그의 호변이성질체, 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 호변이성질체의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 분해제의 존재 하에 세포에서 유비퀴틴화되고/거나 분해되는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 세포가 시험관내에 있는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 31

제29항에 있어서, 세포가 생체내에 있는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폴리펩티드가 세포에서 실질적으로 세포질 또는 핵에 있거나, 또는 조작된 폴리펩티드가 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 분해 도메인이 내인성 단백질에 융합되거나, 또는 내인성 단백질 내에 위치하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 내인성 단백질이 포유동물 단백질인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 35

제33항에 있어서, 내인성 단백질이 인간 단백질인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 단백질이 PRDM1, TGFBR2, CASP8, CBLB, CD5, CISH, CGKA, DGKz, MAP4K1, ARID2, BACH2, CHX37, KLF2, KLF3, KLF6, MAF, SIGLEC9, TOX, ZBTB32, PTPN2, AKT1, PIK3CD,

MT1E, MT2A, CSK, ITK, PAG1, PDCD4, ZC3H12A, DNMT1, DNMT3A, PRBM1, STK4, TET2, BNIP3, FAS, CBL, BGAT5, RNF128, STK17B, TRIB1, TXNIP, UBASH3A, BATF, FLI1, IKZF1, IKZF2, IRF4, NFATC1, NR4A1, MAP2K1, MAP2K2, MAP4K4, PPARGC1A, RELB, TMEM173, USP10, MT1A, PP2A 패밀리 구성원, RASA2, NR4A2, NR4A3, AHR, CD70, LHALS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TAZ, USP21, 또는 YAP1인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 단백질의 생물학적 활성이 조작된 폴리펩티드에서 실질적으로 유지되는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 막횡단 도메인이 T-세포 수용체의 알파 쇄, T-세포 수용체의 베타 쇄, T-세포 수용체의 제타 쇄, CD28, CD3s, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS, TIM3, LAB3, TIGIT, PD1, 또는 CTLA4로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 및 세포내 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 세포외 도메인이 리간드, 리간드-결합 도메인, 또는 항원-결합 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 세포외 도메인이 항원-결합 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, 항원-결합 도메인이 암 항원에 결합하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 항원-결합 도메인이 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, 선암종 항원, a-태아단백질, B 세포 성숙 항원 (BCMA), BAFFR, B-림프종 세포, C242 항원, CA9, 암배아 항원, CA-125, 탄산 안히드라제 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23 (IgE 수용체), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD70, CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CLAUDIN6, CLAUDIN18.3, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFR  $\gamma$  III, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, 태아 AchR, 피브로박틴 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체-a, 플레이트 수용체 1, G250/CAIX, GD2, GD3, 당단백질 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, IL-6, IL-13, IL-13 수용체 a2, IL-11 수용체 a, 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 a5I31, 인테그린 avI33, 카파 경쇄, L1-CAM, 람다 경쇄, 루이스 Y, 메소텔린, MORAb-009, MS4A1, MUC1, MUC1 6, 뮤신 CanAg, NCAM, N-글리코릴뉴라민산, NKG2D 리간드, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, 포스포티달세린, 전립선-특이적 암 항원 (PSCA), 전립선 암종 세포, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, sp17, TAG72, 테나신 C, TGF  $\beta$  2, TGF-I3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, UPK1B, VEGF-A, VEGF 수용체, VEGFR-1, VEGFR2, TEM1, TEM8, 및/또는 비멘틴으로부터 선택된 항원에 결합하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 도메인이 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 도메인이 scFv를 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 47

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 도메인이 단일-도메인 항체 항원-결합 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 48

제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 적어도 1개의 공동-자극 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 세포내 도메인이 2개의 공동-자극 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 적어도 1개의 공동-자극 도메인이 4-1BB (CD137), CD28, OX40, 활성화 K 세포 수용체, BTLA, 톨 리간드 수용체, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CDS, ICAM-L LFA-1 (CD11a/CD18), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), RANK, GITR, BAFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Kp80 (KLRF1), Kp44, Kp30, Kp46, CD19, CD4, CD8a, CD8p, IL2Rp, IL2Ry, IL7Ra, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, IL15Ra, IL7R, CD18, CD132, LFA-1, ITGB7, KG2D, KG2C, TFR2, TRANCE/RAKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, DAP10, DAP12, CD83의 리간드, MHC 부류 I 분자, TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 및/또는 신호전달 림프구성 활성화 분자로부터 선택된 수용체 단백질로부터의 공동-자극 도메인인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 51

제48항 또는 제49항에 있어서, 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 52

제40항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인이 적어도 1개의 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 53

제52항에 있어서, 적어도 1개의 신호전달 도메인이 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM) 신호전달 도메인인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 적어도 1개의 신호전달 도메인이 CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD3 $\eta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\gamma$ , CD5, CD22, CD20, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcERI, CD66d, DAP10, 및 DAP12로부터 선택된 수용체 단백질로부터의 신호전달 도메인인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 55

제54항에 있어서, 세포내 도메인이 CD3 $\zeta$  신호전달 도메인을 포함하는 것인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 56

제40항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노 말단에서 카르복시-말단까지 (1) 세포외 도메인 [ECD] - 막횡단 도메인 [TM] - 공동-자극 도메인 [CoD] - 신호전달 도메인 [SigD] - 분해 도메인 [DD]; 또는 (2) ECD-TM-CoD-DD-SigD; 또는 (3) ECD-TM-DD-CoD-SigD를 포함하는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 57

제40항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항원 수용체 (CAR)인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 도메인 사이에 1개 이상의 펩티드 링커를 포함하는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 세포에 포함되는 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 60

제59항에 있어서, 세포가 인간 이펙터 세포인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, 세포가 T-세포 또는 NK 세포인 조작된 폴리펩티드.

#### 청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

#### 청구항 63

제62항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

#### 청구항 64

제62항의 핵산 분자 또는 제63항의 벡터를 포함하는 세포.

#### 청구항 65

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 조작된 폴리펩티드를 포함하는 세포.

#### 청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 인간 이펙터 세포인 세포.

#### 청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포 또는 NK 세포인 세포.

#### 청구항 68

제67항에 있어서, T 세포인 세포.

#### 청구항 69

제68항에 있어서, T 이펙터 세포인 세포.

#### 청구항 70

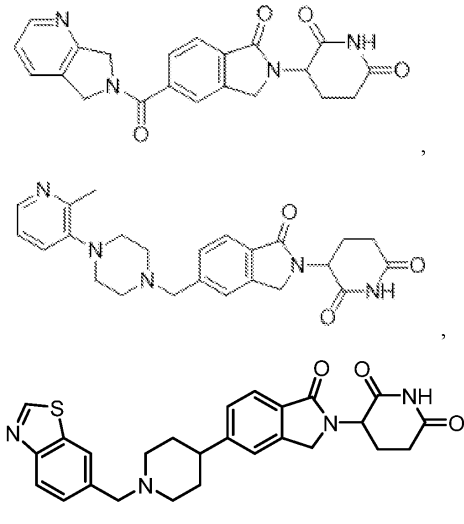
제68항에 있어서, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인 세포.

#### 청구항 71

제64항 내지 제70항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 72

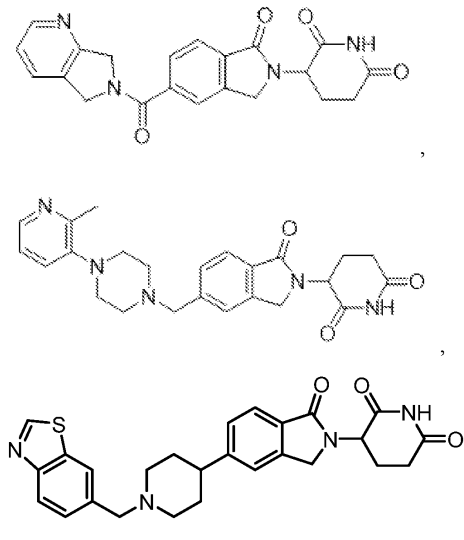
제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 조작된 폴리펩티드를 하기로부터 선택된 분해제와 접촉시키는 것을 포함하는, 조작된 폴리펩티드의 수준을 감소시키는 방법:



및 그의 호변이성질체, 및 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 호변이성질체의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 73

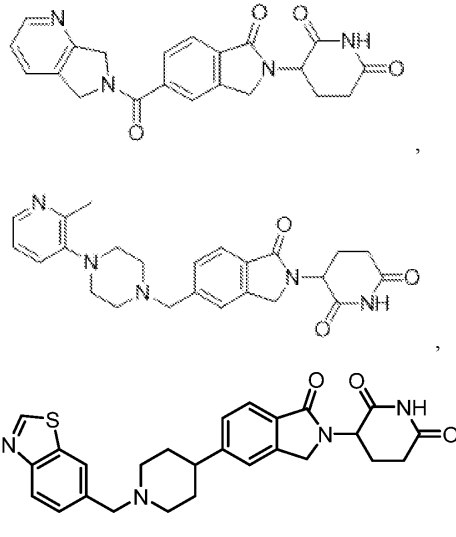
제64항 내지 제70항 중 어느 한 항의 세포를 하기로부터 선택된 분해제와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 조작된 폴리펩티드의 수준을 감소시키는 방법:



및 그의 호변이성질체, 및 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 호변이성질체의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 74

대상체에게 하기로부터 선택된 분해제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 세포에서 조작된 폴리펩티드의 수준을 감소시키는 방법으로서, 여기서 세포는 제1항 내지 제61항 중 어느 한 항의 조작된 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법:



및 그의 호변이성질체, 및 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 호변이성질체의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 75

제74항에 있어서, 세포가 인간 이펙터 세포인 방법.

#### 청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, 세포가 T 세포 또는 NK 세포인 방법.

#### 청구항 77

제72항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폴리펩티드가 분해제의 존재 하에 유비퀴틴화되는 것인 방법.

#### 청구항 78

제72항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 폴리펩티드가 분해제의 존재 하에 분해되는 것인 방법.

#### 청구항 79

제72항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 분해제가 분해 도메인에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 80

제72항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 분해제가 또한 세레블론에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 81

제80항에 있어서, 분해제가 분해 도메인, 분해제, 및 세레블론을 포함하는 복합체를 매개하는 것인 방법.

#### 청구항 82

대상체에게 제64항 내지 제70항 중 어느 한 항의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

#### 청구항 83

제82항에 있어서, 세포가 T 세포인 방법.

#### 청구항 84

제83항에 있어서, 세포가 T 이펙터 세포인 방법.

#### 청구항 85

제83항에 있어서, 세포가 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인 방법.

#### 청구항 86

제82항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 제57항의 조작된 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 87

제82항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 암인 방법.

#### 청구항 88

제87항에 있어서, 암이 혈액암 또는 고형 암으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 89

제88항에 있어서, 혈액암이 급성 골수 백혈병 (AML), 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 골수 백혈병 (CML), 림프종, 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨병, 다발성 골수종 또는 골수이형성 증후군인 방법.

#### 청구항 90

제88항에 있어서, 고형 암이 뇌암, 전립선암, 유방암, 폐암, 결장암, 자궁암, 피부암, 간암, 골암, 췌장암, 난소암, 고환암, 방광암, 신장암, 두경부암, 위암, 자궁경부암, 직장암, 후두암, 및 식도암인 방법.

#### 청구항 91

제82항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 세포를 투여하기 전에, 세포를 분해제와 생체외 접촉시키고, 여기서 분해제는 분해 도메인에 결합하는 소분자인 방법.

#### 청구항 92

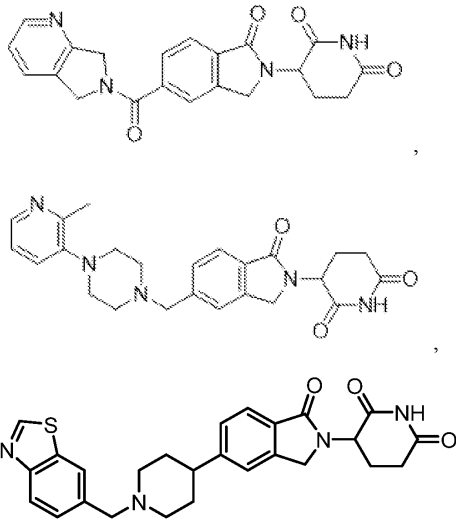
제82항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 대상체에게 세포를 분해제와 함께 투여하는 것을 포함하고, 여기서 분해제는 분해 도메인에 결합하는 소분자인 방법.

#### 청구항 93

제82항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 대상체에게 세포를 투여한 후에 분해제를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 분해제는 분해 도메인에 결합하는 소분자인 방법.

#### 청구항 94

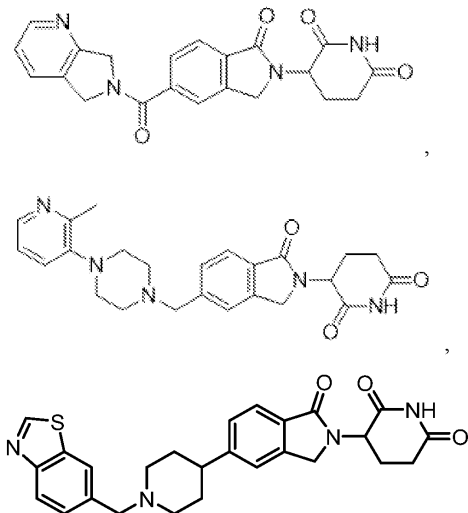
제91항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 분해제가 하기로부터 선택된 화합물인 방법:



및 그의 호변이성질체, 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 호변이성질체의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 95

하기로부터 선택된 화합물:



및 그의 호변이성질체, 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 호변이성질체의 제약상 허용되는 염.

#### 청구항 96

제95항의 화합물 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

1. 관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2021년 8월 6일에 출원된 미국 가출원 번호 63/230,225를 우선권 주장하며, 이는 임의의 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

2. 기술분야

본 개시내용은 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드, 화합물, 조성물, 및 그의 제조 방법 및 세포에서 조작된 단백질을 분해하기 위한 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0005] 3. 배경기술
- [0006] 조작된 이중 폴리펩티드를 포함하는 조작된 세포, 예컨대 키메라 항원 수용체 T (CAR-T) 세포가 치료 용도를 위해 개발되었다. 이러한 조작된 이중 폴리펩티드의 발현 수준의 조절은, 예를 들어 부작용을 감소시키고/거나 조작된 세포의 효능을 증가시킴으로써 조작된 세포의 치료 이익을 개선시킬 수 있다.
- [0007] 따라서, 한 측면에서, 조작된 폴리펩티드 및 분해제가 본원에 제공되며, 여기서 조작된 폴리펩티드는 분해 도메인이 분해제에 결합할 때 세포에서 유비퀴틴화를 매개하는 분해 도메인을 포함한다.

## 발명의 내용

- [0008] 4. 개요
- [0009] 특정 실시양태에서, 세포에서 이중 폴리펩티드의 수준을 조정하기 위한 화합물 및 그의 조성물이 본원에 기재된다. 다양한 실시양태에서, 화합물 및 그의 조성물은 세포에서 이중 폴리펩티드의 수준을 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0010] 본 실시양태는 비제한적 실시양태를 예시하는 것으로 의도된 상세한 설명 및 실시예를 참조하여 보다 완전히 이해될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0011] 5. 도면의 간단한 설명
- 도 1a는 인간 IKZF 패밀리를 포함하는 단백질 IKZF1-IKZF5 (서열식별번호: 48-52)의 서열 정렬을 나타낸다. 도 1b는 인간 IKZF1-IKZF5의 추정 G-모티프-함유 아연 핑거 서열의 표를 나타낸다. G-모티프 서열은 밑줄표시된다.
- 도 2는 C-말단 IKZF1 ZNF2 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 다이어그램이다.
- 도 3은 CAR 활성화 및 분해를 연구하기 위한 Jurkat 세포 리포터-기반 모델 시스템의 개략도이다.
- 도 4a-4c는 IKZF1 ZNF2-태그부착된 CAR이 기능을 유지하지만 (도 4a), 고농도의 화합물 A에 의해 단지 부분적으로 분해된다는 것 (도 4c)을 나타낸다. 화합물 A의 구조를 도 4b에 나타낸다.
- 도 5a는 C-말단 IKZF1 ZNF1, 2, 및/또는 3 도메인을 포함하는 CAR의 개략도를 나타낸다. 각각의 CAR은 또한 N-말단 CD19-결합 scFv를 포함한다. 도 5b는 C-말단 IKZF1 도메인 보유 활성을 갖는 CAR을 나타낸다. 도 5c는 증가하는 농도의 화합물 A의 존재 하에 C-말단 IKZF1 도메인을 갖는 CAR의 분해를 나타낸다. 도 5d는 분해가 야생형 IKZF1 도메인에 특이적임을 나타낸다.
- 도 6a-6c는 Jurkat 리포터 시스템에서 분해 후에 CAR 수준의 감소 및 CAR 활성화의 억제를 나타낸다.
- 도 7은 내인성 Erk 신호전달이 CAR 분해에 의해 감소된다는 것을 나타낸다.
- 도 8은 특정 인간 IKZF 패밀리를 구성원의 G-모티프 함유 C2H2 아연 핑거 (서열식별번호: 21, 32, 27, 38, 40, 29, 47, 31, 23, 20, 26 및 37)의 정렬을 나타낸다.
- 도 9는 다양한 인간 단백질로부터의 예측된 C2H2 아연 핑거 도메인 (서열식별번호: 72-109)을 나타낸다.
- 도 10a는 화합물 B의 구조를 제시한다. 도 10b는 시험관내 유비퀴틴화 검정을 사용한 이카로스 ZNF2로부터의 변형된 G-모티프의 유비퀴틴화를 나타낸다.
- 도 11a는 화합물 C의 구조를 제시한다. 도 11b-11c는 IKZF1 ZNF2\_3 Q1F 도메인-태그부착된 CAR의 분해가 CRBN 및 유비퀴틴-프로테아솜 경로 (UPP)의존성이라는 것을 나타낸다.
- 도 12a-12b는 IKZF1 ZNF2\_3 Q1F-태그부착된 CAR 분해가 Jurkat 리포터 검정에서 CAR 수준 및 신호전달을 감소시킨다는 것을 나타낸다.
- 도 13a는 IKZF1 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CAR의 구조를 나타낸다. 도 13b는 IKZF1 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CAR 발현이 1차 T 세포에서 화합물 C로 적정가능하다는 것을 나타낸다.
- 도 14a-14d는 IKZF1 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CAR 기능이 1차 T 세포에서 화합물 C로 적정가능하다는 것을 나타낸다.

다.

도 15는 기능적 지속성을 시험하는 데 사용된 만성 항원 자극 검정의 개략도이다.

도 16a는 화합물 D의 구조를 나타낸다. 도 16b-16c는 일시적으로 휴지된 CAR T 세포가 만성 항원 노출에 의해 덜 활성화되고 보다 나이브-유사한 표현형을 유지한다는 것을 나타낸다.

도 17a-17b는 일시적으로 휴지된 CAR T 세포가 휴지가 없는 세포보다 만성 항원 노출 후에 더 많은 염증-유발 시토카인을 생산하고 더 우수한 항-종양 활성을 나타낸다는 것을 나타낸다.

도 18a-18c는 Q1F 테그론-태그부착된 CAR이 생체내에서 가역적으로 하향조절될 수 있다는 것을 나타낸다.

도 19a-19d는 Q1F 테그론-태그부착된 CAR 하향조절이 생체내에서 종양 반응성 확장을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

도 20a-20d는 내인성 AURKA 또는 TOX 유전자좌에 대한 인-프레임 테그론-태그 녹-인이 단백질 수준의 화합물-매개 제어를 허용한다는 것을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

6. 상세한 설명

[0013]

본원에 사용된 용어 "포함하는" 및 "비롯한"은 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 용어 "포함하는" 및 "비롯한"은 언급된 바와 같은 언급된 특색 또는 성분의 존재를 명시하는 것으로 해석되어야 하지만, 하나 이상의 특색, 또는 성분, 또는 그의 군의 존재 또는 첨가를 배제하지는 않는다. 추가로, 용어 "포함하는" 및 "비롯한"은 용어 "이루어진"에 의해 포괄되는 예를 포함하는 것으로 의도된다. 결과적으로, 용어 "이루어진"은 본 발명의 보다 구체적 실시양태를 제공하기 위해 용어 "포함하는" 및 "비롯한" 대신에 사용될 수 있다.

[0014]

용어 "이루어진"은 대상이 그것이 이루어진 언급된 특색 또는 성분의 적어도 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%를 갖는다는 것을 의미한다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "이루어진"은 달성하고자 하는 기술적 효과에 필수적이지 않은 것들을 제외한 임의의 다른 특색 또는 성분을 임의의 후속 언급의 범주로부터 배제한다.

[0015]

본원에 사용된 용어 "또는"은 임의의 하나 또는 임의의 조합을 의미하는 포괄적 "또는"으로 해석되어야 한다. 따라서, "A, B 또는 C"는 하기 중 임의의 것을 의미한다: "A; B; C; A 및 B; A 및 C; B 및 C; A, B 및 C". 이러한 정의에 대한 예외는 요소, 기능, 단계 또는 작용의 조합이 어떤 방식으로든 본질적으로 상호 배타적인 경우에만 발생할 것이다.

[0016]

본 설명에서, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비 범위, 또는 정수 범위는 달리 나타내지 않는 한, 언급된 범위 내의 임의의 정수 값, 및 적절한 경우에, 그의 분율 (예컨대 정수의 1/10 및 1/100)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 임의의 물리적 특징, 예컨대 중합체 서브유닛, 크기, 또는 두께와 관련하여 본원에 인용된 임의의 수 범위는, 달리 나타내지 않는 한, 인용된 범위 내의 임의의 정수를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 용어 "약" 및 "대략"은 달리 나타내지 않는 한, 나타낸 범위, 값, 또는 구조의  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ , 또는  $\pm 1\%$ 를 의미한다.

[0017]

본원에 사용된 "조작된 폴리펩티드"는 자연에서 발생하지 않는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 조작된 폴리펩티드의 부분이 자연에서 발생할 수 있지만, 조작된 폴리펩티드는 전체로서 발생하지 않는다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는, 예를 들어 분해 도메인에 이를 융합시키거나, 또는 분해 도메인에 이를 삽입함으로써, 변형된 자연-발생 아미노산 서열을 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 생성된 조작된 폴리펩티드는 원래의 자연-발생 폴리펩티드의 활성을 실질적으로 보유한다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 2개 이상, 또는 3개 이상, 또는 4개 이상의 자연-발생 폴리펩티드로부터 유래된 2개 이상, 또는 3개 이상, 또는 4개 이상의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 분해 도메인을 포함한다.

[0018]

본원에 사용된 "테그론" 및 "분해 도메인"은 상호교환가능하게 사용되고, 세포에서 폴리펩티드에 존재하는 경우에, 분해 도메인 및 유비퀴틴 리가제 둘 다에 결합하는 화합물의 존재 하에 유비퀴틴 리가제에 의한 폴리펩티드의 유비퀴틴화를 일으키는 아미노산 서열을 의미한다. 일부 실시양태에서, 화합물은 분해 도메인에 및 세레론과 결합한다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 분해 도메인을 포함한다. 유비퀴틴 리가제에 의한 유비퀴틴화 후에, 분해 도메인을 포함하는 폴리펩티드는 분해될 수 있다.

[0019]

예시적인 조작된 폴리펩티드

- [0020] 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 CAR이다. 일부 실시양태에서, 이러한 폴리펩티드는 막횡단 도메인, 세포외 도메인, 및 세포내 도메인을 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 분해 도메인은 조작된 폴리펩티드의 세포내 도메인에 위치한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 리간드, 리간드-결합 도메인, 또는 항원-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 암 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 항체 경쇄 또는 중쇄 가변 영역, 또는 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 단일-도메인 항체 항원-결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 1개의 공동-자극 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 1개의 신호전달 도메인, 예컨대 ITAM 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 아래에서 추가로 설명되는 바와 같이 분해 도메인을 포함하는 CAR이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 분해 도메인이 유전 공학에 의해 삽입되어 있거나 또는 분해 도메인이 융합되어 있는 자연-발생 단백질을 기반으로 한다. 생성된 조작된 폴리펩티드는 추가의 자연-발생 또는 비-자연-발생 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 자연-발생 핵 또는 세포질 단백질에 기초한다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 자연-발생 단백질의 활성을 실질적으로 보유한다. 조작된 폴리펩티드의 분해는 조작된 폴리펩티드를 발현하는 세포를 접촉시킴으로써, 예컨대 분해제를 투여함으로써 달성될 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 분해 도메인은 이카로스 패밀리 아연 핑거 (ZNF) 아미노산 서열로부터 유래되고, 분해제는 유비퀴틴 리가제, 예컨대 E3 리가제에 결합하는 소분자이다. 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대한 분해제의 투여는 E3 리가제에 의한 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드의 유비퀴틴화 및 조작된 폴리펩티드의 분해를 유발한다. 일부 실시양태에서, 분해제는 세레블론 및 분해 도메인에 결합하는 화합물이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 자연-발생 단백질, 및 자연-발생 단백질에 융합되거나 또는 그 내에 삽입된 분해 도메인을 포함한다. 분해 도메인이 단백질에 "융합"될 때, 조작된 폴리펩티드는 분해 도메인을 단백질에 연결하는 링커, 예컨대 아미노산 링커를 포함할 수 있다. 이러한 아미노산 링커는 임의의 길이 및 예를 들어 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, 또는 1-5개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 링커는 글리신 및 세린으로 구성된다.
- [0023] 분해 도메인이 융합될 수 있거나 또는 분해 도메인이 삽입될 수 있는 비제한적인 예시적인 단백질은 PRDM1, TGFBR2, CASP8, CBLB, CD5, CISH, CGKA, DGKz, MAP4K1, ARID2, BACH2, CHX37, KLF2, KLF3, KLF6, MAF, SIGLEC9, TOX, ZBTB32, PTPN2, AKT1, PIK3CD, MT1E, MT2A, CSK, ITK, PAG1, PDCD4, ZC3H12A, DNMT1, DNMT3A, PRBM1, STK4, TET2, BNIP3, FAS, CBL, BGAT5, RNF128, STK17B, TRIB1, TXNIP, UBASH3A, BATF, FLI1, IKZF1, IKZF2, IRF4, NFATC1, NR4A1, MAP2K1, MAP2K2, MAP4K4, PPARGC1A, RELB, TMEM173, USP10, MT1A, PP2A 패밀리 구성원, RASA2, NR4A2, NR4A3, AHR, CD70, LHALS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TAZ, USP21, 또는 YAP1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질은 포유동물 단백질, 예컨대 인간 단백질이다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 세포 내의 내인성 단백질에 융합되거나 또는 그 내로 삽입된다. 일부 이러한 실시양태에서, 분해 도메인을 코딩하는 서열은 내인성 단백질에 융합되거나 또는 그 내로 삽입된 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드가 발현하도록 내인성 단백질을 발현하는 세포의 게놈 내로 삽입될 수 있다. 핵산 서열, 예컨대 분해 도메인을 코딩하는 서열을 세포의 게놈 내로 삽입하는 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 CRISPR /Cas를 통한 아데노-연관 바이러스 (AAV)-매개 또는 비-바이러스 상동성-지정 재조합, 렌티바이러스 형질도입, 또는 트랜스포존 전달을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 면역 세포, 예컨대 T 림프구 내의 내인성 단백질에 융합되거나 또는 그 내로 삽입된다. 일부 이러한 실시양태에서, T 세포는 단리되고, 조작된 폴리펩티드를 발현하도록 조작되고, 환자에게 투여된다. 환자에게 투여한 후, 조작된 폴리펩티드의 분해를 원하는 경우에 분해제를 후속적으로 투여할 수 있다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열이 세포 내로 도입된다. 핵산을 세포 내로 도입하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (폴리뉴클레오티드)을 함유하는, 합성 벡터, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터, 자율 복제 플라스미드, 바이러스 (예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 헤르페스 바이러스) 등을 포함한다.
- [0026] 예시적인 분해 도메인
- [0027] 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드는 분해 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 분해제에 결합하는 아미노산 서열을 포함한다. 분해제는 분해 도메인 및 유비퀴틴 리가제와 회합하여, 조작된 폴리펩티드

의 유비퀴틴화를 유발한다.

- [0028] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 이카로스 패밀리 단백질, 예컨대 이카로스, 헬리오스, 아이올로스, 에오스 또는 페가수스의 G-모티프로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 비제한적 예시적인 G-모티프는 도 1b에 제시된 서열에서 밀줄표시된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 분해 도메인은 제1 위치의 아미노산을 페닐알라닌 (F)으로 대체함으로써 천연 G-모티프 서열로부터 변형된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 자연적으로 제1 위치에 Q를 포함하는 G-모티프로부터 유래되어, 분해 도메인은 Q1F 치환을 포함한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열 FCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> (서열식별번호: 1)를 포함한다. 일부 실시양태에서, X<sub>1</sub>은 아스파라긴, 아스파르테이트, 글리신, 글루타민, 메티오닌, 히스티딘, 트립토판, 이소류신, 아르기닌, 류신, 발린, 트레오닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택되고; X<sub>2</sub>는 글루타민, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 이소류신, 발린, 및 메티오닌으로부터 선택되고; X<sub>3</sub>은 알라닌, 세린, 시스테인, 아르기닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 및 글리신으로부터 선택되고; X<sub>4</sub>는 세린, 메티오닌, 리신, 이소류신, 발린, 히스티딘, 글루타민, 아르기닌, 페닐알라닌, 및 트립토판으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>1</sub>은 아스파라긴, 글루타민, 메티오닌, 히스티딘, 트립토판, 이소류신, 아르기닌, 류신, 발린, 트레오닌, 및 페닐알라닌으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>2</sub>는 글루타민, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 이소류신, 및 메티오닌으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>3</sub>은 알라닌, 세린, 시스테인, 및 글리신으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>4</sub>는 세린, 메티오닌, 히스티딘, 글루타민, 아르기닌, 페닐알라닌, 및 트립토판으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>1</sub>은 아스파라긴이다. 일부 실시양태에서, X<sub>2</sub>는 글루타민이다. 일부 실시양태에서, X<sub>3</sub>은 알라닌 또는 세린이다. 일부 실시양태에서, X<sub>3</sub>은 알라닌이다. 일부 실시양태에서, X<sub>4</sub>는 세린이다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드의 분해 도메인은 아미노산 서열 FCNQCGAS (서열식별번호: 3)를 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열 FCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub> (서열식별번호: 2)를 포함하며, 여기서 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, 및 X<sub>4</sub>는 상기 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, X<sub>5</sub>는 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 티로신, 시스테인, 및 글루타민으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>5</sub>는 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 아르기닌, 히스티딘, 류신, 티로신, 및 글루타민으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>5</sub>는 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌, 류신, 티로신, 및 글루타민으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X<sub>5</sub>는 페닐알라닌이다.
- [0031] 다양한 실시양태에서, 분해 도메인은 상기 논의된 변형된 G-모티프를 포함하는 적어도 하나의 아연 핑거 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 아연 핑거 도메인은 이카로스 패밀리 단백질, 예컨대 이카로스, 헬리오스, 아이올로스, 에오스 또는 페가수스로부터 유래된다. G-모티프를 포함하는 비제한적인 예시적인 아연 핑거가 도 1b에서 제시된다. 다양한 실시양태에서, 분해 도메인은 1, 2, 3, 또는 4개의 아연 핑거 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 G-모티프를 포함하는 1개의 아연 핑거 도메인 및 G-모티프를 포함하지 않는 적어도 1개의 아연 핑거 도메인을 포함한다. 아연 핑거 도메인은 동일한 단백질로부터 유래될 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 2개의 아연 핑거 도메인을 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아연 핑거 2 (ZNF2)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아연 핑거 2 (ZNF2)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열, 및 적어도 1개의 추가의 아연 핑거 도메인, 예컨대 이카로스 패밀리 단백질의 적어도 1개의 추가의 아연 핑거 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아연 핑거 2 (ZNF2) 및 인간 이카로스의 ZNF1 또는 ZNF3에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아연 핑거 2 (ZNF2) 및 아연 핑거 3 (ZNF3)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아미노산 145-167 (FQCNQCGASFTQKGNLLRHILKH; 서열식별번호: 21)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부

실시양태에서, 분해 도메인은 인간 헬리오스의 아미노산 140-162 (FHCNQCASFTQKGNLLRHIKLH; 서열식별번호: 27)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 아이올로스의 아미노산 146-168 (FQCNCASFTQKGNLLRHIKLH; 서열식별번호: 32)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 에오스의 아미노산 187-209 (FHCNQCASFTQKGNLLRHIKLH; 서열식별번호: 38)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아미노산 141-168 (GERPFQCNCASFTQKGNLLRHIKLHS; 서열식별번호: 15)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 헬리오스의 아미노산 136-163 (GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHS; 서열식별번호: 60)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 아이올로스의 아미노산 142-169 (GERPFQCNCASFTQKGNLLRHIKLHT; 서열식별번호: 61)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 에오스의 아미노산 183-210 (GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHS; 서열식별번호: 62)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 이카로스의 아미노산 141-196 (GERPFQCNCASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGLRTHS; 서열식별번호: 6)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 헬리오스의 아미노산 136-191 (GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGLRTHS; 서열식별번호: 63)에 대해 적어도 85%, 적어도 90% 또는, 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 아이올로스의 아미노산 142-197 (GERPFQCNCASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGLRTHS; 서열식별번호: 64)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 인간 에오스의 아미노산 183-238 (GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGLRTHS; 서열식별번호: 65)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 5)를 포함하며, 여기서 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, 및 X<sub>4</sub>, 및 X<sub>5</sub>는 상기 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 66)를 포함하며, 여기서 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, 및 X<sub>4</sub>, 및 X<sub>5</sub>는 상기 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 67)를 포함하며, 여기서 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, 및 X<sub>4</sub>, 및 X<sub>5</sub>는 상기 정의된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 68)를 포함하며, 여기서 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, 및 X<sub>4</sub>, 및 X<sub>5</sub>는 상기 정의된 바와 같다.

[0037] 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCNCASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 7)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCNCASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCSYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 69)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCNCASFTQKGNLLRHIKLHTGEKPFKCHLCNYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 70)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 아미노산 서열: GERPFFCNCASFTQKGNLLRHIKLHSGEKPFKCPFCNYACRRRDALTGLRTHS (서열식별번호: 71)를 포함한다.

[0038] 예시적인 키메라 항원 수용체 구축물

[0039] 분해제의 존재 하에 CAR을 분해시킴으로써 그의 발현을 조정하는 능력은 CAR 발현을 조정하는 능력의 결여에 비해 많은 이점을 갖는다. 예를 들어, 잠재적으로 독성으로 이어지는 CAR을 발현하는 치료 면역 세포에 의해 매개되는 종양 표적 외(on-target but off-tumor) 효과는 CAR을 분해함으로써 감소 또는 제거될 수 있다. 너무 강한 CAR-매개 면역 반응은 CAR을 분해함으로써 감소 또는 제거될 수 있다. 체크포인트의 만성 활성화 및 과다 발현에 의해 유발된 T 세포 기능장애는 CAR의 발현을 순환시키고/거나 CAR의 발현을 적정함으로써 회피될 수 있다. 이러한 CAR 분해는 본원에 제공된 분해 도메인을 포함하는 CAR을 발현시키고, 필요에 따라 분해제를 투여

함으로써 본원에서 달성된다. 일부 이러한 실시양태에서, 분해제는 유비퀴틴 리가제, 예컨대 E3 리가제에 결합하는 소분자이다. 분해 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대한 분해제의 투여는 E3 리가제에 의한 분해 도메인을 포함하는 CAR 폴리펩티드의 유비퀴틴화 및 CAR 폴리펩티드의 분해를 유발한다. 일부 실시양태에서, 분해제는 세레블론 및 분해 도메인에 결합하는 화합물이다.

[0040] (a) CAR의 성분, 예컨대 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인, 세포 신호전달 도메인, 및/또는 공동-자극 도메인, 및 (b) 분해 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하거나 이로 이루어진 조작된 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 분해 도메인에 융합된 CAR이 분해제, 예컨대 세레블론-결합 화합물의 존재 하에 면역 세포에서 (예를 들어, T 림프구 또는 자연 킬러 세포에서) 발현되는 경우에, E3 리가제, 예컨대 세레블론, 및 CAR 내의 분해 도메인은 분해제에 결합하여, 분해 도메인을 유비퀴틴화하는 E3 리가제 복합체의 형성을 일으킨다. 따라서, 본원에 기재된 CAR의 활성화 (예를 들어, 생체내 활성화)는 분해 도메인을 포함하는 CAR을 발현하는 세포 (예를 들어, 상기 CAR 폴리펩티드를 발현하도록 조작된 T 림프구)를 분해제, 예컨대 세레블론-결합 화합물과 접촉시킴으로써 제어될 수 있다.

[0041] 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인, 세포내, 1차 신호전달 도메인, 및 분해 도메인을 포함하는 CAR인 조작된 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 본원에 제공된 아미노산 서열을 포함한다.

[0042] 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는, 아미노-말단에서 카르복시-말단의 순서로, 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인, 1차 T 세포 신호전달 도메인, 및/또는 공동-자극 도메인, 및 분해 도메인을 포함하는 CAR이다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 CAR의 C-말단에 위치한다. 일부 실시양태에서, 분해 도메인은 본원에 제공된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 공동-자극 도메인을 포함한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 아미노-말단에서 카르복시-말단의 순서로 (i) 세포외 도메인 [ECD] - 막횡단 도메인 [TM] - 공동-자극 도메인 [CoD] - 신호전달 도메인 [SigD] - 분해 도메인 [DD]을 포함하는 CAR이다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 아미노-말단에서 카르복시-말단의 순서로 ECD-TM-CoD-DD-SigD를 포함하는 CAR이다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 아미노-말단에서 카르복시-말단의 순서로 ECD-TM-DD-CoD-SigD를 포함하는 CAR이다. 분해 도메인은 또한 또 다른 도메인 내에, 예컨대 공동-자극 도메인 내에 또는 신호전달 도메인 내에, 바람직하게는 도메인의 원하는 활성이 유지되도록 삽입될 수 있다.

[0044] 예시적인 항원-결합 도메인

[0045] 본원에 제공된 CAR의 항원 결합 도메인은 항원에 결합하는 임의의 폴리펩티드 도메인, 모티프 또는 서열일 수 있다.

[0046] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인은 수용체의 항원 결합 부분이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인은 중앙 세포에 의해 생산된 리간드에 대한 수용체이다.

[0047] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인은 항체의 항원-결합 부분이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인은 항체, 항체쇄, 단일쇄 항체, 또는 그의 항원 결합 부분, Fc 도메인, 글리코포스파티딜이노시톨 앵커 도메인, 또는 scFv 항체 단편이다.

[0048] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인은 펩티드-기반 거대분자 항원 결합제, 예를 들어 파지 디스플레이 단백질이다.

[0049] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의한 항원 결합은 주요 조직적합성 복합체 (MHC)와 회합된 항원 제시로 제한된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의한 항원 결합은 MHC-비제한적이다.

[0050] 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합/인식되는 항원은 임의의 관심 항원일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 세포 (예를 들어, 중앙 세포, 예컨대 고형 중앙 세포 또는 혈액 암 중앙 세포)의 표면 상에 발현되는 항원이다.

[0051] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합/인식되는 항원은 중앙 세포 상의 항원이고, 예를 들어 항원은 중앙-특이적 항원 (TSA) 또는 중앙-연관 항원 (TAA)이다. 본원에 기재된 CAR에 의해 인식될 수 있는 (즉, CAR의 항원-결합 도메인에 의해 결합되는) 예시적인 중앙 세포 항원은, 비제한적으로, 4-1BB, 5T4, 8H9, B7-H6, 선암종 항원, α-태아단백질, B 세포 성숙 항원 (BCMA), BAFFR, B-림프종 세포, C242 항원, CA9, 암배아 항원, CA-125, 탄산 안히드라제 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD19, CD20, CD22, CD23 (IgE 수

용체), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD70, CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CLAUDIN6, CLAUDIN18.3, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFR $\gamma$  I1I, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, 태아 AchR, 피브로박틴 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체-a, 플레이트 수용체 1, G250/CAIX, GD2, GD3, 당단백질 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, IL-6, IL-13, IL-13 수용체 a2, IL-11 수용체 a, 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 a5I31, 인테그린 avI33, 카파 경쇄, L1-CAM, 람다 경쇄, 루이스 Y, 메소텔린, MORAb-009, MS4A1, MUC1, MUC1 6, 뮤신 CanAg, NCAM, N-글리코릴뉴라민산, NKG2D 리간드, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, 포스포티딜세린, 전립선-특이적 암 항원 (PSCA), 전립선 암종 세포, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, sp17, TAG72, 테나신 C, TGF  $\beta$  2, TGF-I3, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, UPK1B, VEGF-A, VEGF 수용체, VEGFR-1, VEGFR2, TEM1, TEM8, 및/또는 비멘틴을 포함한다.

[0052] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합/인식되는 항원은 림프종/백혈병, 폐암, 유방암, 전립선암, 부신피질 암종, 갑상선 암종, 비인두 암종, 흑색종, 예를 들어 악성 흑색종, 피부 암종, 결합조직 암종, 테스모이드 종양, 결합조직형성 소원형 세포 종양, 내분비 종양, 유잉 육종, 말초 원시 신경외배엽 종양, 고형 배세포 종양, 간모세포종, 신경모세포종, 비-횡문근육종 연부 조직 육종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 윌름스 종양, 교모세포종, 점액종, 섬유종, 지방종 등의 종양 세포 상에서 발현되거나 또는 그와 연관된 항원이다.

[0053] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합/인식되는 항원은 만성 림프구성 백혈병 (소림프구성 림프종), B-세포 전림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질 세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, MALT 림프종, 결절성 변연부 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 종격 (흉선) 대 B 세포 림프종, 혈관내 대 B 세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 버킷 림프종, T 림프구 전림프구성 백혈병, T 림프구 거대 과립 림프구성 백혈병, 공격성 NK 세포 백혈병, 성인 T 림프구 백혈병/림프종, 림프절외 NK/T 림프구 림프종, 비장 유형, 장병증-유형 T 림프구 림프종, 간비장 T 림프구 림프종, 모구성 NK 세포 림프종, 군상 식육종, 세자리 증후군, 원발성 피부 역형성 대세포 림프종, 림프종성 구진증, 혈관면역모세포성 T 림프구 림프종, 말초 T 림프구 림프종 (비특정), 역형성 대세포 림프종, 호지킨 림프종, 또는 비-호지킨 림프종의 종양 세포 상에서 발현되거나 또는 그와 연관된 항원이다.

[0054] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합/인식되는 항원은 비-종양-연관 항원 또는 비-종양-특이적 항원이다. 특정 실시양태에서, 항원은 종양의 한 측면, 예를 들어 종양 환경과 관련된다. 예를 들어, 종양은 종양 주위의 조직에서 염증성 상태를 유도할 수 있고, 혈관신생을 촉진하는 혈관신생 성장 인자, 인터류킨, 및/또는 시토카인을 종양의 주변부 내로 및 주변부에서 방출할 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 항원은 성장 인자, 시토카인, 또는 인터류킨 (예를 들어, 혈관신생 또는 혈관생성과 연관된 성장 인자, 시토카인, 또는 인터류킨)이다. 이러한 성장 인자, 시토카인 및 인터류킨은, 비제한적으로, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자 (bFGF), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF) 및 인터류킨-8 (IL-8)을 포함할 수 있다.

[0055] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원 결합 도메인에 의해 결합/인식되는 항원은 종양에 의해 유발된 국제화된 손상에 반응하여 정상 조직에 의해 방출된 손상 연관 분자 패턴 분자 (DAMP; 또한 알라르민으로 공지됨)이다. 본원에 기재된 CAR의 항원-결합 도메인이 결합할 수 있는 예시적인 DAMP는, 비제한적으로, 열 쇼크 단백질, 염색질-연관 단백질 고이동성 군 박스 1 (HMGB1), S100A8 (MRP8, 칼그라눌린 A), S100A9 (MRP 14, 칼그라눌린 B), 혈청 아밀로이드 A (SAA), 테옥시리보핵산, 아데노신 트리포스페이트, 요산, 및 헤파린 술페이트를 포함한다.

[0056] 예시적인 막횡단 도메인

[0057] 본원에 사용된 "막횡단 도메인"은, 막횡단 도메인을 포함하는 폴리펩티드가 세포내 및 세포외 도메인 둘 다를 포함하는 관통 막횡단 도메인, 및 막횡단 도메인을 포함하는 폴리펩티드가 세포내 도메인을 포함하지만 세포외 도메인은 포함하지 않는 막-고정 도메인을 포함한다.

[0058] 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드의 막횡단 도메인은 막횡단 도메인으로서 기능하는 것으로 관련 기술분야에 공지된, 예를 들어 CAR에서와 같이 그것이 사용될 상황에서 기능하는 것으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 분자를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 막횡단 도메인 조작된 폴리펩티드는 임의의 막횡단 단백

질의 막형단 도메인으로부터 획득되거나 유래될 수 있고, 이러한 막형단 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

- [0059] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드, 예컨대 CAR의 막형단 도메인은 T-세포 수용체로부터 획득되거나 유래되고, 예를 들어 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드의 막형단 도메인은 T-세포 수용체의 알파쇄, T-세포 수용체의 베타쇄, T-세포 수용체의 제타쇄로부터 획득되거나 유래된다.
- [0060] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드의 막형단 도메인은 CD28, CD3s, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS, TIM3, LAB3, TIGIT, PD1, 또는 CTLA4, 시토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 또는 성장 인자 수용체로부터 획득되거나 유래된다.
- [0061] 예시적인 신호전달 도메인
- [0062] 본원에 기재된 CAR의 1차 세포 신호전달 도메인은 세포 신호전달 도메인으로서 기능하는 것으로 관련 기술분야에 공지된, 예를 들어 CAR 상황에서 기능하는 것으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 세포 신호전달 도메인은 1차 T 세포 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 1차 세포 신호전달 도메인은 ZAP-70, 또는 그의 신호-전달 변이체이거나 또는 이를 포함한다.
- [0064] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 1차 세포 신호전달 도메인은 IT AM이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 IT AM은 CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD3 $\eta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\gamma$ , CD5, CD22, CD20, CD79a, CD79b, CD278 (ICOS), FcERI, CD66d, DAP10, 또는 DAP12의 IT AM이다.
- [0065] 예시적인 공동-자극 도메인
- [0066] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR은 공동-자극 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 CAR의 공동-자극 도메인(들)은 공동-자극 도메인으로서 기능하는 것으로 관련 기술분야에 공지된, 예를 들어 CAR 상황에서 기능하는 것으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 분자를 포함할 수 있다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 공동-자극 도메인은 공동-자극 CD27 폴리펩티드 서열, 공동-자극 CD28 폴리펩티드 서열, 공동-자극 OX40 (CD134) 폴리펩티드 서열, 공동-자극 4-1BB (CD137) 폴리펩티드 서열, 또는 공동-자극 유도성 T-세포 공동-자극 (ICOS) 폴리펩티드 서열로부터 획득되거나 유래된다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 공동-자극 도메인은 4-1BB (CD137), CD28, OX40, 활성화 K 세포 수용체, BTLA, 킬 리간드 수용체, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, CDS, ICAM-L LFA-1 (CD11a/CD18), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), RANK, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, Kp80 (KLRF1), Kp44, Kp30, Kp46, CD19, CD4, CD8a, CD8p, IL2Rp, IL2Ry, IL7Ra, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, IL15Ra, IL7R, CD18, CD132, LFA-1, ITGB7, KG2D, KG2C, TFR2, TRANCE/RAKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, DAP10, DAP12, CD83의 리간드, MHC 부류 I 분자, TNF 수용체 단백질, 이뮤노글로불린-유사 단백질, 시토카인 수용체, 인테그린, 및/또는 신호전달 림프구성 활성화 분자이거나 또는 이를 포함한다.
- [0069] 다른 예시적인 성분
- [0070] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드, 예컨대 CAR은 T 세포 생존 모티프를 추가로 포함한다. T 세포 생존 모티프는 항원에 의한 자극 후에 T 림프구의 생존을 용이하게 하는 임의의 아미노산 서열 또는 모티프일 수 있다. 특정 실시양태에서, T 세포 생존 모티프는 CD3, CD28, IL-7 수용체 (IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 또는 형질전환 성장 인자  $\beta$  (TGFB) 수용체의 세포내 신호전달 도메인이거나 또는 그로부터 유래된다.
- [0071] 예시적인 변형
- [0072] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드는, 예를 들어 아실화, 아미드화, 글리코실화, 메틸화, 인

산화, 황산화, 수모일화, 및/또는 유비퀴틸화 (또는 다른 단백질 변형)에 의해 변형된다.

[0073] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드는 검출가능한 신호를 제공할 수 있는 표지, 예를 들어 방사성동위원소 또는 형광 화합물로 표지된다.

[0074] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 것의 1개 이상의 측쇄는 유도체화, 예를 들어 숙신산 또는 다른 카르복실산 무수물을 사용한 리시닐 및 아미노 말단 잔기의 유도체화, 또는 예를 들어 이미도에스테르, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로히드라이드; 트리니트로벤젠술폰산; 0-메틸이소우레아; 2,4 펜탄디온을 사용한 유도체화; 및 글리옥실레이트와의 트랜스아미나제-촉매 반응이다. 특정 실시양태에서, 카르복실 측기, 아스파르트산 또는 글루타민은 카르보디이미드 ( $R-N=C=N-$ ), 예컨대 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-(4-에틸)카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카르보디이미드와의 반응에 의해 선택적으로 변형될 수 있다.

[0075] 예시적인 핵산

[0076] 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드의 생산에 유용한 핵산은 DNA, RNA, 및 핵산 유사체를 포함한다. 핵산 유사체는 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있고, 테옥시티미딘에 대한 테옥시우리딘 치환, 테옥시시티딘에 대한 5-메틸-2'-테옥시시티딘 또는 5-브로모-2'-테옥시시티딘 치환을 포함할 수 있다. 당 모이어티의 변형은 2'-0-메틸 또는 2'-0-알릴 당을 형성하기 위한 리보스 당의 2' 히드록실의 변형을 포함할 수 있다. 테옥시리보스 포스페이트 백본은 각각의 염기 모이어티가 6원 모르폴리노 고리, 또는 펩티드 핵산에 연결된 모르폴리노 핵산을 생산하도록 변형될 수 있고, 여기서 테옥시포스페이트 백본은 슈도펩티드 백본에 의해 대체되고, 4개의 염기는 유지된다. 예를 들어, 문헌 [Summerton and Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 187-195; and Hyrup et al. (1996) Bioorgan. Med. Chain. 4:5-23]을 참조한다. 또한, 테옥시포스페이트 백본은, 예를 들어 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 백본, 포스포로아미다이트, 또는 알킬 포스포트리에스테르 백본으로 대체될 수 있다.

[0077] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드-코딩 핵산은 핵산 벡터 내에 포함된다. 예를 들어, 관심 세포, 예를 들어 T 림프구는 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (폴리뉴클레오티드)을 함유하는 합성 벡터, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터, 자율 복제 플라스미드, 바이러스 (예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 헤르페스 바이러스) 등을 사용하여 형질전환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 포함하는 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 세포, 예를 들어 T 림프구의 형질전환에 적합한 렌티바이러스 벡터는 미국 특허 번호 5,994, 136; 6,165,782; 6,428,953; 7,083,981; 및 7,250,299에 기재된 렌티바이러스 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 세포, 예를 들어 T 림프구의 형질전환에 적합한 HIV 벡터는 미국 특허 번호 5,665,577에 기재된 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

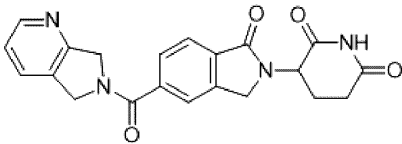
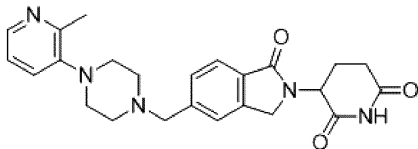
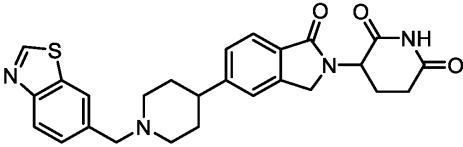
[0078] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드-코딩 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 T 세포-특이적 프로모터, 자연 킬러 (NK) 세포-특이적 프로모터, T 세포 또는 NK 세포 내에서 기능하는 유도성 프로모터 또는 구성적 프로모터이다.

[0079] 예시적인 세포

[0080] 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드는 조작된 폴리펩티드, 예컨대 CAR 발현이 유용한 세포에서 발현될 수 있으며, 즉, 세포는 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드-코딩 핵산을 포함하도록 조작되어, 세포에서 핵산의 발현 시, 세포는 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 발현한다. 예를 들어, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드는 T 림프구 또는 자연 킬러 세포에서 발현될 수 있다. 본원에 기재된 CAR을 발현하는 본원에 제공된 세포는 "CAR 세포"로 지칭될 수 있다.

[0081] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드를 발현하도록 변형된 세포 (예를 들어, T 림프구 또는 자연 킬러 세포)가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 (a) CAR의 성분, 예컨대 항원-결합 도메인, 막횡단 도메인, 세포 신호전달 도메인, 및/또는 공동-자극 도메인, 및 (b) 분해 도메인을 포함하는 CAR인 조작된 폴리펩티드를 발현하도록 변형되었다. 일부 실시양태에서, 세포는 또 다른 단백질에 융합되거나 또는 또 다른 단백질 내로 삽입된 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드를 발현하도록 변형되었다. 변형된 세포를 본원에 제공된 분해제와 접촉시키는 것은 조작된 폴리펩티드의 유비퀴틴화 및 분해를 유발한다.

- [0082] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드는 T 림프구에서 발현된다. T 림프구는 나이브 T 림프구 또는 MHC-제한 T 림프구일 수 있다. 특정 실시양태에서, T 림프구는 종양 침윤 림프구 (TIL)이다. 특정 실시양태에서, T 림프구는 종양 생검으로부터 분리되었거나, 또는 종양 생검으로부터 분리된 T 림프구로부터 확장되었다. 특정의 다른 실시양태에서, T 림프구는 말초 혈액, 제대혈, 또는 림프로부터 확장된 T 림프구로부터 분리되었거나, 또는 확장된다.
- [0083] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 포함/발현하도록 조작된 세포 (예를 들어, T 림프구)는 세포 (예를 들어, T 림프구)가 본원에 기재된 치료 방법의 일부로서 투여될 개체에 대해 자가이다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 폴리펩티드를 포함/발현하도록 조작된 세포 (예를 들어, T 림프구)는 세포 (예를 들어, T 림프구)가 투여될 개체에게 동종이다. 동종 세포 (예를 들어, T 림프구)가 변형된 세포, 예컨대 CAR 세포를 제조하는 데 사용되는 경우에, 개체에서 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 가능성을 감소시킬 세포 (예를 들어, T 림프구)를 선택하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 바이러스-특이적 T 림프구가 CAR T 림프구의 제조를 위해 선택되고; 이러한 림프구는 임의의 수용자 항원에 결합하고 따라서 이에 의해 활성화되는 천연 능력이 크게 감소된 것으로 예상될 것이다. 특정 실시양태에서, 동종 세포 (예를 들어, T 림프구)의 수용자-매개 거부는 숙주에게 1종 이상의 면역억제제, 예를 들어 시클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, 시클로포스파미드 등을 공동-투여함으로써 감소될 수 있다.
- [0084] 일부 실시양태에서, 개체로부터 T 림프구를 수득하고, 임의로 확장시킨 후, 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 벡터로 형질전환시키고, 임의로 확장시킨다. 일부 실시양태에서, 개체로부터 T 림프구를 수득하고, 임의로 확장시킨 후, 본원에 기재된 CAR인 조작된 폴리펩티드를 코딩하는 벡터로 형질전환시키고, 임의로 확장시킨다. 벡터를 함유하는 세포는 일부 실시양태에서, 선택 마커를 사용하여 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개체로부터 T 림프구를 수득하고, 임의로 확장시킨 다음, 이를 변형시켜 분해 도메인을 원하는 내인성 단백질 유전자 내로 삽입함으로써, 내인성 단백질에 융합되거나 또는 그 내에 삽입된 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드를 발현시킨다. 변형된 T 림프구는 임의로 추가로 확장될 수 있다.
- [0085] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 폴리펩티드를 발현하는 데 사용되는 T 림프구는 천연 TCR 단백질, 예를 들어 천연 TCR 복합체를 형성할 수 있는 TCR- $\alpha$  및 TCR- $\beta$ 를 포함한다. 특정의 다른 실시양태에서, T 림프구 내의 TCR- $\alpha$  및 TCR- $\beta$ 를 코딩하는 천연 유전자 중 하나 또는 둘 다는 비-기능적이도록 변형되는데, 예를 들어 특정 부분 또는 모두가 결실되거나 또는 돌연변이가 삽입된다.
- [0086] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 신호전달 도메인(들)은 CAR을 포함하는/발현하는 세포 (예를 들어, T 림프구)의 증식 및 확장을 촉진하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 비변형된 T 림프구 및 CD3 $\zeta$  신호전달 도메인 및 CD28 공동-자극 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 T 림프구는 CD3 및 CD28에 대한 항체, 예를 들어 비드에 부착된 항체를 사용하여 확장될 수 있고; 예를 들어, 미국 특허 번호 5,948,893; 6,534,055; 6,352,694; 6,692,964; 6,887,466; 및 6,905,681을 참조한다. 유사하게, 신호전달 모티프에 대한 항체는 본원에 기재된 CAR을 포함하는 세포 (예를 들어, T 림프구)의 증식을 자극하는 데 사용될 수 있다.
- [0087] 특정 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 원하는 경우에 조작된 폴리펩티드를 발현하는 실질적으로 모든 세포의 사멸을 가능하게 하는 "자살 유전자" 또는 "안전성 스위치"로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 분해 도메인은 세포의 생존 및/또는 특정한 활성화에 필요한 내인성 단백질을 발현하는 유전자 내로 삽입될 수 있다. 세포를 분해제와 접촉시키는 것은 내인성 단백질 (즉, 분해 도메인 및 내인성 단백질을 포함하는 조작된 폴리펩티드)의 유비퀴틴화 및 분해를 유발하여, 세포의 활성을 무력화시키거나 세포를 사멸시킨다.
- [0088] 예시적인 분해제
- [0089] 본원에 사용된 용어 "분해제"는 본원에 제공된 분해 도메인 및 유비퀴틴 리가제, 예컨대 E3 리가제에 결합할 수 있는 분자 (예를 들어, 소분자)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 분해제는 분해 도메인에 결합하고, 세레블론에 결합한다. 일부 실시양태에서, 분해제는 분해 도메인 및 유비퀴틴 리가제에 결합하여 E3 리가제와 분해 도메인 사이에 회합을 일으킨다. 일부 이러한 실시양태에서, 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드는 분해제에 의해 매개된 회합 후에 유비퀴틴 리가제에 의해 유비퀴틴화된다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 분해제는 세레블론-결합 화합물이다. 일부 실시양태에서, 분해제는 3-(5-(6,7-디히드로-5H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-카르보닐)-1-옥소이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 (화합물 B), 3-(5-((4-(2-메틸피리딘-3-일)피페라진-1-일)메틸)-1-옥소이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 (화합물 C), 또는 3-[5-[1-(1,3-벤조티아졸-6-일메틸)-4-피페리딜]-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (화합물 D)이다.

| 화합물 | 구조                                                                                | 명칭                                                                |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| B   |  | 3-(5-(6,7-디히드로-5H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-카르보닐)-1-옥소이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 |
| C   |  | 3-(5-((4-(2-메틸피리딘-3-일)피페라진-1-일)메틸)-1-옥소이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온      |
| D   |  | 3-[5-[1-(1,3-벤조티아졸-6-일메틸)-4-피페리딜]-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온      |

[0091]

[0092]

일부 실시양태에서, 분해제는 WO 2019/038717 A1에 개시된 화합물이고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0093]

본원에 기재된 방법에 따라 사용되는 분해제, 또는 그의 거울상이성질체 또는 거울상이성질체의 혼합물; 또는 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 공-결정, 클라트레이트, 또는 다형체는 단일 용량, 예컨대, 예를 들어 단일 볼루스 주사, 또는 경구 정제 또는 환제로서; 또는 시간에 따라, 예컨대, 예를 들어 시간에 따른 연속 주입 또는 시간에 따른 분할 볼루스 용량으로 전달될 수 있다.

[0094]

본원에 기재된 방법에 따라 사용되는 분해제는 정맥내, 동맥내, 비경구, 근육내, 피하, 척수강내, 또는 안내 투여, 또는 특정한 기관 또는 조직 내에서의 투여를 위해 제제화될 수 있다.

[0095]

예시적인 방법

[0096]

일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드를 분해제와 접촉시키는 것을 포함하는, 분해 도메인을 포함하는 조작된 폴리펩티드의 수준을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 접촉은 세포에서 일어나고, 분해제는 분해 도메인 및 유비퀴틴 리가제에 결합하여, 조작된 폴리펩티드의 유비퀴틴화 및 분해를 유발한다. 일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드의 분해는 세포의 적어도 하나의 활성의 감소 및/또는 세포의 적어도 하나의 활성의 증가 및/또는 세포의 사멸을 유발한다. 비제한적 예시적인 효과는 세포 (예컨대 T 세포) 활성화에 대한 억치를 낮추는 것, 세포 (예컨대 T 세포)의 기능적 지속성을 증가시키는 것, 세포의 생존을 촉진하는 것, 및 세포의 증식을 증가시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분해제는 화합물 B, 화합물 C, 또는 화합물 D이다. 일부 실시양태에서, 방법은 분해제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 대상체는 조작된 폴리펩티드를 포함하는 세포를 포함한다.

[0097]

일부 실시양태에서, 조작된 폴리펩티드는 분해제의 존재 하에 분해된다. 일부 실시양태에서, 분해제는 분해 도메인 및 유비퀴틴 리가제, 예컨대 세레블론과 상호작용한다. 일부 실시양태에서, 분해제는 분해 도메인, 분해제 및 유비퀴틴 리가제를 포함하는 복합체를 매개하여 조작된 폴리펩티드의 유비퀴틴화를 일으킨다.

[0098]

조작된 폴리펩티드 (예를 들어, CAR 세포)를 포함/발현하도록 변형된 본원에 제공된 변형된 세포, 예컨대 T 림프구 (즉, T 세포)는, 예를 들어 개체가 CAR의 표적을 발현하는 암을 갖기 때문에, 변형된 세포로부터 이익을 얻을 개체를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 T 이펙터 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포, T 이펙터 세포, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포는 조작된 폴리펩티드를 포함한다.

- [0099] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR의 항원-결합 도메인에 의해 결합된 항원을 발현하는 표적 세포를 사멸시키는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 방법은 상기 표적 세포를 본원에 기재된 CAR을 포함하는/발현하는 본원에 제공된 변형된 세포 (예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 표적 세포는 암 세포, 예를 들어 혈액 암 세포 또는 고형 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CAR을 포함하는/발현하는 본원에 기재된 변형된 세포, 예를 들어 T 세포 또는 NK 세포의 집단을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 CAR은 암 항원 (예를 들어, TSA 또는 TAA)에 특이적인 항원-결합 도메인을 포함한다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 표적 세포 또는 암 세포는 1종 이상의 하기 항원, 또는 그의 단편을 발현한다: 4- IBB, 5T4, 8H9, B7-H6, 선암종 항원, a-태아단백질, B 세포 성숙 항원 (BCMA), BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, CA9, 암배아 항원, CA-125, 탄산 안히드라제 9 (CA-IX), CCR4, CD3, CD4, CD 19, CD20, CD22, CD23 (IgE 수용체), CD28, CD30 (T FRSF8), CD33, CD38, CD40, CD44v6, CD44v7/8, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD123, CD152, CD171, CD200, CD221, CE7, CEA, C-MET, CNT0888, CTLA-4, DRS, EpCAM, ErbB2, ErbB3/4, EGFR, EGFRvIII, EphA2, EGP2, EGP40, FAP, 태아 AchR, 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체-a, 플레이트 수용체 1, G250/CAIX, GD2, GD3, 당단백질 75, GP MB, HER2/neu, HGF, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, HMW-MAA, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, IL-6, IL-13, IL-13 수용체 a2, IL-11 수용체 a, 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 a5I31, 인테그린 avI33, 카파 경쇄, L1-CAM, 람다 경쇄, 루이스 Y, 메소텔린, MORAb-009, MS4A1, MUC1, MUC1 6, 뮤신 CanAg, NCAM, N-글리코틸뉴라민산, NKG2D 리간드, NPC-IC, PDGF-R a, PDL192, 포스파티딜세린, 전립선-특이적 암 항원 (PSCA), 전립선 암종 세포, PSMA, PSC1, RANKL, RON, ROR1, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, sp17, TAG72, 테나신 C, TGF β2, TGF-13, TL1A, TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, VEGF-A, VEGF 수용체, VEGFR-1, VEGFR2, TEM1, TEM8, 및/또는 비멘틴.
- [0101] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 변형된 세포, 예컨대 CAR 세포의 투여 후에, CAR의 발현을 감소 또는 제거하고, 따라서 표적화된 세포 사멸을 감소 또는 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 방법은 본원에 제공된 분해제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 분해제의 투여는 조작된 폴리펩티드 (예를 들어, CAR)의 분해를 일으키고, CAR의 항원-결합 도메인에 의해 결합된 항원을 발현하는 세포에 대한 변형된 세포의 표적화를 감소시키거나 제거한다. 이러한 방식으로, CAR 세포를 사용한 치료의 활성이 조정될 수 있고, 안전성이 개선될 수 있다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 상기 변형된 세포의 집단이 대상체에게 먼저 투여된 후, 변형된 세포 집단의 투여 후 특정 기간, 예를 들어 세포 집단의 투여 후 30분, 1시간, 6시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 1주에 분해제가 투여된다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 분해제는 화합물 B, 화합물 C, 또는 화합물 D이다.
- [0104] 본원에 기재된 치료 방법에 따라 치료될 수 있는 암의 비제한적 목록은 림프종, 백혈병, 폐암, 유방암, 전립선암, 부신피질 암종, 갑상선 암종, 비인두 암종, 흑색종, 피부 암종, 결장직장 암종, 데스모이드 종양, 결합조직 형성 소원형 세포 종양, 내분비 종양, 유잉 육종, 말초 원시 신경외배엽 종양, 고형 배세포 종양, 간모세포종, 신경모세포종, 비-횡문근육종 연부 조직 육종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 윌름스 종양, 신경교종, 교모세포종, 점액종, 섬유종, 및 지방종을 포함한다. 예시적인 림프종 및 백혈병은, 비제한적으로, 만성 림프구성 백혈병 (소림프구성 림프종), B-세포 전림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질 세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, MALT 림프종, 결절성 변연부 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 중격 (흉선) 대 B 세포 림프종, 혈관내 대 B 세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 버킷 림프종, T 림프구 전림프구성 백혈병, T 림프구 거대 과립 림프구성 백혈병, 공격성 NK 세포 백혈병, 성인 T 림프구 백혈병/림프종, 림프절외 NK/T 림프구 림프종, 비장 유형, 장병증-유형 T 림프구 림프종, 간비장 T 림프구 림프종, 모구성 NK 세포 림프종, 균상 식육종, 세자리 증후군, 원발성 피부 역형성 대세포 림프종, 림프종성 구진증, 혈관면역모세포성 T 림프구 림프종, 말초 T 림프구 림프종 (비특정), 역형성 대세포 림프종, 호지킨 림프종, 또는 비-호지킨 림프종을 포함한다.
- [0105] 질환 또는 장애의 치료, 예를 들어 암을 갖는 개체의 치료에서의 본원에 기재된 변형된 세포, 예컨대 CAR 세포의 효능은 질환 또는 장애의 진행을 나타내는 것으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 특정한 질환 또는 장애에 특이적인 하나 이상의 기준에 의해 평가될 수 있다. 일반적으로, 질환/장애 (예를 들어, 암)를 갖는 개체에게 CAR 세포 (예를 들어, CAR T 림프구)를 투여하는 것은 하나 이상의 상기 기준이 검출가능하게, 예를 들어 유의하게, 질환 상태 값 또는 범위에서 정상 값 또는 범위로, 또는 정상 값 또는 범위를 향해 이동할

때 효과적이다.

- [0106] 본원에 기재된 변형된 세포는 임의의 제약상 허용되는 용액, 바람직하게는 살아있는 세포의 전달에 적합한 용액, 예를 들어 염수 용액 (예컨대 링거액), 젤라틴, 탄수화물 (예를 들어, 락토스, 아밀로스, 전분 등), 지방산 에스테르, 히드록시메틸셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리딘 등에서 제제화될 수 있다. 이러한 제제는 바람직하게는 CAR 세포의 첨가 전에 멸균되고, 보조제, 예컨대 운환제, 보존제, 안정화제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충제, 및 착색제와 혼합될 수 있다. CAR 세포를 제제화하는 데 사용하기에 적합한 제약 담체는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 WO 96/05309에 기재되어 있다.
- [0107] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 세포 (예를 들어, CAR 세포)는 개별 용량으로 제제화되고, 여기서 상기 개별 용량은 적어도, 많아야, 또는 약  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ , 또는  $1 \times 10^{11}$  개 세포를 포함한다.
- [0108] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 세포 (예를 들어, CAR 세포)는 정맥내, 동맥내, 비경구, 근육내, 피하, 척수강내 또는 안내 투여, 또는 특정한 기관 또는 조직 내에서의 투여를 위해 제제화된다.
- [0109] 7. 실시예
- [0110] 7.1. 실시예 1: IKZF1 ZNF2 G-모티프-태그부착된 CAR은 기능을 유지함
- [0111] IKZF1 ZNF2 태그부착된 CD19 CAR T 세포 (도 2, 서열식별번호: 15의 ZNF2 아미노산 서열)의 기능을 리포터 검증에서 평가하였고, 여기서 Jurkat 세포는 CAR 및 TCR 활성화와 연관된 Nur77 유전자가 활발하게 전사될 때 tdTomato를 발현하도록 조작되었다 (도 3). ZNF-태그부착된 CD19 CAR, 태그부착되지 않은 CD19 CAR, 또는 태그부착되지 않은 BCMA CAR 음성 대조군을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 Jurkat 리포터 세포주 내로 형질도입하였다. 이어서, 형질도입된 세포를 37°C에서 CD19-발현 K562 표적 세포주와 공동-배양하였다. 평균 형광 강도 (MFI) 및 양성 세포의 전체 퍼센트 형태 둘 다의 tdTomato의 수준을 12시간 동안 2시간마다 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 결과는 CAR 활성화의 시기 및 수준 둘 다가 태그부착된 및 비태그부착된 CD19 CAR 사이에 동일한 반면, BCMA CAR T는 CD19 표적 세포주의 존재 하에 활성화되는 데 실패하였다는 것을 보여주었다 (도 4a).
- [0112] 상이한 농도의 화합물 A에서 달성된 CAR 분해의 수준을 평가하기 위해, 화합물 A (도 4b)의 약물 적정을 IKZF1 ZNF2-태그부착된 또는 태그부착되지 않은 CD19 CAR로 형질도입된 Jurkat 상에서 수행하였다. 화합물 A는 미국 공개 번호 2019/0008852 A1의 페이지 42, 표 4에 제시되어 있다 (화합물 A). 세포를 37°C에서 24시간 동안 화합물 A와 함께 인큐베이션한 후, CAR 수준을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 데이터는 IKZF1 ZNF2 G-모티프 태그론이 높은 화합물 A 농도에서 ~55% CAR 분해를 매개하였다는 것을 나타낸다 (도 4c). 이러한 수준의 CAR 분해는 CAR에 의해 인식되는 항원을 발현하는 K562로 챌린지한 경우에 CAR 활성을 억제하기에 충분하지 않을 수 있다 (데이터는 제시되지 않음). 이 결과는 태그론 단백질 서열이 화합물 A에 보다 강력하게 반응할 수 있도록 태그론 단백질 서열을 변형시키는 연구를 촉발하였다.
- [0113] 7.2. 실시예 2: IKZF1 아연 핑거의 대안적 배열의 평가
- [0114] IKZF1-ZNF2 태그론을 추가로 변형시켜 개선된 CAR 분해를 촉진하였다. 태그부착되지 않은 CAR 및 원래의 IKZF1-ZNF2 태그론으로 태그부착된 CAR을 IKZF1, ZNF1, ZNF2, 및 ZNF3의 대안적 배향 및 조합과 함께 시험하였다 (도 5a). 각각의 CAR은 CD28 막횡단 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3ζ (CD3z) 신호전달 도메인을 포함하였다. IKZF1 태그론을 C-말단에 융합시켰다. 서열식별번호: 53-57을 참조한다. 태그부착되지 않은 CD19 CAR 또는 다양한 형상의 IKZF1-ZNF로 태그부착된 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 Jurkat 세포주 내로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 먼저 CD19-발현 K562 표적 세포주와 37°C에서 7.5시간 동안 공동-배양하고, tdTomato 리포터의 정규화된 수준을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 결과는 어떠한 태그론 태그도 태그부착되지 않은 CAR에 비해 항원의 존재 하에 CAR 활성을 감소시키지 않았음을 입증하였다 (도 5b). 이어서, CAR-형질도입된 Jurkat 세포를 화합물 A의 적정의 존재 하에 37°C에서 24시간 동안 배양하여 각각의 태그론에 대한 Y-max 및 EC50 값을 결정하였다. 이러한 실험으로부터, ZNF2\_3 태그부착이 화합물 A의 최저 농도에서 분해를 강화시켰음이 결정되었다 (도 5c). ZNF1\_2 태그부착은 ZNF1이 G-모티프를 함유하고 탠덤 태그론에 추가의 복잡성을 부가하기 때문에 배제되었다. 따라서, 이러한 구성이 추가의 시험을 위해 선택되었다.
- [0115] 이러한 분해가 기능적 태그론에 의존적이었다는 것을 입증하기 위해, WT ZNF2\_3 (서열식별번호: 13)으로 태그부착된 CAR을 G-모티프 내에 G6N 돌연변이를 함유하는 ZNF2\_3 (QCNQCNASF; 서열식별번호: 17)으로 태그부착된 CAR

과 함께 화합물 A 적정으로 상기와 같이 시험하였다 (도 5d). WT 태그론은 보다 높은 화합물 A 농도에서 깊은 CAR 분해를 유도하였지만, G6N 돌연변이체 태그부착된 CAR은 임의의 용량에서 화합물 A에 반응하는 데 실패하였다. 이들 결과는 G-모티프의 G6 잔기가 최적화된 ZNF2\_3 태그론과의 화합물 A 상호작용에 기여한다는 것을 시사한다.

[0116] 7.3. 실시예 3: IKZF1 ZNF2\_3 태그부착된 CAR 분해가 활성을 억제함

[0117] IKZF1 ZNF2\_3 태그부착된 CD19 CAR T 세포를 분해함으로써 CAR T 신호전달을 제거하는 능력을 Jurkat 리포터 검정에서 평가하였다. ZNF2\_3 태그부착된 또는 태그부착되지 않은 CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 리포터 세포주 내로 형질도입하였다 (실시예 2 참조). 이어서, 형질도입된 세포를 100 nM 화합물 A로 48시간 동안 전처리한 다음, CD19-발현 K562 표적 세포주와 37°C에서 8시간 동안 공동-배양하였다. 평균 형광 강도 (MFI) 형태의 tdTomato의 수준 (도 6b) 및 양성 세포의 전체 퍼센트, 뿐만 아니라 정규화된 CAR 수준 (도 6c)을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다 (도 6a). 화합물 A의 이러한 농도에서, ZNF2\_3 태그론을 함유하는 CAR의 분해는 동족 항원을 발현하는 K562 세포로 켈린지한 경우에 CAR 활성을 강하게 억제하기에 충분히 깊었다.

[0118] CAR 분해에 의한 신호전달의 폐지를 하류 MAPK 신호전달 경로의 활성화를 측정함으로써 평가하였다. Jurkat 세포를 상기 기재된 바와 같이 태그부착되지 않은, WT 태그론-태그부착된 또는 G6N 태그론-태그부착된 CAR로 형질도입시켰다. 세포를 1 mM 화합물 A로 37°C에서 12시간 동안 전처리한 다음, 모 또는 CD19-발현 K562 세포와 30 분 동안 공동-배양하였다. 이어서, 세포를 켈릿화하고, 용해시키고, 변성 단백질 겔 상에서 전개시키고, 막으로 옮기고, 항체로 프로빙하고, 필름으로 가시화하였다 (도 7). 이들 결과는, 본원에서 Erk 인산화 (pErk)로 나타내어지는 CAR에 의해 활성화된 내인성 신호전달 경로가 WT IKZF1 ZNF2\_3-태그부착된 CAR을 함유하는 세포에 화합물 A를 투여한 후에 항원의 존재 하에 감소된다는 것을 보여준다.

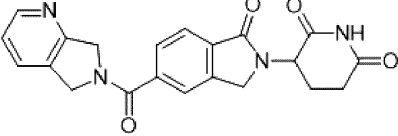
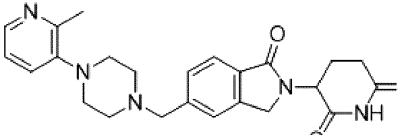
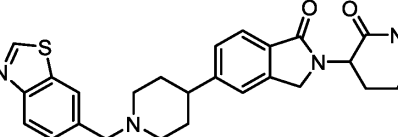
[0119] 7.4. 실시예 4: 신규 태그론-화합물 쌍을 확인하기 위한 태그론 돌연변이유발

[0120] 구조적 연구는, 기질이 세레블론/화합물 복합체에 결합된 경우에 G-모티프의 위치 1이 화합물에 매우 근접해 있다는 것을 밝혀냈다 (제시되지 않음). IKZF 패밀리의 G-모티프 태그론 서열 (도 8) 및 다른 C2H2 아연 핑거 내의 예측된 태그론 (도 9)의 정렬은 상기 위치에서 다양한 아미노산 세트를 보여준다. 따라서, 추가의 화합물: 태그론 쌍을 확인하기 위해, IKZF1 ZNF2의 Q1 위치에서 돌연변이를 만들고, 잠재적 화합물을 이들 돌연변이체에 대한 활성에 대해 스크리닝하였다. Q1 위치에 대안적 아미노산을 갖는 이카로스 MBP-ZNF2 (aa 141-196)를 함유하는 플라스미드를 구축하고, 화합물 B를 포함한 다양한 화합물을 사용하여 시험관내 유비퀴틴화 스크린을 수행하였다 (도 10a). 처리 후, 세포를 켈릿화하고, 용해시키고, 변성 단백질 겔 상에서 전개시키고, 막으로 옮기고, 항체로 프로빙하고, 필름으로 가시화하였다 (도 10b). 도 10b에 나타난 바와 같이, IKZF1 ZNF2 Q1F가 화합물 B의 존재 하에 심하게 유비퀴틴화되었다.

[0121] 7.5. 실시예 5: Q1F 태그론에 대해 강력한 활성을 갖는 화합물을 확인하기 위한 소분자 스크린

[0122] 잠재적 태그론-표적화 화합물의 세트를 Q1F 태그론에 대해 스크리닝하여, 강력한 태그론/소분자 쌍의 세트를 생성하였다. IKZF1 ZNF2\_ZNF3 Q1F Nluc로 태그부착된 CD19 CAR을 함유하는 렌티바이러스 벡터를 Jurkat 세포 내로 형질도입하였다. CD19 CAR은 실시예 2에서의 CD19 CAR과 유사하였지만, ZNF2\_ZNF3 Q1F 태그론 (서열식별번호: 19)을 포함하였다. 형질도입된 세포를 각각의 소분자의 적정으로 또는 약물 없이 처리한 다음, 37°C에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척하고, 적절한 염색 시약으로 염색하여 CAR 수준을 측정하였다. 세포를 염색 시약 중에서 4°C에서 20분 동안 인큐베이션한 다음, 유동 세포측정기 상에서 관독하기 전에 3회 세척하였다. CAR 수준을 약물로 처리되지 않은 세포에 대해 정규화하였다. 생성된 적정 곡선을 사용하여 EC50 및 Ymin 값을 계산하였다. 이는 Q1F 태그론-태그부착된 CAR을 강력하게 분해한 소분자를 확인하였다 (표 1).

[0123] 표 1: Q1F-특이적 화합물

| 화합물 | 구조                                                                                | EC50 (Q1F<br>테그론) | Ymin (Q1F<br>테그론) |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| B   |  | 0.0048 $\mu$ M    | 1.7%              |
| C   |  | 0.023 $\mu$ M     | 12%               |
| D   |  | 0.0007 $\mu$ M    | 4.2%              |

[0124]

[0125] 7.6. 실시예 6: IKZF1 ZNF2\_3 Q1F-태그부착된 CAR은 화합물 C의 존재 하에 CRBN 및 유비퀴틴-프로테아솜 경로 의존성 방식으로 분해됨

[0126] CRBN 및 유비퀴틴 단백질분해 경로에 대한 Q1F-테그론-태그부착된 CAR 분해의 의존성을 평가하였다. CD19-표적화 CAR을 IKZF1 ZNF2\_3 Q1F (서열식별번호: 19) 또는 Q1F/G6N (서열식별번호: 59)으로 태그부착하였다. 이어서, 이들 태그부착된 CAR을 함유하는 렌티바이러스 벡터를 야생형 (WT) 또는 소뇌 (CRBN) 녹아웃 (KO) Jurkat 세포 내로 형질도입하였다.

[0127] Q1F 태그부착된 CAR이 CRBN-의존성 방식으로 화합물 C로 분해될 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 형질도입된 Jurkat WT 또는 Jurkat CRBN KO 세포를 37°C에서 DMSO 또는 1 mM 화합물 C로 1시간 동안 처리하고 (도 11a), 그 후에 CAR 수준을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 화합물 C의 이러한 농도에서, WT Jurkat 세포에서 태그부착된 CAR은 분해되어 20% 미만으로 잔류한 반면, Jurkat CRBN KO 세포에서 태그부착된 CAR의 수준은 태그부착되지 않은 CAR과 동일하게 잔류하였다 (도 11b). 다음으로, 태그부착된 CAR로 형질도입된 WT Jurkat를 2시간 동안 DMSO, 20 nM 또는 200 nM 화합물 C 단독으로, 또는 2  $\mu$ M의 NEDD8 E1 효소 억제제 MLN4924 또는 2  $\mu$ M의 프로테아솜 차단제 보르테오미과 함께 처리함으로써 유비퀴틴-프로테아솜 경로에 대한 CAR 분해의 의존성을 시험하였다 (도 11c). 어느 한 억제제의 존재 하에 화합물 C로 태그부착된 CAR을 분해하는 것의 실패는 기능적 유비퀴틴 프로테아솜 경로 (UPP)가 Q1F-태그부착된 CAR 분해에 필수적이라는 것을 입증한다.

[0128] 7.7. 실시예 7: IKZF1 ZNF2\_3 Q1F-태그부착된 CAR 분해는 활성을 억제함

[0129] IKZF1 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CD19 CAR T 세포를 분해함으로써 CAR T 신호전달을 제거하는 능력을 Jurkat 리포터 검정에서 평가하였다 (도 2 및 3). ZNF2\_3 Q1F 또는 Q1F/G6N 태그부착된 CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 리포터 세포주 내로 형질도입하였다. 이어서, 형질도입된 세포를 12시간 동안 1 mM 화합물 C 또는 화합물 B로 전처리한 다음, 모 또는 CD19-발현 K562 표적 세포주와 함께 37°C에서 8시간 동안 공동-배양하였다. 양성 세포의 전체 퍼센트 형태의 tdTomato의 수준 (도 12a), 뿐만 아니라 평균 형광 강도 (MFI, 도 12b)를 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. ZNF2\_3 Q1F 테그론을 함유하는 CAR의 분해는 1 mM 화합물 C를 사용하여 약 30% 만큼, 화합물 B를 사용하여 약 75%만큼 신호전달을 감소시켰고; 이러한 상대적인 차이는 각각에 대해 나타난 분해의 깊이와 상관된다. 또한, 활성의 감소는 무손상 G-모티프를 갖는 것에 의존하는데, 이는 G6N 돌연변이가 억제를 방지하기 때문이다.

[0130] 7.8. 실시예 8: IKZF1 ZNF2\_3 Q1F-태그부착된 CAR 분해는 1차 T 세포에서의 활성을 억제함

[0131] IKZF1 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 항-ROR1 CAR을 분해함으로써 1차 CAR T 이펙터 기능을 적정하기 위해 화합물을 사용하는 능력을 평가하였다 (도 13a). CAR은 CD19 CAR과 유사한 막횡단, 공동자극, 및 신호전달 도메인을 포함하였지만, 항-ROR1 scFv를 가졌다. ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 또는 태그부착되지 않은 항-ROR1 CAR을 코딩하는 렌

티바이러스 벡터를 활성화된 1차 T 세포 내로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 IL2, IL7, 및 IL15로 보충된 배지에서 10일 동안 확장시킨 다음, 동결시켰다. 실험 전에, 세포를 해동시키고, 화합물 C의 용량 적정과 함께 또는 약물 없이 배지 중에 휴지시켰다. CAR 수준을 유동 세포측정법에 의해 측정하였고 (도 13b), 이는 ZNF2\_3 Q1F-태그부착된 CAR의 표면 수준이 다양한 화합물 C 농도로 적정될 수 있다는 것을 입증한다. CAR T 활성화에 대한 CAR 분해의 영향을 결정하기 위해, 이어서 세포를 1:4 이펙터:표적 세포 비로 뉴클라이트(Nuclight) 레드 표지된 H-1975 ROR1 발현 표적 세포주와 함께 공동-배양하였다. 공동-배양물을 인큐사이트에 24시간 동안 두어 뉴클라이트 레드 신호를 통해 종양 사멸을 모니터링하고 (도 14a), 상청액을 수집하여 MSD에 의한 염증-유발 시토카인 생산을 측정하였다 (도 14b-14d; IL-2, TNF  $\alpha$ , 및 IFN  $\gamma$ ). 이들 실험은, 사멸 및 시토카인 생산 둘 다에 의해 측정된 바와 같은 1차 CAR T 세포의 이펙터 기능이 ZNF2\_3 Q1F-태그부착된 CAR을 상이한 농도의 화합물 C로의 분해에 대해 표적화함으로써 적정될 수 있다는 것을 입증하였다.

[0132] 7.9. 실시예 9: Q1F 태그론을 통한 CAR 분해는 시험관내 만성 항원 노출 동안 CAR 기능을 보존함

[0133] 분해 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CD19 CAR을 통한 만성 항원 노출 동안 1차 T 세포에 대한 일시적인 휴지를 제공하는 것의 기능적 영향을 시험관내에서 시험하였다. CAR scFv에 대해 지시된 항체로 코팅된 플레이트에 의한 자극을 제공하고, 다양한 휴지 기간을 평가하였다 (도 15). 세포를 3.9 nM의 화합물 D (도 16a)로 처리한 다음, 세척하고, 재펠링 전에 CAR이 완전히 반응하도록 하기 위해 배지에서 휴지시켰다. 휴지된 세포를 유동 세포측정법에 의해 분석하여 나이브-유사 집단에 대한 대응물로서 CD27 및 CD28 수준을 평가하였다 (도 16b 및 16c). 이어서, CAR T 세포를 구상체 (3D) 포맷의 뉴클라이트 레드 표지된 종양 세포주로 펠링시키고, 상청액을 수집하여 메조 스케일 디스커버리 ELISA 검정을 사용하여 염증-유발 시토카인 생산을 측정하였다. 이들 실험은 CAR T 세포에 일시적인 휴지 기간을 제공하는 것이 연속적인 항원 노출을 겪은 CAR T 세포에 비해 보다 적은 활성화를 유도하고 보다 나이브한 유사 집단을 유지함을 보여준다. 이러한 일시적인 휴지 기간은 또한 염증-유발 시토카인, 예컨대 IL-2, TNF  $\alpha$  및 IFN  $\gamma$ 의 생산 (도 17a) 및 기능 (도 17b)의 관점에서 기능적 이익을 제공하고; 이들 시토카인 및 세포독성의 점진적인 상실은 T 세포 소진의 특징이다.

[0134] 7.10. 실시예 10: Q1F 태그론을 통한 CAR 분해는 시험관내 만성 항원 노출 동안 CAR 기능을 보존함

[0135] 생체내에서 ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CAR을 분해하는 능력을 평가하였다. ZNF2\_3 Q1F 태그부착된 CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 활성화된 1차 T 세포 내로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 IL2, IL7 및 IL15로 보충된 배지에서 10일 동안 확장시킨 다음, 동결시켰다.

[0136] 종양의 부재 하에 생체내에서 태그론-태그부착된 CAR을 분해하는 능력을 결정하기 위해, CAR T 세포를 해동시키고, 24시간 동안 휴지시키고, 비-종양 보유 암컷 NSG<sup>TM</sup> 면역결핍 마우스 내로 동물당  $2 \times 10^6$ 개 세포의 용량으로 입양 전달하였다. 24시간 후, 마우스에게 비히클, 0.85 또는 8.5 mg/kg 화합물 D를 경구로 투여하였다 (도 18b). 혈액을 8, 24, 48 및 72시간 후에 채취하고 (도 18a), 항-scFv 및 항-CD3 항체를 사용한 염색에 의해 결정된 바와 같은 CAR<sup>+</sup> T 세포의 비율을 유동에 의해 평가하였다. 두 용량 모두에서, 5% 미만의 CD3<sup>+</sup> CAR<sup>+</sup> 세포가 8시간에서 유지되었고, 심지어 24시간에서도 CAR은 유의한 분해를 유지하였으며 (도 18c), 이는 Q1F 태그론-태그부착된 CAR이 생체내에서 효율적으로 분해될 수 있다는 것을 입증한다. 투여 48시간 후에, CAR 발현은 실질적으로 회복되었다 (도 18c).

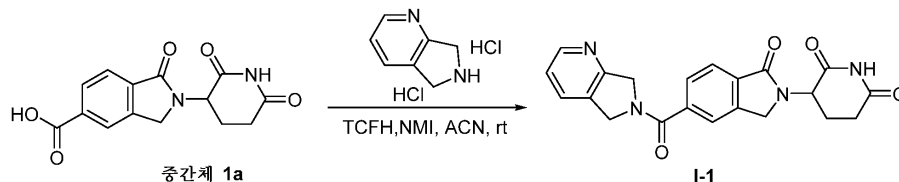
[0137] 이종이식편 암 모델에서 생체내 태그론-태그부착된 CAR의 하향-조절 및 CAR T 기능에 대한 영향을 검사하기 위해, 암컷 NSG<sup>TM</sup> 마우스에게 레닐라 루시페라제를 안정하게 발현하는  $5 \times 10^5$ 개 Raji 종양 세포를 주사하였다. 6일 후, CAR T 세포를 해동시키고, 24시간 동안 휴지시키고, 동물당  $2 \times 10^6$ 개 세포의 용량으로 마우스 내로 입양 전달하였다. 마우스에게 비히클 또는 6.85 mg/kg 화합물 D를 제0일 및 제1일에 BID 경구로 투여하였다 (도 19a). 혈액을 채취하고, 종양 형광을 D1, D3, 및 D10에서 측정하고 (도 19a), 항-scFv 및 항-CD3 항체를 사용한 염색에 의해 결정된 바와 같은 CAR + T 세포의 비율을 유동에 의해 평가하였다. CAR 분해는 태그론-태그부착된 CAR T 세포의 확장 및 세포용해 기능을 감소시켰으며 (도 19b-d), 이는 CAR T 세포를 기능적으로 휴지시키는 CAR 순환의 능력을 보여준다.

[0138] 7.11. 실시예 11: 인-프레임 태그론 태그 녹-인은 내인성 단백질 수준의 화합물-매개 제어를 가능하게 함

[0139] 태그론 태그를 게놈 유전자좌 내로 인-프레임 녹킹하여 내인성 단백질 수준의 화합물-매개 조절을 가능하게 하는 능력을 조사하였다. 아테노-연관 바이러스 벡터를 N- 및 C-말단 배향 둘 다에서 Jurkat 세포 내 AURA (도 20a-10b) 또는 TOX 유전자좌 (도 20c-20d) 인-프레임 녹킹된 IKZF1 ZNF2\_3-V5 태그-T2A-muThy1.1 태그를 전달

하도록 설계하였다. 이어서, Jurkat를 Cas9/가이드 RNA 리보핵단백질로 전기천공하였다. 5일 후, 녹-인 세포를 1  $\mu$ M 화합물 A 또는 DMSO와 함께 16시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 펠릿화하고, 용해시키고, 변성 단백질을 겔 상에서 전개시키고, 막으로 옮기고, 항체로 프로빙하고, 필름으로 가시화하였다. 웨스턴 블롯팅은 오로라 A (도 20a-20b) 및 태그부착된 TOX (도 20d) 수준 둘 다 화합물 A의 존재 하에 감소되었음을 보여주었고, 이는 내인성 단백질을 태그론으로 태그부착하는 것이 단백질 수준의 소분자 제어를 허용한다는 것을 나타낸다.

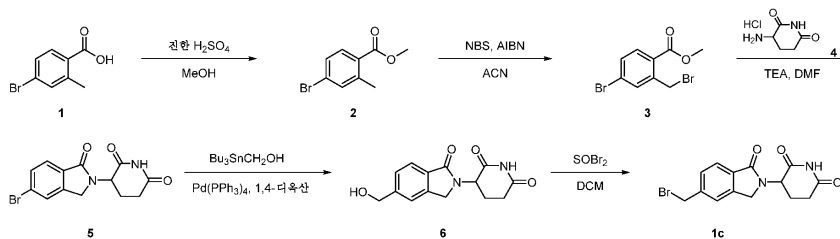
[0140] 7.12. 실시예 12: 3-(5-(6,7-디히드로-5H-피롤로[3,4-b]피리딘-6-카르보닐)-1-옥소이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 (화합물 B)의 합성



[0141]

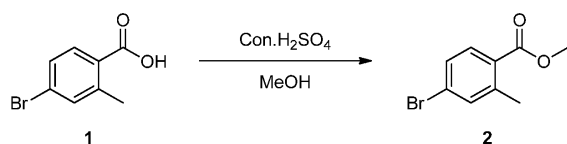
[0142]  $\text{CH}_3\text{CN}$  (ACN) (5 mL) 중 2-(2,6-디옥소-3-피페리딘)-1-옥소-이소인돌린-5-카르복실산 (400 mg, 1.4 mmol)의 용액에 N,N,N',N'-테트라메틸클로로포름아미디늄 헥사플루오로포스페이트 (TCFH) (779 mg, 2.8 mmol), N-메틸이미다졸 (NMI) (1.2 g, 14 mmol) 및 6,7-디히드로-5H-피롤로[3,4-b]피리딘; 디히드로클로라이드 (349 mg, 1.8 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응물을 LCMS에 의해 모니터링하였다. 침전된 고체를 여과에 의해 수집하였다. 조 생성물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 3-[5-(5,7-디히드로피롤로[3,4-b]피리딘-6-카르보닐)-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (438.7 mg, 79% 수율)을 회색 고체로서 수득하였다. 분석용 LC/MS (방법 5):  $\text{MS}[\text{M}+\text{H}^+]$  391.1.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.03 (s, 1H), 8.54 - 8.43 (m, 1H), 7.94 - 7.65 (m, 4H), 7.41 - 7.23 (m, 1H), 5.23 - 5.11 (m, 1H), 5.00 - 4.75 (m, 4H), 4.62 - 4.36 (m, 2H), 3.04 - 2.84 (m, 1H), 2.69 - 2.56 (m, 1H), 2.50 - 2.36 (m, 1H), 2.12 - 2.00 (m, 1H).

[0143] 7.13. 실시예 13: 3-[5-(브로모메틸)-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (중간체 1c)의 합성



[0144]

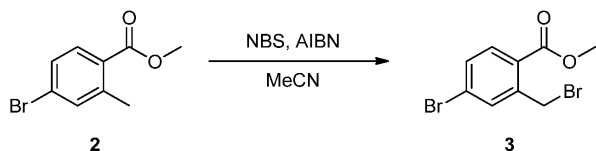
[0145] 화합물 2의 합성



[0146]

[0147] 메탄올 (1.0 L) 중 4-브로모-2-메틸-벤조산 (120 g, 558 mmol)의 용액에 진한 황산 (109 g, 1.12 mol, 60 mL)을 20 ~ 40°C에서 첨가한 다음, 혼합물을 65°C로 18시간 동안 가열하였다. TLC (석유 에테르/에틸 아세테이트 = 3:1,  $R_f$  (반응물) = 0.1,  $R_f$  (생성물) = 0.4)는 반응이 완결되었다는 것을 나타냈다. 반응 혼합물을 농축시키고; 잔류물을 수성 상과 유기 층 사이에 분리하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트 (1 L x 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 포화 수성 중탄산나트륨 (500 mL), 염수 (500 mL)로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 혼합물을 여과하고, 여과물을 농축시켜 메틸 4-브로모-2-메틸-벤조에이트 (122 g, 95% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.76 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.35 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 1.6 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.56 (s, 3H)

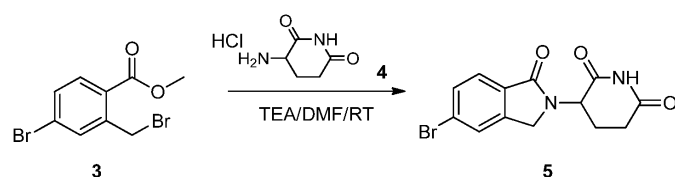
[0148] 합성 화합물 3



[0149]

[0150] 아세트니트릴 (1.20 L) 중 메틸 4-브로모-2-메틸-벤조에이트 (122 g, 533 mmol)의 용액에 2,2'-아조비스(2-메틸프로피오니트릴) (6.12 g, 37.3 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 82℃로 가열하고, N-브로모숙신이미드 (142 g, 799 mmol)를 조금씩 첨가하고, 3시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었다는 것을 나타냈다. 반응물을 진공 (50℃) 하에 농축시켰다. 잔류물을 석유 에테르/디클로로메탄 (20:1, 100 mL) 중에 현탁시키고, 여과하고, 여과물을 농축시켜 조 생성물 150 g을 수득하였으며, 이를 직접 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

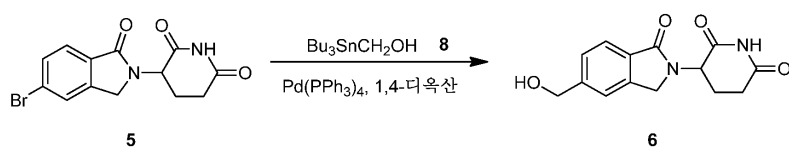
[0151] 화합물 5의 합성



[0152]

[0153] N,N-디메틸포름아미드 (80 mL) 중 메틸 메틸 4-브로모-2-(브로모메틸)벤조에이트 (115 g, 375 mmol) 및 3-아미노피페리딘-2,6-디온 (61.7 g, 375 mmol, HCl 염)의 용액에 N,N-디이소프로필에틸아민 (145 g, 1.13 mol)을 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 16시간 동안 교반하였다. HPLC는 대부분의 출발 물질이 소모되었다는 것을 나타냈다. 반응 혼합물에 아세트산 (150 mL)을 첨가하고, 50℃에서 1시간 동안 교반하였다. HPLC는 중간체가 완전히 소모되었다는 것을 나타냈다. 반응물을 20℃로 냉각시키고, 여과하고, 필터 케이크를 물 (200 mL) 및 에테르 아세테이트 (200 mL)로 세척하여 3-(5-브로모-1-옥소-이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 (91 g, 75.1% 수율)을 회청색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.01 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.73-7.66 (m, 2H), 5.14-5.09 (m, 1H), 4.47 (d, J = 16 Hz, 1H), 4.34 (d, J = 16 Hz, 1H), 2.92-2.89 (m, 1H), 2.73-2.58 (m, 1H), 2.41-2.37 (m, 1H), 2.03-1.99 (m, 1H).

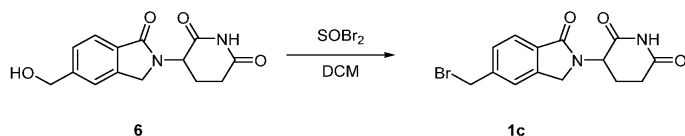
[0154] 화합물 6의 합성



[0155]

[0156] 건조 디옥산 (20 mL) 중 3-(5-브로모-1-옥소-이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 (80 g, 248 mmol)의 용액에 트리부틸스테인메탄올 (87 g, 272 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 교반하고, 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0) (28.6 g, 24.8 mmol)을 질소 하에 반응물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 100℃에서 16시간 동안 교반하였다. LCMS는 반응이 완결되었다는 것을 나타냈다. 반응물을 농축시키고, 디클로로메탄/메탄올 (10:1, 250 mL x 2)로 세척하여 3-[5-(히드록시메틸)-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (62 g, 91.3% 수율)을 갈색 고체로서 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.96 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.42 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.10-5.06 (m, 1H), 4.59 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.35 (dd, J = 17.2 Hz, 54 Hz, 2H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.59-2.55 (m, 1H), 2.38-2.35 (m, 1H), 2.02-1.99 (m, 1H)

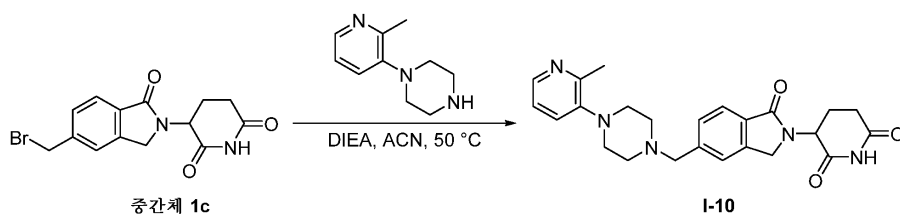
[0157] 화합물 1c의 합성



[0158]

[0159] 디클로로메탄 (1.5 L) 중 3-[5-(히드록시메틸)-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (62 g, 226 mmol)의 현탁액에 술폰닐 브로마이드 (70.5 g, 339 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 18℃에서 16시간 동안 교반하였다. HPLC는 반응이 완결되었다는 것을 나타냈다. 반응 혼합물을 여과하고, 고체를 메탄올 (150 mL x 2)로 세척하여 3-[5-(브로모메틸)-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (45.0 g, 59.0% 수율)을 회갈색 고체로서 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.97 (s, 1H), 7.70-7.66 (m, 2H), 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.10-5.06 (m, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.36 (dd, J = 54 Hz, 17.2 Hz, 2H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.59-2.49 (m, 1H), 2.47-2.35 (m, 1H), 2.00-1.98 (m, 1H)

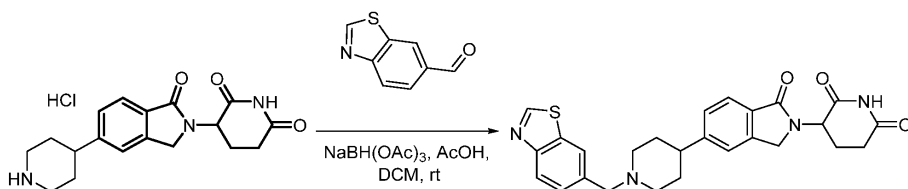
[0160] 7.14. 실시예 14: 3-(5-((4-(2-메틸피리딘-3-일)피페라진-1-일)메틸)-1-옥소이소인돌린-2-일)피페리딘-2,6-디온 (화합물 C)의 합성



[0161]

[0162] MeCN (ACN) (5 mL) 중 3-[5-(브로모메틸)-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (400 mg, 1.2 mmol)의 교반 용액에 1-(2-메틸-3-피리딜)피페라진 (315 mg, 1.8 mmol) 및 DIEA (460 mg, 3.6 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 LCMS에 의해 모니터링하였다. 혼합물을 농축시키고, 잔류물을 정제용 HPLC에 의해 정제하여 3-[5-[[4-(2-메틸-3-피리딜)피페라진-1-일]메틸]-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (187.9 mg, 34% 수율)을 회색 고체로서 수득하였다. 분석용 LC/MS (방법 1): MS[M+H]<sup>+</sup> 434.2.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 메탄올- $d_4$ ):  $\delta$  8.40 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.83 - 7.76 (m, 2H), 7.72 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.23 - 5.12 (m, 1H), 4.90 - 4.80 (m, 4H), 4.65 - 4.50 (m, 4H), 3.54 (s, 4H), 2.98 - 2.85 (m, 1H), 2.84 - 2.75 (m, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60 - 2.44 (m, 1H), 2.24 - 2.14 (m, 1H)

[0163] 7.15. 실시예 15: 3-[5-[1-(1,3-벤조티아졸-6-일메틸)-4-피페리딜]-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (화합물 D)의 합성



[0164]

[0165] DCM (20 mL) 중 3-[1-옥소-5-(4-피페리딜)이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온; 히드로클로라이드 (1.5 g, 4.12 mmol)의 교반 용액에 1,3-벤조티아졸-6-카르보알데히드 (1.35 g, 8.25 mmol) 및 NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2.62 g, 12.37 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 농축시키고, 정제용 HPLC에 의해 정제하여 3-[5-[1-(1,3-벤조티아졸-6-일메틸)-4-피페리딜]-1-옥소-이소인돌린-2-일]피페리딘-2,6-디온 (968.9 mg, 2.0233 mmol, 49.076% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다. LCMS: 475.1 [M+1]<sup>+</sup>.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, 메탄올- $d_4$ ):  $\delta$  9.40 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.22 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.81-7.71 (m, 2H), 7.55-7.36 (m, 2H), 5.24-5.09 (m, 1H), 4.62-4.39 (m, 4H), 3.76-3.62 (m, 2H), 3.33-3.19 (m, 2H), 3.13-2.99 (m, 1H), 2.95-2.73

(m, 2H), 2.60-2.38 (m, 1H), 2.24-1.95 (m, 5H).

[0166] 7.16. 실시예 16: 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C, 및 화합물 D의 선택성.

[0167] ePL-태그부착된 아이올로스, 이카로스 또는 GSPT1을 안정하게 발현하는 DF15 다발성 골수종 세포, 및 ePL-태그 부착된 CK1a를 안정하게 발현하는 MDS-L 세포를 pLOC-ePL-아이올로스 (또는 이카로스, GSPT1, 또는 CK1a)로의 렌티바이러스 감염을 통해 생성하였다. 이카로스, 아이올로스, 및 ePL 태그에 융합된 GSPT1을 발현하는 DF15 다발성 골수종 세포 (디스커버엑스(DiscoverX)) 및 ePL 태그에 융합된 CK1a를 발현하는 MDS-L 세포를 화합물 (화합물 A, 화합물 B, 화합물 C, 및 화합물 D)로 사전포팅된 384-웰 플레이트 (코닝 번호 3570)에 분배하였다. 화합물을 음향 분배기 (EDC 바이오시스템즈(EDC Biosystems)로부터의 ATS 음향 전달 시스템)에 의해 10  $\mu$ M에서 출발하여 0.0005  $\mu$ M로 내려가는 3배 희석을 사용하는 10-포인트 용량 반응 곡선으로 384-웰 플레이트 내로 분배하였다. 이어서, 5000개의 DF15 또는 MSD-L 세포를 함유하는 배지 (RPMI-1640 + 10% 열 불활성화 FBS + 25 mM Hepes + 1 mM Na 피루베이트 + 1x NEAA + 1xPen Strep 글루타민) 25  $\mu$ L를 웰당 분배하였다. 검정 플레이트를 GSPT1의 경우 20시간을 제외하고는 4시간 동안 5% CO<sub>2</sub>로 37°C에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 25  $\mu$ L의 인셀 헌터(InCELL Hunter) 검출 시약 작업 용액 (디스커버엑스, 카탈로그 번호 96-0002, 캘리포니아주 프리몬트)을 각각의 웰에 첨가하고, 빛으로부터 보호하면서 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 60분 후, 발광을 엔비전 또는 페라스타(PHERAstar) 발광 판독기 상에서 판독하였다.

[0168] 헬리오스에 대해, 안정한 Jurkat 세포주를 CRISPR/Cas9를 사용하여 조작하여 인-프레임 HiBit 태그를 IKZF2 유전자의 카르복시-말단 리딩 프레임 내로 삽입하였다. 시험 화합물을 음향 분배기를 사용하여 1536 웰 플레이트로 옮기고, DMEM/10% FCS 중 Jurkat/Helios/HiBit 세포를 10,000개 세포/웰로 5  $\mu$ L의 최종 부피로 플레이트하였다. 세포를 37°C, 95% RH에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 루시페라제 활성을 2  $\mu$ L/웰의 나노-글로(Nano-Glo) 시약 (프로메가)을 첨가하고, RT에서 30분 동안 인큐베이션하고, 마이크로타이터 플레이트 판독기 상에서 발광을 판독함으로써 측정하였다.

[0169] 주어진 기질의 분해에 대한 화합물의 EC<sub>50</sub> 값 (관찰된 최대 분해의 절반을 달성하는 화합물의 농도)을 결정하기 위해, 4-파라미터 로지스틱 모델 (S자형 용량-반응 모델) (FIT = (A + {(B - A)/1 + [(C/x)D]}))을 사용하였고, 여기서 C는 변곡점 (EC<sub>50</sub>)이고, D는 상관 계수이고, A 및 B는 각각 적합도의 하한 및 상한이다. 모든 기질 분해 곡선을 처리하고, 데이터 분석 소프트웨어 패키지인 액티비티베이스(ActivityBase) (IDBS)를 사용하여 평가하였다. Y<sub>min</sub>은 남아있는 최소 퍼센트 단백질이다.

[0170] 결과를 표 2-5에 나타낸다.

[0171] 표 2: 화합물 A

| 태그론   | Ymin (%) | EC50 ( $\mu$ M) |
|-------|----------|-----------------|
| Q1F   | NA       | NA              |
| 헬리오스  | 1.5      | 0.0018          |
| 아이올로스 | 2.7      | 0.0064          |
| 이카로스  | 3.2      | 0.022           |
| GSPT1 | 91       | 0.039           |
| CK1a  | 50       | 0.19            |

[0172]

[0173] 표 3: 화합물 B

| 태그론          | Ymin (%) | EC50 ( $\mu$ M) |
|--------------|----------|-----------------|
| Q1F (표 1로부터) | 1.7      | 0.0048          |
| 헬리오스         | 65       | >10             |
| 아이올로스        | 93       | >10             |
| 이카로스         | 91       | >10             |
| GSPT1        | 72       | 0.054           |
| CK1a         | 82       | >10             |

[0174]

[0175] 표 4: 화합물 C

| 테그론          | Ymin (%) | EC50 (μM) |
|--------------|----------|-----------|
| Q1F (표 1로부터) | 12       | 0.023     |
| 헬리오스         | 86       | >10       |
| 아이올로스        | 83       | >10       |
| 이카로스         | 92       | >10       |
| GSPT1        | 89       | >10       |
| CK1a         | 98       | >10       |

[0176]

[0177] 표 5: 화합물 D

| 테그론          | Ymin (%) | EC50 (μM) |
|--------------|----------|-----------|
| Q1F (표 1로부터) | 4.2      | 0.0007    |
| 헬리오스         | 24       | 0.46      |
| 아이올로스        | 87       | >10       |
| 이카로스         | 93       | >10       |
| GSPT1        | 96       | >10       |
| CK1a         | 81       | >10       |

[0178]

[0179] 표 2에 제시된 바와 같이, 화합물 A는 0.022 μM 이하의 EC50으로 헬리오스, 아이올로스, 및 이카로스를 분해하였다. 화합물 A는 또한 CK1a를 유의한 정도로 분해하였다. 대조적으로, 화합물 B는 실시예 5에 기재된 Jurkat 검정에서 5 nM 미만의 EC50으로 Q1F 테그론을 분해하였다. 화합물 B가 헬리오스에 대해 일부 분해 활성을 나타낸 반면, EC50은 > 10 μM이었으며, 이는 Q1F 테그론에 대한 EC50보다 3 자릿수 초과로 더 높았다 (표 3). 화합물 B는 또한 GSPT1에 대해 일부 분해 활성을 나타냈다 (표 3). 화합물 C는 실시예 5에 기재된 Jurkat 검정에서 Q1F 테그론에 대해 고도로 선택적이었으며, 25 nM 미만의 EC50을 가졌다 (표 4). 화합물 D는 또한 실시예 5에 기재된 Jurkat 검정에서 1 nM 미만의 EC50으로 Q1F 테그론에 대해 선택적이었지만 (표 5), 이는 또한 0.46 μM의 EC50으로 헬리오스의 일부 분해를 나타냈다 (표 5).

[0180] 평가물

[0181] 본 개시내용은 본원에 기재된 구체적 실시양태에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 기재된 것 이외에, 본원에 제공된 대상의 다양한 변형이 상기 기재로부터 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0182] 다양한 간행물, 특허 및 특허 출원이 본원에 인용되며, 그의 개시내용은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0183] 특정 서열의 표

| 서열 식별 번호 | 설명                              | 서열                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1        | X1F G-모티프 컨센서스 1                | FCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> CGX <sub>3</sub> X <sub>4</sub>                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 2        | X1F G-모티프 컨센서스 2                | FCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> CGX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>                                                                                                                                                                                                                                        |
| 3        | IKZF1 ZNF2 Q1F G-모티프            | FCNQCGAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 4        | IKZF1 ZNF2 Q1F                  | GERPFFCNQCGASFTQKGNLLRHIKLHS                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 5        | IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F 컨센서스        | GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHSGE<br>KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                |
| 66       | IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F 컨센서스        | GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHSGE<br>KPFKCPFCSY ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                |
| 67       | IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F 컨센서스        | GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHTGE<br>KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                |
| 68       | IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F 컨센서스        | GERPFFCX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> C GX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TQKGNL LRHIKLHSGE<br>KPFKCPFCNY ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                |
| 6        | IKZF1 ZNF2_ZNF3                 | GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 63       | IKZF2 ZNF2_ZNF3                 | GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 64       | IKZF3 ZNF2_ZNF3                 | GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 65       | IKZF4 ZNF2_ZNF3                 | GERPFHCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7        | IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F             | GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 69       | IKZF2 ZNF2_ZNF3 Q1F             | GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCSY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 70       | IKZF3 ZNF2_ZNF3 Q1F             | GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHTGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 71       | IKZF4 ZNF2_ZNF3 Q1F             | GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCPFCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 8        | IKZF1 ZNF1_ZNF2 뉴클레오타이드 서열      | ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatattc<br>gtgggatacat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatgggtca<br>caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT<br>CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC<br>GGCACATCAA GCTGCATTCC                                                                                                    |
| 9        | IKZF1 ZNF1_ZNF2                 | GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN<br>QCGASFTQKG NLLRHIKLHS                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 10       | IKZF1 ZNF1_ZNF2_ZNF3 뉴클레오타이드 서열 | ggcattcgac ttcctaacgg aaaactaaag tgtgatattc<br>gtgggatacat ttgcatcggg cccaatgtgc tcatgggtca<br>caaaagaagc cacactGGAG AACGGCCCTT CCAGTGCAAT<br>CAGTGCGGGG CCTCATTCAC CCAGAAGGGC AACCTGCTCC<br>GGCACATCAA GCTGCATTCC ggggagaagc ccttcaaatg<br>ccacctctgc aactacgcct gccgccggag ggacgccctc<br>actggccacc tgaggacgca ctcc |
| 11       | IKZF1 ZNF1_ZNF2_ZNF3            | GIRLPNGKLK CDICGIICIG PNVLMVHKRS HTGERPFQCN<br>QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GEKPFKCHLC NYACRRRDAL<br>TGHLRTHS                                                                                                                                                                                                                |
| 12       | IKZF1 ZNF2_ZNF3 뉴클레오타이드 서열      | GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT<br>TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA<br>TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac<br>gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga<br>cgactcc                                                                                                                   |

[0184]

|    |                                  |                                                                                                                                                                                                     |
|----|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 13 | IKZF1 ZNF2_ZNF3                  | GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                    |
| 14 | IKZF1 ZNF2 뉴클레오티드<br>서열          | GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC GGGGCCTCAT<br>TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA<br>TTCC                                                                                                  |
| 15 | IKZF1 ZNF2                       | GERPFQCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHS                                                                                                                                                                      |
| 60 | IKZF2 ZNF2                       | GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHS                                                                                                                                                                         |
| 61 | IKZF3 ZNF2                       | GERPFQCNQCASFTQKGNLLRHIKLHT                                                                                                                                                                         |
| 62 | IKZF4 ZNF2                       | GERPFHCNQCASFTQKGNLLRHIKLHS                                                                                                                                                                         |
| 16 | IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N<br>뉴클레오티드 서열 | GGAGAACGGC CCTTCCAGTG CAATCAGTGC aacGCCTCAT<br>TCACCCAGAA GGGCAACCTG CTCCGGCACA TCAAGCTGCA<br>TTCCggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac<br>gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga<br>cgactcc |
| 17 | IKZF1 ZNF2_ZNF3 G6N              | GERPFQCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                    |
| 18 | IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F<br>뉴클레오티드 서열 | ggagaacggc ccttcttctg caatcagtgc ggggcctcat<br>tcacccagaa gggcaacctg ctccggcaca tcaagctgca<br>ttccggggag aagcccttca aatgccacct ctgcaactac<br>gcctgccgcc ggagggacgc cctcactggc cacctgagga<br>cgactcc |
| 19 | IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F              | GERPFFCNQC GASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                    |
| 59 | IKZF1 ZNF2_ZNF3 Q1F/G6N          | GERPFFCNQC NASFTQKGNL LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY<br>ACRRRDALTG HLRTHS                                                                                                                                    |
| 20 | IKZF1 ZNF1 (아미노산<br>117-139)     | LKCDICGIIICIGPNVLMVHKRSH                                                                                                                                                                            |
| 21 | IKZF1 ZNF2 (아미노산<br>145-167)     | FQCNQCASFTQKGNLLRHIKLH                                                                                                                                                                              |
| 22 | IKZF1 ZNF3 (아미노산<br>173-195)     | FKCHLCNYACRRRDALTGHLRTH                                                                                                                                                                             |
| 23 | IKZF1 ZNF4 (아미노산<br>201-224)     | HKCGYGRSYKQRSSLEEKKERCH                                                                                                                                                                             |
| 24 | IKZF1 ZNF5 (아미노산<br>462-484)     | YKCEHCRVFLDHVMTIHMGC                                                                                                                                                                                |
| 25 | IKZF1 ZNF6 (아미노산<br>490-514)     | FECNMGYHSQDRYEFSSHITRGEH                                                                                                                                                                            |
| 26 | IKZF2 ZNF1 (아미노산<br>112-134)     | LKCDVCGMVICGPNVLMVHKRSH                                                                                                                                                                             |
| 27 | IKZF2 ZNF2 (아미노산<br>140-162)     | FHCNQCASFTQKGNLLRHIKLH                                                                                                                                                                              |
| 28 | IKZF2 ZNF3 (아미노산<br>168-190)     | FKCPFCSYACRRRDALTGHLRTH                                                                                                                                                                             |
| 29 | IKZF2 ZNF4 (아미노산<br>196-219)     | HKCNYCGRSYKQRSSLEEKKERCH                                                                                                                                                                            |
| 30 | IKZF2 ZNF5 (아미노산<br>471-493)     | FKCEHCRVFLDHVMTIHMGC                                                                                                                                                                                |
| 58 | IKZF2 ZNF6 (아미노산<br>499-523)     | LECNICGYRSQDRYEFSSHIVRGEH                                                                                                                                                                           |
| 31 | IKZF3 ZNF1 (아미노산<br>118-140)     | MNCDVCGLSGISFNLMVHKRSH                                                                                                                                                                              |
| 32 | IKZF3 ZNF2 (아미노산<br>146-168)     | FQCNQCASFTQKGNLLRHIKLH                                                                                                                                                                              |

[0185]

|    |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 33 | IKZF3 ZNF3 (아미노산 174-196) | FKCHLCNYACQRRDALTGHLRTH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 34 | IKZF3 ZNF4 (아미노산 202-224) | YKCEFCGRSYKQRSSLEEKKERC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 35 | IKZF3 ZNF5 (아미노산 452-474) | YRCDHCRVFLDYVMFTIHMGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 36 | IKZF3 ZNF6 (아미노산 480-504) | FECNMCGRSHDRYEFSSHIARGEH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 37 | IKZF4 ZNF1 (아미노산 159-181) | LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 38 | IKZF4 ZNF2 (아미노산 187-209) | FHCNQCGASFTQKGNLLRHIKLH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 39 | IKZF4 ZNF3 (아미노산 215-237) | FKCPFCNYACRRRDALTGHLRTH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 40 | IKZF4 ZNF4 (아미노산 248-271) | YKCNFCGRSYKQSTLEEKKERCH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 41 | IKZF4 ZNF5 (아미노산 530-552) | FKCEHCRILFLDHVMFTIHMGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 42 | IKZF4 ZNF6 (아미노산 558-582) | FECNICGYHSQDRYEFSSHIVRGEH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 43 | IKZF5 ZNF1 (아미노산 82-104)  | LKCRYCNYASKGTARLIEHIRIH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 44 | IKZF5 ZNF2 (아미노산 110-132) | HRCHLCPFASAYERHLEAHMRSH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 45 | IKZF5 ZNF3 (아미노산 138-161) | YKCELCSFRCSDRSNLSHRRRKH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 46 | IKZF5 ZNF4 (아미노산 364-386) | HHCQHCDMYFADNLIYTIHMGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 47 | IKZF5 ZNF5 (아미노산 392-416) | FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 48 | 인간 이카로스 아미노산 서열           | MDADEGQDMS QVSGKESFPV SDTPDEGDEP MPIPEDLSTT<br>SGGQQSSKSD RVVASNVKVE TQSDENGRA CEMNGEECAE<br>DLRMLDASGE KMNGSHRDQG SSALSGVGGI RLPNGKLKCD<br>ICGIIICIGPN VLMVHKRSHT GERPFQCNQC GASFTQKGNL<br>LRHIKLHSGE KPFKCHLCNY ACRRRDALTG HLRTHSVGKP<br>HKCGYCGRSY KQRSSLEEKK ERCHNYLESM GLPGTLYPVI<br>KEETNHSEMA EDLCKIGSER SLVLDRLASN VAKRKSSMPQ<br>KFLGDKGLSD TPYDSSASYE KENEMMKSHV MDQAINNAIN<br>YLGAECLRPL VQTPPGGSEV VPVISPMYQL HKPLAEGTFR<br>SNHSAQDSAV ENLLLLSKAK LVPSEEREASP SNQCQDSTDT<br>ESNNEEQRSQ LIYLTNHIAP HARNGLSLKE EHRAYDLLRA<br>ASENSQDALR VVSTSGEQMK VYKCEHCRVL FLDHVMYTIH<br>MGCHGFRDPF ECNMCYHSQ DRYEFSSHIT RGEHRFHMS |
| 49 | 인간 아이올로스 아미노산 서열          | MEDIQTNAEL KSTQEQSVPA ESAAVLNDYS LTKSHEMENV<br>DSGEGPANED EDIGDDSMKV KDEYSERDEN VLKSEPMGNA<br>EEPEIPYSYS REYNEYENIK LERHVVSFDS SRPTSGKMNC<br>DVCGLSCISF NVLMVHKRSH TGERPFQCNQ CGASFTQKGN<br>LLRHIKLHTG EKPFKCHLCN YACQRRDALT GHLRTHSVEK<br>PYKCEFCGRS YKQRSSLEEKK KERCRTFLQS TDPGDTASAE<br>ARHIKAEMGS ERALVLDRLA SNVAKRKSSM PQKFIGEKRH<br>CFDVNYNSSY MYEKESELIQ TRMMDQAINN AISYLGAEAL<br>RPLVQTTPAP TSEMVPVISS MYPIALTRAE MSGAPQELE<br>KKSIIHLPEKS VPSERGSLPN NSGHDSTDT SNHEERQNH                                                                                                                                              |

[0186]

|    |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                           | YQQNHMVLRS ARNGMPLLEK VPRSYELLKP PPICPRDSVK<br>VINKEGEVMD VYRCDHCRVL FLDYVMFTIH MGCHGFRDPF<br>ECNMCGRSH DRYEFSSHIA RGEHRALLK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 50 | 인간 헬리오스 아미노산 서열           | METEADGYI TCDNELSPER EHSNMAIDLT SSTPNGHAS<br>PSHMTSTNSV KLEMQSDEEC DRKPLSREDE IRGHDEGSSL<br>EEPLIESSEV ADNRKVQELQ GEGGIRLPNG KLKCDVCGMV<br>CIGPNVLMVH KRSHTERPF HCNQCGASFT QKGNLLRHIK<br>LHSGEKPFC PFCSYACRRR DALTGHLRTH SVGKPHKCNV<br>CGRSYKQRSS LEEHKECHN YLQNVSMEEA GQVMSHHVPP<br>MEDCKEQEPI MDNNISLVFF ERPAVIEKLT GNMGRKKSST<br>PQKFVGEKLM RFSYPDIHFD MNLTYEKAE LMQSHMDQA<br>INNAITYLGA EALHPLMQHP PSTIAEVAFV ISSAYSQVYH<br>PNRIERPISR ETADSHENNM DGPISLIRPK SRPQEREASP<br>SNSCLDSTD SSSHDDHQS QGHPALNPKR KQSPAYMKED<br>VKALDTTKAP KGSCLKIYKV FNGEQEQIRA FKCEHCRVLF<br>LDHVMYTIHM GCHGYRDPLE CNICGYRSQD RYEFSSHIVR<br>GEHTFH                                                                            |
| 51 | 인간 에오스 아미노산 서열            | MHTPPALPRR FQGGGRVTRP GSHRQGDNL ERDPGGGCV<br>DFLPQAQDSN HFIMESLFCE SSGDSSLEKE FLGAPVGPVS<br>STPNSQHSSP SRSLSANSIK VEMYSDEESS RLLGPDERLL<br>EKDDSVIVED SLSEPLGYCD GSGPEPHSPG GIRLPNGKLL<br>CDVCGMVCIG PNVLMVHKRS HTGERPPHCN QCGASFTQKG<br>NLLRHIKLHS GEKPFKCPFC NYACRRRDAL TGHRLTHSVS<br>SPTVGKPYKC NYCGRSYKQ STLEEHKERC HNYLQSLSTE<br>AQUALAGQPGD EIRDLEMVPD SMLHSSSERP TFIDRLANSL<br>TKRRKRSTPQK FVGEKQMRFS LSDLPYDVNS GGYEKDVELV<br>AHHSLEPGFG SSLAFVGAEL LRPLRLPPTN CISELTPVIS<br>SVYTMQPLP GRLELPGSRE AGEGPEDLAD GGPLLYRPRG<br>PLTDPGASPS NGCQDSTDTE SNHEDRVAGV VSLPQGPFPQ<br>PPPTIVVGRH SPAYAKEDPK PQEGLLRGTP GPSKEVLRVV<br>GESGEPVKAF KCEHCRILFL DHVMFTIHMG CHGFRDPFEC<br>NICGYHSQDR YEFSSHIVRG EHKVG |
| 52 | 인간 페가수스 아미노산 서열           | MGEKKPEPLD FVKDFEYLT QQTHHVNMI SSVSGDKEAE<br>ALQAGAGTDGD QNGLDHPSVE VSLDENGML VDGERTFDG<br>KLKCRYCNYA SKGTARLIEH IRIHTGEKPH RCHLCPFASA<br>YERHLEAHMR SHTGEKPYKC ELCSFRCSDR SNLSHRRRK<br>HKMVPIKGR SSLSSKKMWG VLQKKTNSLG YSRRALINLS<br>PESMVVQKPD YLNDFTHEIP NIQTDSYESM AKTTPTGGLP<br>RDPQELMVDN PLNQLSTLAG QLSSLPPENQ NPASPDVVPC<br>PDEKPFMIQQ PSTQAVVSAV SASIPQSSSP TSPEPRPSHS<br>QRNYSVAVGP SSEPSAHTST PSIGNSQPST PAPALPVQDP<br>QLLHHCQHCD MYFADNILYT IHMGCHGYEN PFQCNICGCK<br>CKNKYDFACH FARGQHNQH                                                                                                                                                                                                       |
| 53 | CAR CD19 CD28TM 41BB CD3z | DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ<br>KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL<br>EQEDIATYFC QQGNLTPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS<br>GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG<br>VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSRLTIKDN<br>SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHHYGG SYAMDYWGQG<br>TSVTVSSESK YGPPCPCPM FWVLVVGGV LACYSLLVTV<br>AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP<br>EEEEGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE<br>YDVLDRRRR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY<br>SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP<br>RGGEGRGS LTCGDVEENP G                                                                                                                                                           |
| 54 | CD28TM 41BB CD3z ZNF2     | DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ<br>KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL<br>EQEDIATYFC QQGNLTPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

[0187]

|    |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                              | GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG<br>VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSRLTIKDN<br>SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG<br>TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV<br>AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP<br>EEEEGGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE<br>YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY<br>SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP<br>RTGERPFQCN QCGASFTQKG NLLRHIKLHS GGGEGRGSLL<br>TCGDVEENPG                                                                                                                                                                                                              |
| 55 | CD28TM 41BB CD3z<br>ZNF1_2   | DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ<br>KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL<br>EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS<br>GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG<br>VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSRLTIKDN<br>SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG<br>TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV<br>AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP<br>EEEEGGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE<br>YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY<br>SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP<br>RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC<br>NQCASFTQK GNLLRHIKLH SGGEGRGSLL LTCGDVEENP<br>G                               |
| 56 | CD28TM 41BB CD3z<br>ZNF2_3   | DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ<br>KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL<br>EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS<br>GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG<br>VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSRLTIKDN<br>SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG<br>TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV<br>AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP<br>EEEEGGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE<br>YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY<br>SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP<br>RGERPFQCNQ CGASFTQKGN LLRHIKLHSG EKPFKCHLCN<br>YACRRRDALT GHLRTHSGGG EGRGSLLTCG DVEENPG                                      |
| 57 | CD28TM 41BB CD3z<br>ZNF1_2_3 | DIQMTQTT SLSASLGDR VTISCRASQD ISKYLNWYQQ<br>KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL<br>EQEDIATYFC QQGNTLPYTF GGGTKLEITG STSGSGKPGS<br>GEGSTKGEVK LQESGPGLVA PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG<br>VSWIRQPPRK GLEWLGVIWG SETTYNSAL KSRLTIKDN<br>SKSQVFLKMN SLQTDDTAIY YCAKHYYYGG SYAMDYWGQG<br>TSVTVSSESK YGPPCPPCPM FWVLVVVGGV LACYSLLVTV<br>AFIIFWVKRG RKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQ EEDGCSCRFP<br>EEEEGGGCELR VKFSRSADAP AYQQGQNQLY NELNLGRREE<br>YDVLDKRRGR DPEMGGKPRR KNPQEGLYNE LQKDKMAEAY<br>SEIGMKGERR RGKGHDGLYQ GLSTATKDTY DALHMQALPP<br>RGIRLPNGKL KCDICGIICI GPNVLMVHKR SHTGERPFQC<br>NQCASFTQK GNLLRHIKLH SGEKPFKCHL CNYACRRRDA<br>LTGHLRTHSG GGEGRGSLLT CGDVEENPG |
| 72 | Q9UKT9 IKZF3 146 168 23      | FQCNQCASFTQKGNLLRHIKLH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 73 | Q66K89 E4F1 220 242 23       | HECKLCGASFRTKGSILRHRRH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 74 | Q6ZMY9_ZN517_205_227_2<br>3  | FQCTECGKAFKQSSILLRHQLIH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 75 | Q6DD87_ZN787_178_200_23      | FVCPRCGRGFSQPKSLARHLRLH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

[0188]

|     |                             |                          |
|-----|-----------------------------|--------------------------|
| 76  | Q6ZMY9_ZN517_396_418_2<br>3 | FECAECGKAFGRKSNLTLHQKIH  |
| 77  | Q96JP5_ZFP91_400_422_23     | LQCEICGFTCRQKASLNWHMCKH  |
| 78  | Q6DD87_ZN787_150_172_23     | YTCPCDGRSFTQSKSLAKHRRSH  |
| 79  | Q96CK0_ZN653_528_550_23     | FTCETCGKSFKRKNHLEVHRRTH  |
| 80  | Q17R98_ZN827_817_839_23     | FPCDVCCKVFGRQQTLSRHLSLH  |
| 81  | Q6DD87_ZN787_317_339_23     | HICVECGEGFVQGAALRRHKKIH  |
| 82  | Q6DD87_ZN787_66_88_23       | YICNECGKSFHWSKLTTRHQRTH  |
| 83  | Q6ZMY9_ZN517_233_255_2<br>3 | FQCGECGKAFRQSTQLAAHHRVH  |
| 84  | Q96CK0_ZN653_556_578_23     | LQCEICGYQCRQRASLNWHMCKH  |
| 85  | Q9BU19_ZN692_417_439_23     | LQCEICGFTCRQKASLNWHQRKH  |
| 86  | Q6ZMY9_ZN517_317_339_2<br>3 | YRCLRCGQRFIRGSSLLKHHLRH  |
| 87  | Q6ZMY9_ZN517_261_283_2<br>3 | YACGECGKAFSRSSRLQHQKFH   |
| 88  | Q8IZM8_ZN654_25_47_23       | FACVICGRKFRNRLMQKHLKNH   |
| 89  | Q17R98_ZN827_374_396_23     | FQCPICGLVIKRKSZYWKRMVH   |
| 90  | Q6ZMY9_ZN517_368_390_2<br>3 | HECPVCGRPFRHNSLLLLHLRLH  |
| 91  | Q8N554_ZN276_496_518_23     | YICDECGQTFKQRKHLVHQMRH   |
| 92  | Q66K89_E4F1_463_485_23      | FACAQCGKAFPKAYLLKKHQEVH  |
| 93  | Q6ZMY9_ZN517_424_446_2<br>3 | FACTECGKAFFRSYTLNEHYRLH  |
| 94  | Q96NG8_ZN582_339_361_23     | YECKECGKAFFNQGSTLIRHQRIH |
| 95  | Q8N554_ZN276_524_546_23     | LQCEVCGFQCRQRASLKYHMTKH  |
| 96  | Q6DD87_ZN787_94_116_23      | NACADCGKTFQSSSHLLVQHRRH  |
| 97  | Q6DD87_ZN787_122_144_23     | YACLECGKRFSWSSNLMQHQRIH  |
| 98  | Q6ZMY9_ZN517_289_311_2<br>3 | FACTECGKAFCRRFTLNEHGRIH  |
| 99  | Q96NG8_ZN582_283_305_23     | YQCKECGKAFFNRISHLKVHYRIH |
| 100 | Q96NG8_ZN582_395_417_23     | YQCKVCGRAPKRVSHLTVHYRIH  |
| 101 | Q6ZMY9_ZN517_452_474_2<br>3 | YRCRACGRACSRLSTLIQHQBKH  |
| 102 | Q9UKT9_IKZF3_118_140_23     | MNCDVCGLSGISFNVLVHKKRSH  |
| 103 | Q96NG8_ZN582_367_389_23     | YECKVCGKAFFRVSSQLKQHQRIH |
| 104 | Q96NG8_ZN582_311_333_23     | YACKECGKTFSHRSQLIQHQTVMH |
| 105 | Q96NG8_ZN582_423_445_23     | YECKECGKAFFSHCSQLIHHQVH  |
| 106 | Q96NG8_ZN582_199_221_23     | YKCKECGKAFFYGSRLIQHENIH  |
| 107 | Q96NG8_ZN582_227_249_23     | YECKECGKAFFNSGSNFIQHQRVH |
| 108 | Q66K89_E4F1_491_513_23      | FRCGDCGKLYKTIHVRGHRVH    |
| 109 | Q66K89_E4F1_519_541_23      | YPCPKCGKRYKTKNAQQVHFRTH  |

[0189]

도면

도면1a1

| 계목         | CHN                                                               | 10                                                                                           | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | ID% | 사업식별번호 |
|------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|--------|
| KZF1_이카포스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | MADBGQJMKQVSGKSPFVSDTPEBGDEHMP1PEBDJSTTSQGOSSKSDRVVANSV                                      |    |    |    |    |    |    |    |    | 100 | 48     |
| KZF1_이아용로스 | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | MEDJQJNNAELASTQBOBPAPSAAVLNDJSLTKSHHEMNVDGAGPANEDDEDIGDQSM                                   |    |    |    |    |    |    |    |    | 52  | 49     |
| KZF1_헬리오스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | METBALDGYTTCQDNEISPREHSMWADJTSSTPNQJHSPSHMTSTNSV                                             |    |    |    |    |    |    |    |    | 52  | 50     |
| KZF1_에로스   | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | MHTPPALPRRFQGGVRTFGSHQKQNDLEDPGGQVPELTPQADQSNHFMESILFCESQDSSLEKFTLGAPEGFSVSTPNQJHSPSRSLGANSI |    |    |    |    |    |    |    |    | 49  | 51     |
| KZF1_제거수스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | MEKKKEPELDPEVKDQJBYLJQJTHHYNNLSSSVSEIKAPALQAGTIDQJNKLDPH                                     |    |    |    |    |    |    |    |    | 22  | 52     |

| 계목         | CHN                                                                     | 100                                                                                              | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | ID% | 사업식별번호 |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| KZF1_이카포스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | KVETQSDERNGR--ACEMNGEBCADLRMLDASGERKNGSHDQSSALSGVGGRJLPJNGKJCDJOG1JCIQPNVJLMVHKRSHTGERPQCNQOGASF |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 | 48     |
| KZF1_이아용로스 | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | KVROEYSEBDEN--VLKSEPMANHEPELTPYSTRENEYENIKLEHVTVSEDSRPTSGANQCVQGLSIFNVJLMVHKRSHTGERPQCNQOGASF    |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 49     |
| KZF1_헬리오스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | KJLFQSDDECDRQPLSRDEJLIGHDESSILEPILJESSVANRVOELQGGGRJLPJNGKJCDVQAGVCIQPNVJLMVHKRSHTGERPQCNQOGASF  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 50  | 50     |
| KZF1_에로스   | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | KVBNVSDRESSR--LIGPDERLLEKDSYIVEDJSRPLGYCDSGEPHSHRGGRJLPJNGKJCDVQAGVCIQPNVJLMVHKRSHTGERPQCNQOGASF |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 49  | 51     |
| KZF1_제거수스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | SVEVSLDENSGV----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----              |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22  | 52     |

| 계목         | CHN                                                                     | 200                                                                                            | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | ID% | 사업식별번호 |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| KZF1_이카포스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | TQKANTLRHTKJHSGEPKCHLQNYACRRDALTGHJRTHS-----VGEPHKQCYOGRSYKORSSILEHKERCHNYTESMGLPGTLYEVTK----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 | 48     |
| KZF1_이아용로스 | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | TQKANTLRHTKJHSGEPKCHLQNYACRRDALTGHJRTHS-----VEKPYKCBFOGRSYKORSSILEHKERCHNYTESMGLPGTLYEVTK----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 49     |
| KZF1_헬리오스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | TQKANTLRHTKJHSGEPKCHLQNYACRRDALTGHJRTHS-----VGEPHKQCYOGRSYKORSSILEHKERCHNYTESMGLPGTLYEVTK----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 50     |
| KZF1_에로스   | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | TQKANTLRHTKJHSGEPKCHLQNYACRRDALTGHJRTHS-----VGEPHKQCYOGRSYKORSSILEHKERCHNYTESMGLPGTLYEVTK----- |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 49  | 51     |
| KZF1_제거수스  | ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- | KQTRALJEHRTJHSGEPKCHLQNYACRRDALTGHJRTHS-----GEKPYKCBLSFGCSJBSNLSHRRRKHWVPIKQJRSSLSKRW-----     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22  | 52     |

도면l*lai*i

| 계목          | CHN                                                                                                 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | ID% | 서열식별번호 |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| IKZF1_이카로스  | BEFNHSDMAEDICKIGSERIAYIDRLAANNVAKRSSMPOKELGKELSDTPYDSSA-----SYEKENEMKSHWMDQAINNAIYILGAEISLPIVQTPP   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 | 48     |
| IKZF1_아이올로스 | -----HIAKEMGSEBRALVLDRLAANVAKRSSMPOKELGKRRHCEIVMNNSSY-----MEKESSELIQTRIMQAINNAIYILGAEALRPIVQTPP     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 49     |
| IKZF1_헬리오스  | CKDEPTMNNIISLIPFERPAVLEKLTQNMGRKSSITPOKEVGEKIMRFSYDPIHTMNI--TYEKAEILMOSHMDQAINNAIYILGAEALRPIVQTPP   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 50     |
| IKZF1_에오스   | ELRDLBMYPRSKLHSSSERPTPIDLRLANSILIKRRRSTIPQKEVGRKQRRSTLDLPYDNGGVEKQVELVAHSHSLRGRSSIAFWGAHEHLRPIVQTPP |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 49  | 51     |
| IKZF1_페가수스  | ---WGVLQKRTSNLGSRRALINISPPSWVOJKPYINDPTHEIPNIQTDYESMAKTI--PTGALPRDQELMVDPINQJLSTILAQJSSLEPENQNP     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22  | 52     |

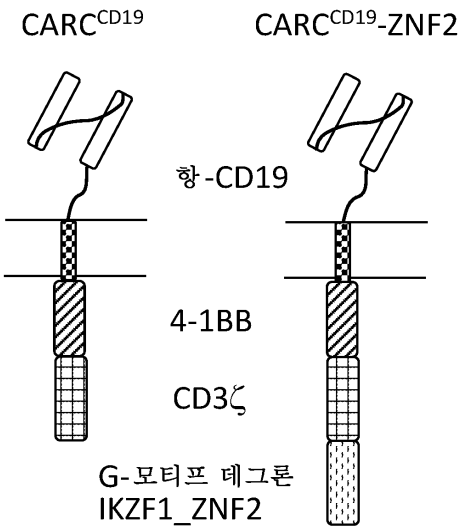
| 계목          | CHN                                                                                                | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | ID% | 서열식별번호 |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| IKZF1_이카로스  | GG-SEVVPTISPMYQJHKP-----LABGTPRGNHSAQDOSAVENILLSKAKVLPSEBPASPNBQJSDTDSNNEPQSGALIYILNHIAEPHARNELS-L |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 | 48     |
| IKZF1_아이올로스 | APTSBWPVLTSSWPILALT-----RAIMNNGAPOBELPKKSIHLPEKSVPSERELSPNNGHSDTDTDSNHEBRONHTYQONHVAISBRANQAPLL    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 49     |
| IKZF1_헬리오스  | STIAEVAPTISSAYSQYTH--PNKLTERTSRETADSHENNMOPISLITREKSRPOREBPASPNBQJSDTDSNHDHQSITYQHPALNPKRKQSPAY--M |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 50     |
| IKZF1_에오스   | NCISELIPVLTSSVTOQJPLRQLELPGSRBAQEGEDLAQGPILYRBRGQULDPGASPNBQJSDTDSNHEBRVAQVSVLQGPPEPQPTIVVG        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 49  | 51     |
| IKZF1_페가수스  | ASPDVVPCEPKERTMIOQP-----STQAVVASVSASTIQSSSPTSEPRSHSQNNYSPVAGSSPESATSTPSTIGANSQPTIPAPALP            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22  | 52     |

| 계목          | CHN                                                                                               | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | ID% | 서열식별번호 |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| IKZF1_이카로스  | KEEHRAYD-----ILIRASBNBQDALRVVTSGEQKVKYKCEHGRVILFLDHVMTTIIHGGCHGRDPFCNNMCGYHSQDRYEFSHITTRGHRFTMS   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 | 48     |
| IKZF1_아이올로스 | KEVPRSYE-----ILIKPPICPDSDVKIINKEGEVMDYRCHGRVILFLDHVMTTIIHGGCHGRDPFCNNMCGYRSHDREYFSSHILARGEHRALIK  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 49     |
| IKZF1_헬리오스  | KEVDKALD-----ITTKAPKGSILKDIYKVINGBGQJIRAKCEHGRVILFLDHVMTTIIHGGCHGRDPFCNNMCGYRSQDRYEFSHIVRGEHTTH-- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 52  | 50     |
| IKZF1_에오스   | RHSPVAKEDPKEQJELRGTRPEPSKEVILRVGESEGPVKAFKCEHCRIILFLDHVMTTIIHGGCHGRDPFCNNMCGYHSQDRYEFSHIVRGEHVG-- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 49  | 51     |
| IKZF1_페가수스  | VQDPQL-----HIHQHCDMAFDANILTYIIHGGCHGRDPFCNNMCGYKRNKIDFACHPRARQHNQH--                              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 22  | 52     |

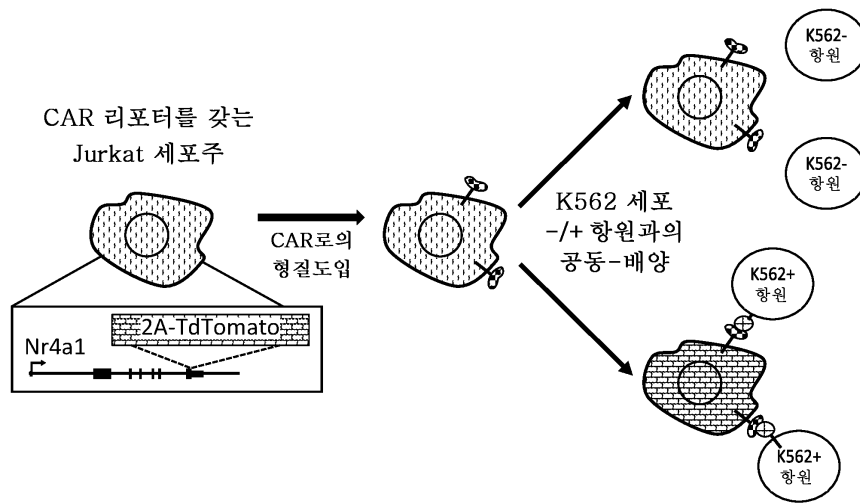
도면1b

| 유니코드   | 유전자   | 단백질   | 개시  | 종결  | 길이 | 서열                        | 서열식별번호 |
|--------|-------|-------|-----|-----|----|---------------------------|--------|
| Q13422 | IKZF1 | 이카로스  | 117 | 139 | 23 | LKCDICGIIICIGPNVLMVHKRSH  | 20     |
| Q13422 | IKZF1 | 이카로스  | 145 | 167 | 23 | FQONOCGASFTQKGNIILRHIKLH  | 21     |
| Q13422 | IKZF1 | 이카로스  | 201 | 224 | 24 | HKGYCGRSYKQSSLEEHKEKCH    | 23     |
| Q13422 | IKZF1 | 이카로스  | 490 | 514 | 25 | FECNMGYHSQDRYEFSSHIVRGEH  | 25     |
| Q9UKS7 | IKZF2 | 헬리오스  | 112 | 134 | 23 | LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH   | 26     |
| Q9UKS7 | IKZF2 | 헬리오스  | 140 | 162 | 23 | FHCNOCGASFTQKGNIILRHIKLH  | 27     |
| Q9UKS7 | IKZF2 | 헬리오스  | 196 | 219 | 24 | HKCNVCGRSYKQSSLEEHKEKCH   | 29     |
| Q9UKS7 | IKZF2 | 헬리오스  | 499 | 523 | 25 | LECNICGYSQDRYEFSSHIVRGEH  | 58     |
| Q9UKT9 | IKZF3 | 아이올로스 | 118 | 140 | 23 | MNCDVCGISCTSFNVLMVHKRSH   | 31     |
| Q9UKT9 | IKZF3 | 아이올로스 | 146 | 168 | 23 | FQONOCGASFTQKGNIILRHIKLH  | 32     |
| Q9UKT9 | IKZF3 | 아이올로스 | 202 | 224 | 23 | YKQEFQGRSYKQSSLEEHKEKCH   | 34     |
| Q9UKT9 | IKZF3 | 아이올로스 | 480 | 504 | 25 | FECNMGYRSYKQSSLEEHKEKCH   | 36     |
| Q9H2S9 | IKZF4 | 에로스   | 159 | 181 | 23 | LKCDVCGMVCIGPNVLMVHKRSH   | 37     |
| Q9H2S9 | IKZF4 | 에로스   | 187 | 209 | 23 | FHCNOCGASFTQKGNIILRHIKLH  | 38     |
| Q9H2S9 | IKZF4 | 에로스   | 248 | 271 | 24 | YKCNVCGRSYKQSSLEEHKEKCH   | 40     |
| Q9H2S9 | IKZF4 | 에로스   | 558 | 582 | 25 | FECNMGYHSQDRYEFSSHIVRGEH  | 42     |
| Q9H5V7 | IKZF5 | 페카수스  | 392 | 416 | 25 | FQCNICGCKCKNKYDFACHFARGQH | 47     |

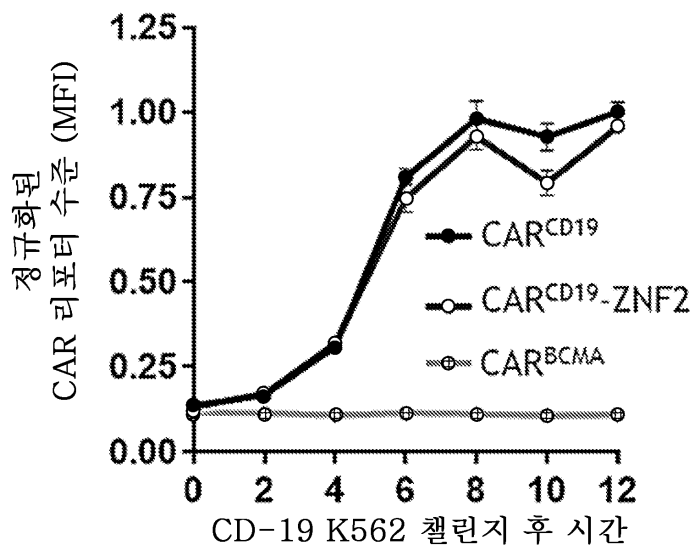
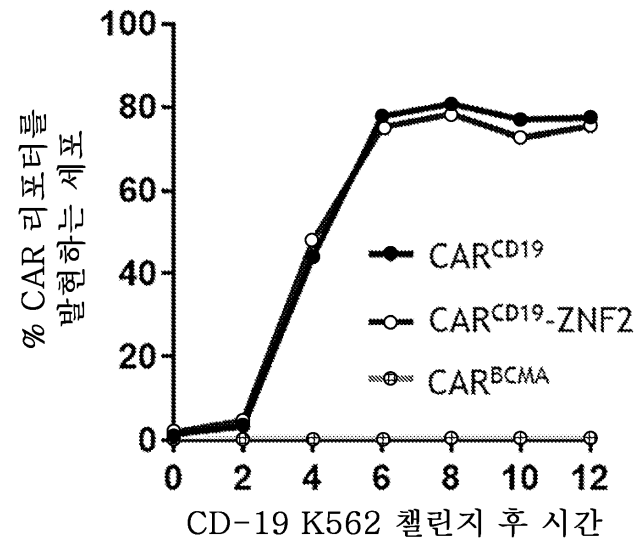
도면2



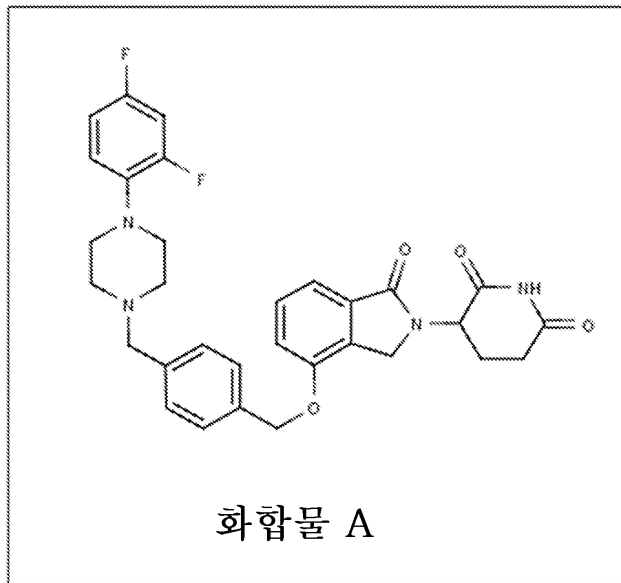
도면3



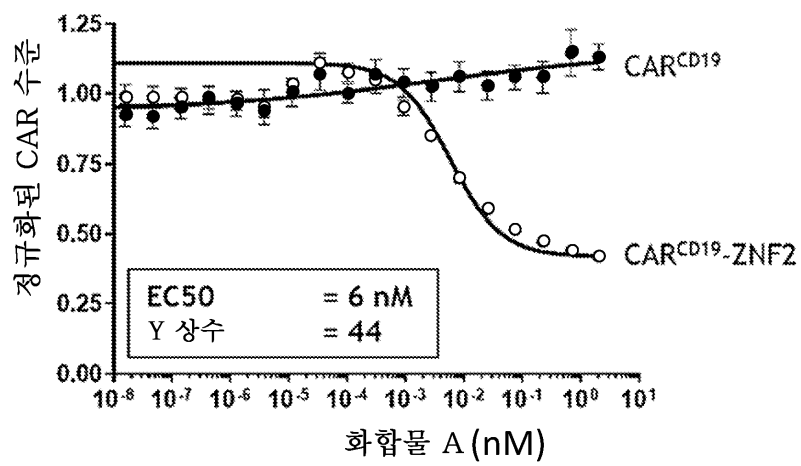
도면4a



도면4b



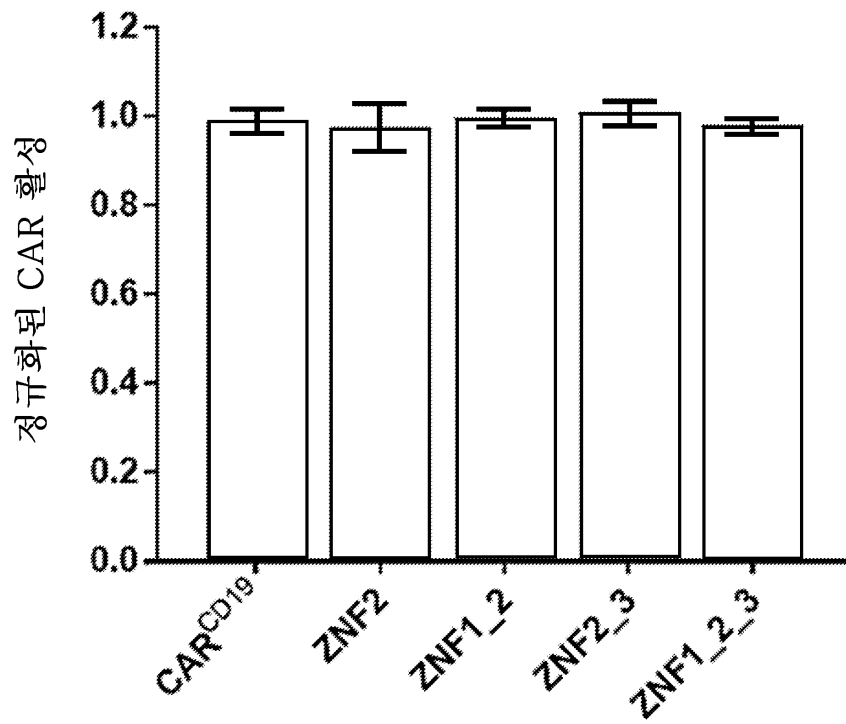
도면4c



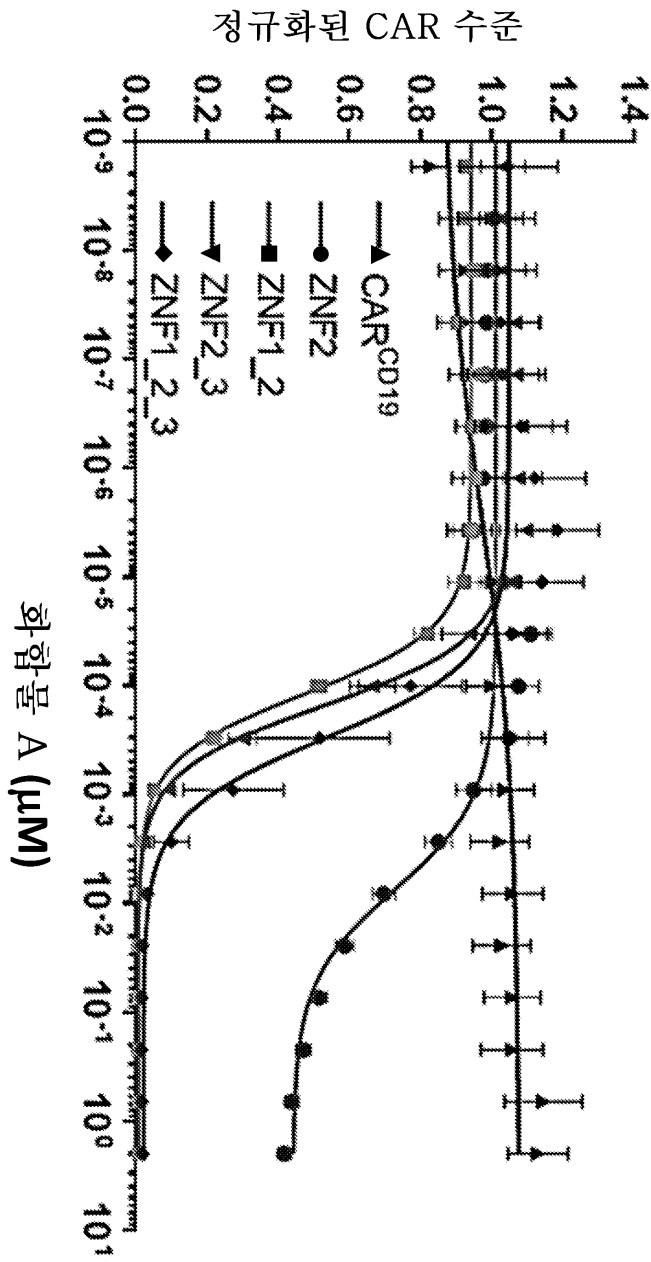
도면5a

|                       |       |      |   |   |   |     |           |          |     |     |
|-----------------------|-------|------|---|---|---|-----|-----------|----------|-----|-----|
| CAR <sup>CD19</sup> : | 4-1BB | CD3z |   |   |   | 구축물 | IC50 (nM) | Y 상수     |     |     |
|                       | 4-1BB | CD3z | 2 |   |   |     | ZNF2      | 30       | 44  |     |
| ZNF2:                 | 4-1BB | CD3z | 1 | 2 |   |     |           | ZNF1_2   | .12 | 1   |
| ZNF1_2:               | 4-1BB | CD3z | 1 | 2 |   |     |           | ZNF2_3   | .15 | .9  |
| ZNF2_3:               | 4-1BB | CD3z | 2 | 3 |   |     |           | ZNF1_2_3 | .30 | 2.4 |
| ZNF1_2_3:             | 4-1BB | CD3z | 1 | 2 | 3 |     |           |          |     |     |

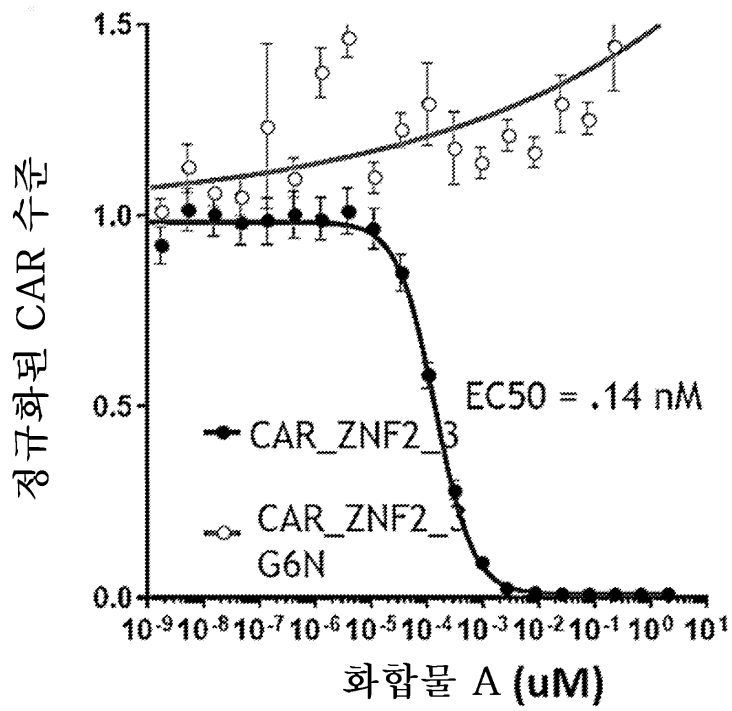
도면5b



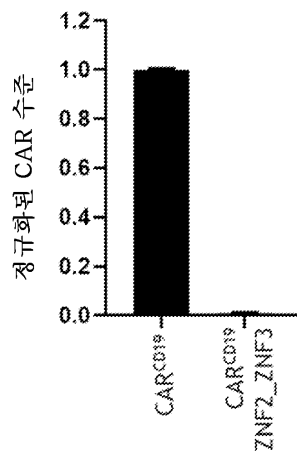
도면5c



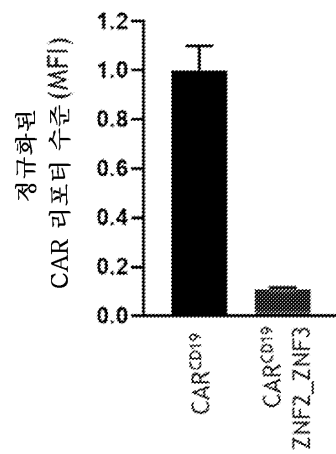
도면5d



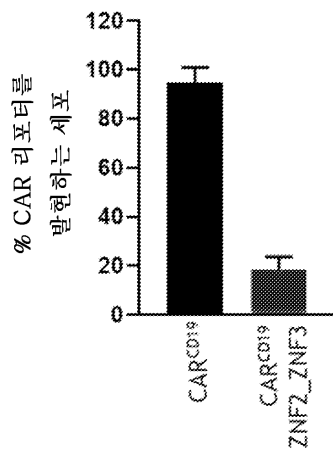
도면6a



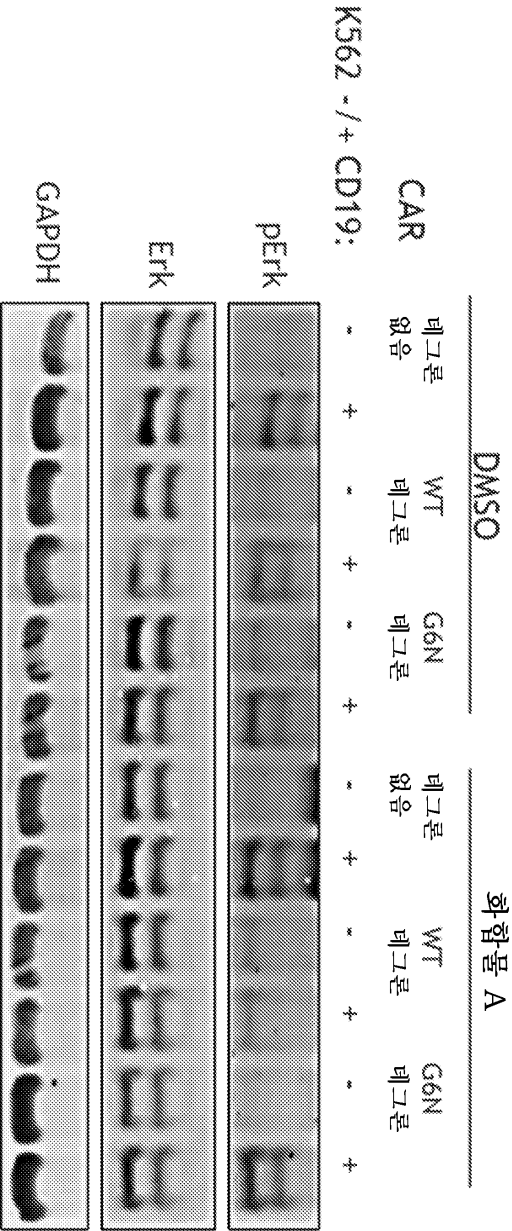
도면6b



도면6c



도면7



| 계목                      | CHN                                                     |                             | ID%         | 차별식별번호 |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------|--------|
| 컨텐츠 기호                  | . . . . .                                               | : * . . . .                 | : * . . . . |        |
| 차별 로고                   |                                                         |                             |             |        |
| Q13422_IKZF1_145_167_23 | F Q C N Q C G A S F T Q K G N L L R H I K L H . .       | FK GDO ASYKQ GNL LWRH KRSCH |             |        |
| Q9UKT9_IKZF3_146_168_23 | F Q C N Q C G A S F T Q K G N L L R H I K L H . .       |                             | 100         | 21     |
| Q9UKT9_IKZF3_140_162_23 | F H C N Q C G A S F T Q K G N L L R H I K L H . .       |                             | 96          | 32     |
| Q9H2S9_IKZF4_187_209_23 | F H C N Q C G A S F T Q K G N L L R H I K L H . .       |                             | 96          | 27     |
| Q9H2S9_IKZF4_248_271_24 | Y K C N Y C G R S Y K Q Q S T L E E H K E R C H . .     |                             | 35          | 38     |
| Q9UKS7_IKZF2_196_219_24 | H K C N Y C G R S Y K Q R S S L E E H K E R C H . .     |                             | 35          | 40     |
| Q9H5V7_IKZF5_392_416_25 | F Q C N I C G C K C K N K Y D F A C H F A R G Q H       |                             | 35          | 29     |
| Q9UKT9_IKZF3_118_140_23 | M N C D Y C C G L S C I S F N V L M V H K R S H . .     |                             | 30          | 47     |
| Q13422_IKZF1_201_224_24 | H K C C G V C G R S Y K Q R N S S L E E V H K R S H . . |                             | 30          | 31     |
| Q13422_IKZF1_117_139_23 | L K C C D I C G I I C I G P N V L M V H K R S H . .     |                             | 26          | 23     |
| Q9UKS7_IKZF2_112_134_23 | L K C C D V C G M V C I I G P N V L M V H K R S H . .   |                             | 26          | 20     |
| Q9H2SP_IKZF4_159_181_23 | L K C C D V C G M V C I I G P N V L M V H K R S H . .   |                             | 26          | 26     |
|                         |                                                         |                             | 26          | 37     |

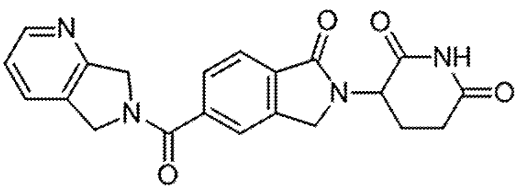
도면 9i

| 계목                      | CHN                     | C O G K F S L H R H |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | ID% | 서열식별번호 |     |    |    |    |    |    |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|--------|-----|----|----|----|----|----|
| 컨텐츠 번호                  | :                       | *                   | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | *   | *      |     |    |    |    |    |    |
| 서열 로고                   | 서열 로고                   |                     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |        |     |    |    |    |    |    |
| Q9UKT9_IJCF3_146_168_23 | F                       | Q                   | C | N | Q | C | G | A | S | F | T | Q | K | G | S | L | H | R   | H      | 100 | 72 |    |    |    |    |
|                         | 066K89_E4F1_220_242_23  | H                   | E | C | K | L | C | G | A | S | F | R | T | K | G | S | L | I   | R      | H   | 52 | 73 |    |    |    |
|                         | 06ZM9_YN517_205_227_23  | F                   | Q | C | T | E | C | G | K | A | F | K | Q | S | S | I | L | L   | R      | H   | 52 | 74 |    |    |    |
|                         | 06DD87_ZN787_178_200_23 | F                   | V | C | P | E | C | G | K | A | F | S | Q | P | K | S | L | L   | R      | H   | 48 | 75 |    |    |    |
|                         | 06ZM9_YN517_396_418_23  | F                   | E | C | A | E | C | G | K | A | F | G | R | K | K | S | N | L   | T      | L   | 48 | 76 |    |    |    |
|                         | 096JP5_ZP91_400_422_23  | L                   | Q | C | E | I | C | G | F | T | C | R | Q | K | A | S | L | N   | W      | H   | 43 | 77 |    |    |    |
|                         | 06DD87_ZN787_150_172_23 | Y                   | T | C | P | D | C | G | R | S | F | T | Q | S | K | S | L | A   | K      | H   | 43 | 78 |    |    |    |
|                         | 096K80_ZN653_528_550_23 | F                   | T | C | E | D | C | G | K | S | F | K | R | K | N | H | L | E   | V      | H   | 43 | 79 |    |    |    |
|                         | Q17R98_ZN857_817_839_23 | F                   | P | C | D | V | C | G | K | V | F | G | R | Q | K | N | T | L   | S      | R   | H  | 43 | 80 |    |    |
|                         | 06DD87_ZN787_317_339_23 | H                   | I | C | V | E | C | G | E | G | F | V | Q | G | A | A | L | R   | R      | H   | K  | 43 | 81 |    |    |
|                         | 06DD87_ZN787_66_88_23   | Y                   | I | C | N | E | C | G | K | S | F | S | H | W | S | K | L | T   | A      | H   | Q  | 43 | 82 |    |    |
|                         | 06ZM9_YN517_233_255_23  | F                   | Q | C | E | I | C | G | K | A | F | R | Q | S | T | Q | L | A   | A      | H   | M  | 43 | 83 |    |    |
|                         | 096C40_ZN653_556_578_23 | Q                   | Q | C | E | I | C | G | Y | Q | C | R | Q | S | L | N | W | H   | H      | Q   | R  | 39 | 84 |    |    |
|                         | 09BU19_ZN692_417_439_23 | L                   | Q | C | E | I | C | G | F | T | C | R | Q | K | A | S | L | L   | N      | W   | H  | Q  | 39 | 85 |    |
|                         | 06ZM9_YN517_317_339_23  | Y                   | R | C | L | R | C | G | K | A | F | I | R | G | S | S | L | L   | Q      | K   | H  | L  | 39 | 86 |    |
|                         | 06ZM9_YN517_261_283_23  | Y                   | A | C | G | I | C | G | R | K | F | S | R | S | S | R | L | L   | Q      | K   | H  | L  | 39 | 87 |    |
|                         | Q8LZM8_ZN654_25_47_23   | F                   | A | C | V | I | C | G | R | K | F | R | N | R | G | L | M | Q   | K      | H   | L  | K  | 39 | 88 |    |
|                         | Q17R98_ZN827_374_396_23 | F                   | Q | C | P | I | C | G | L | V | I | K | R | K | S | Y | W | K   | R      | H   | M  | V  | 39 | 89 |    |
|                         | 06ZM9_YN517_368_390_23  | H                   | E | C | D | E | C | G | R | P | F | F | K | Q | N | S | L | L   | L      | H   | Q  | M  | R  | 39 | 90 |
|                         | Q8M554_ZN276_496_518_23 | Y                   | I | C | P | V | C | G | R | T | F | F | K | Q | K | S | L | L   | L      | V   | H  | L  | H  | 39 | 91 |
| Q66K89_E4F1_463_485_23  | F                       | A                   | C | A | Q | C | G | K | A | F | P | K | A | Y | L | L | K | K   | H      | Q   | E  | V  | 39 | 92 |    |

도면9ii

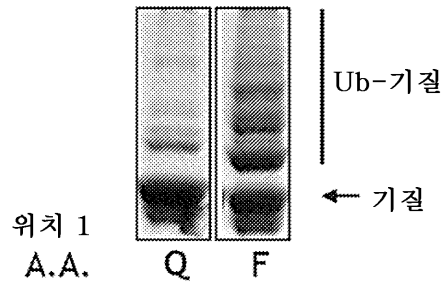
[illegible]

도면 10a

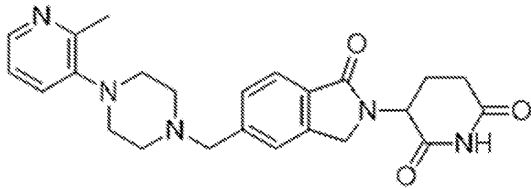


### 도면10b

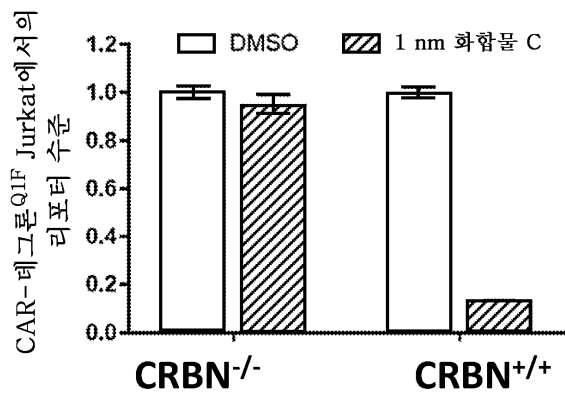
이카로스 MBP-ZNF2의 시험관내 유비퀴틴화



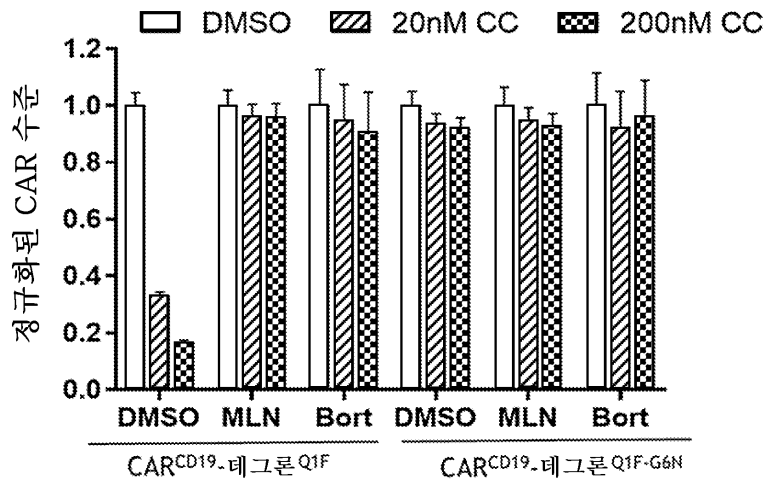
### 도면11a



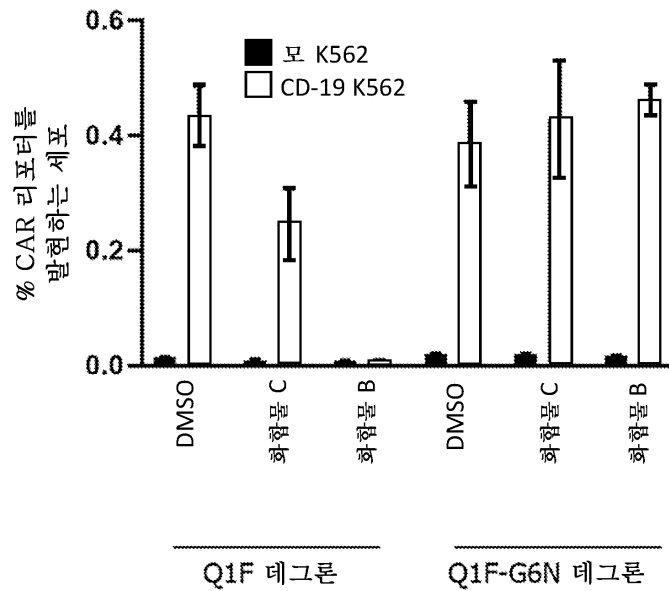
### 도면11b



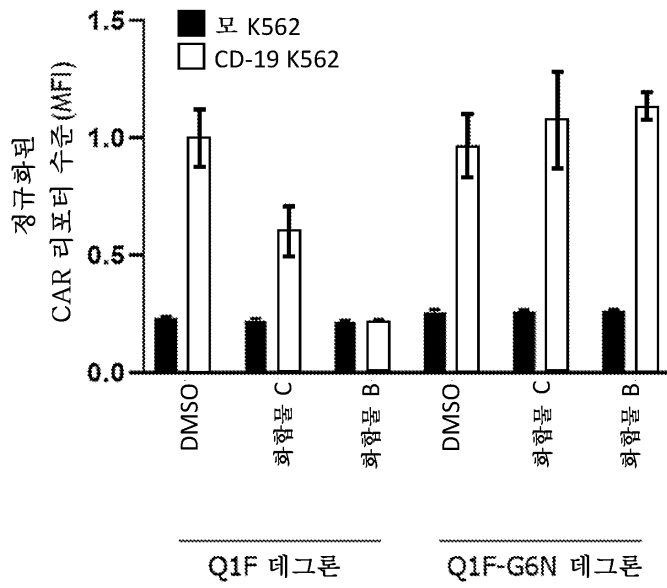
도면11c



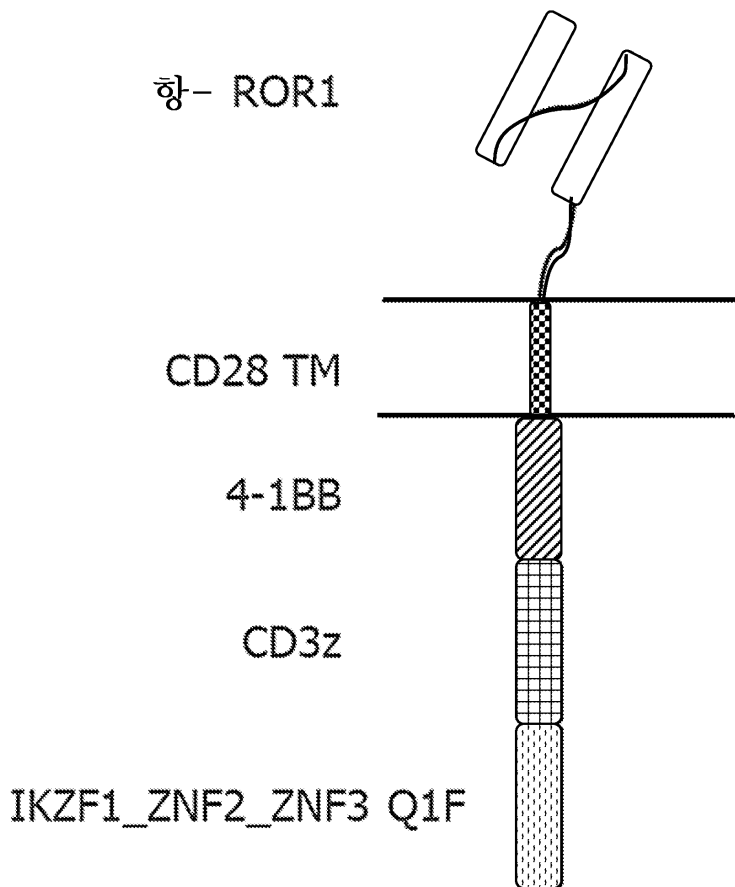
도면12a



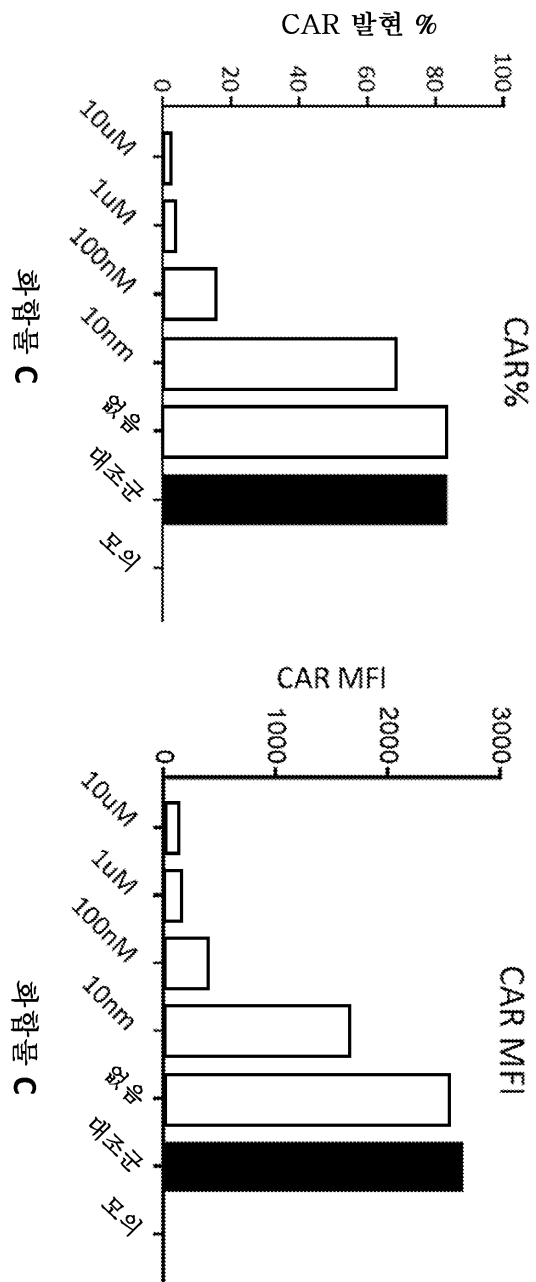
도면12b



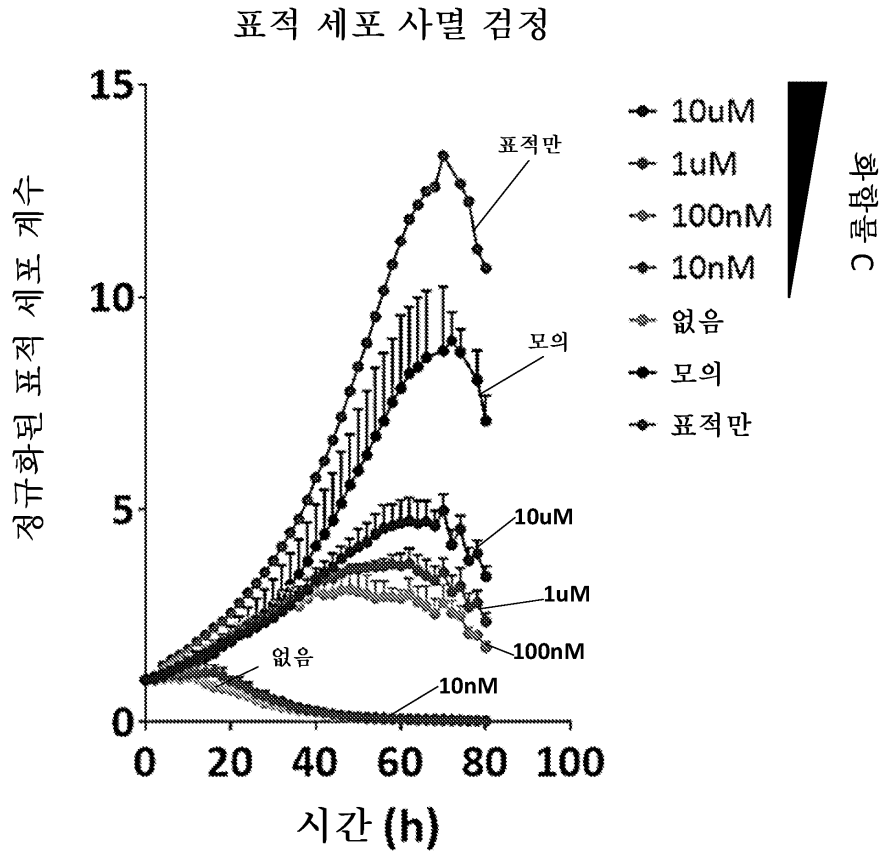
도면13a



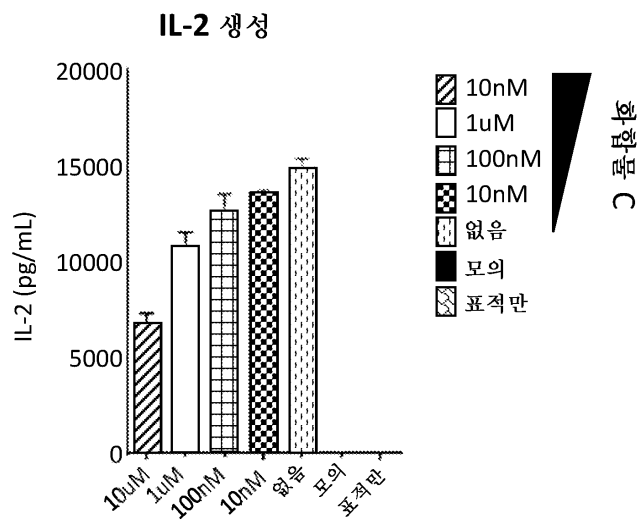
도면13b



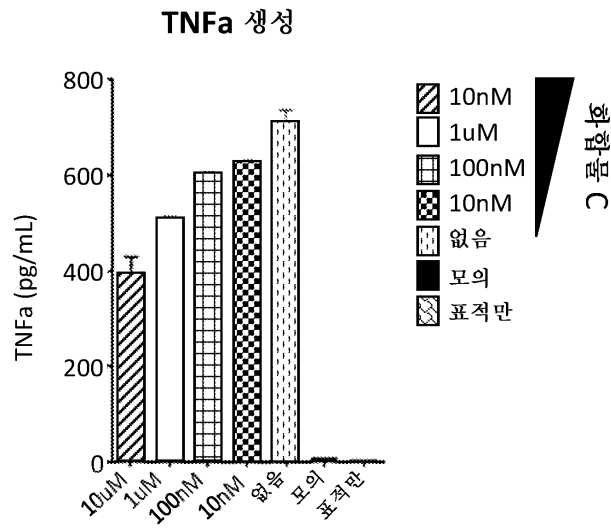
도면14a



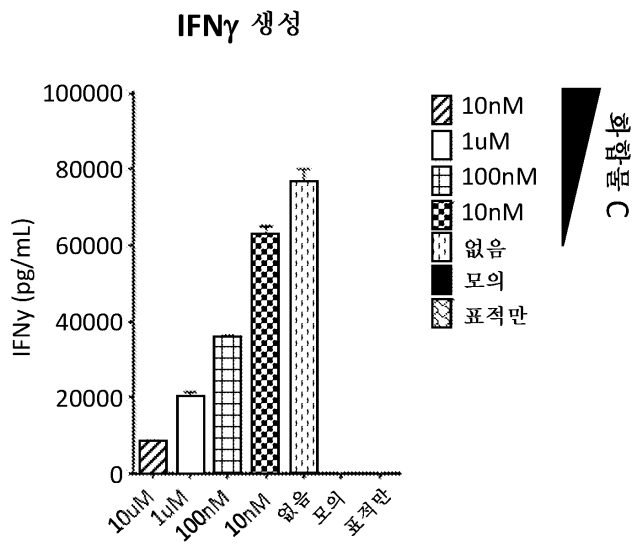
도면14b



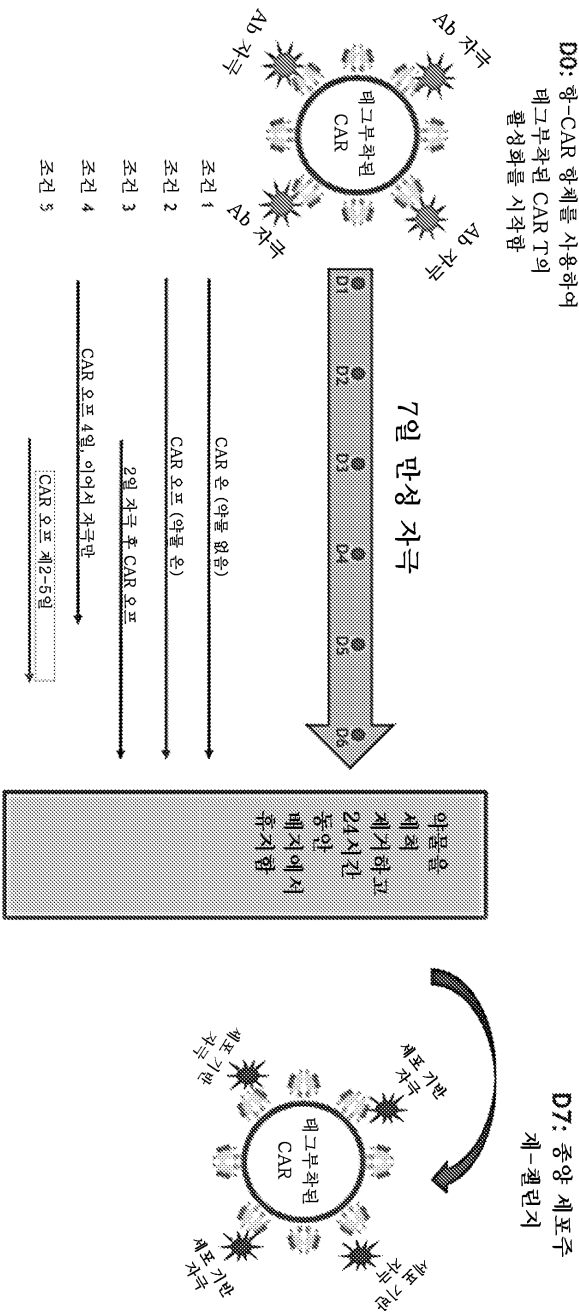
도면14c



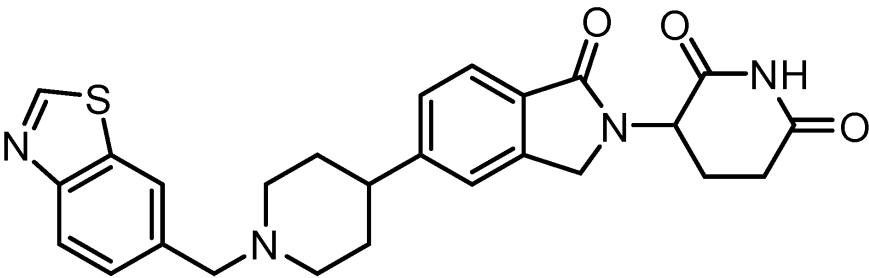
도면14d



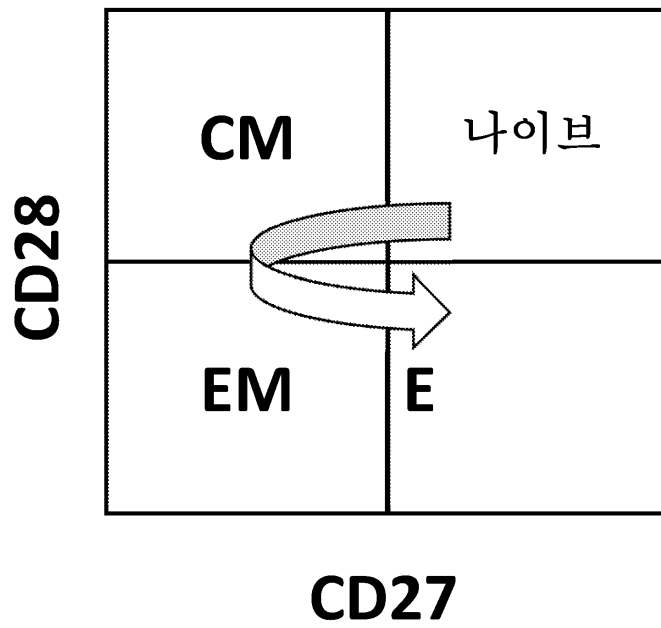
도면15



도면16a

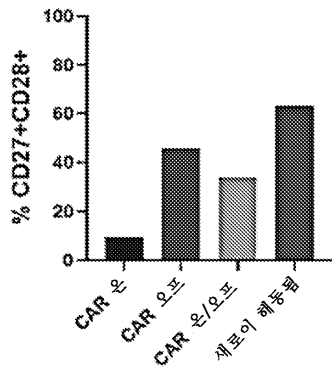


도면16b

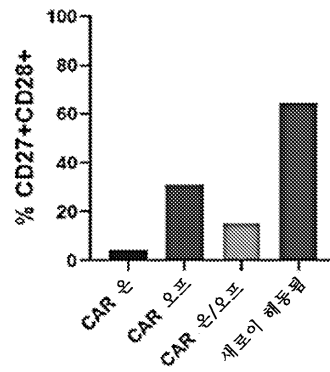


도면16c

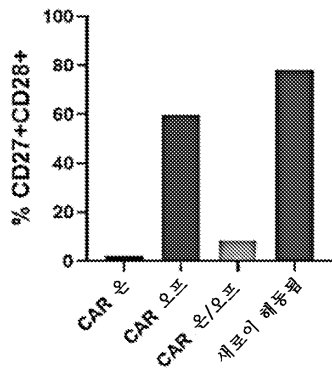
% 나이브 (CD27+CD28+) CD4 공여자 1



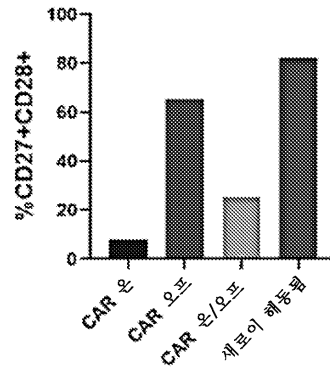
% 나이브 (CD27+CD28+) CD8 공여자 1



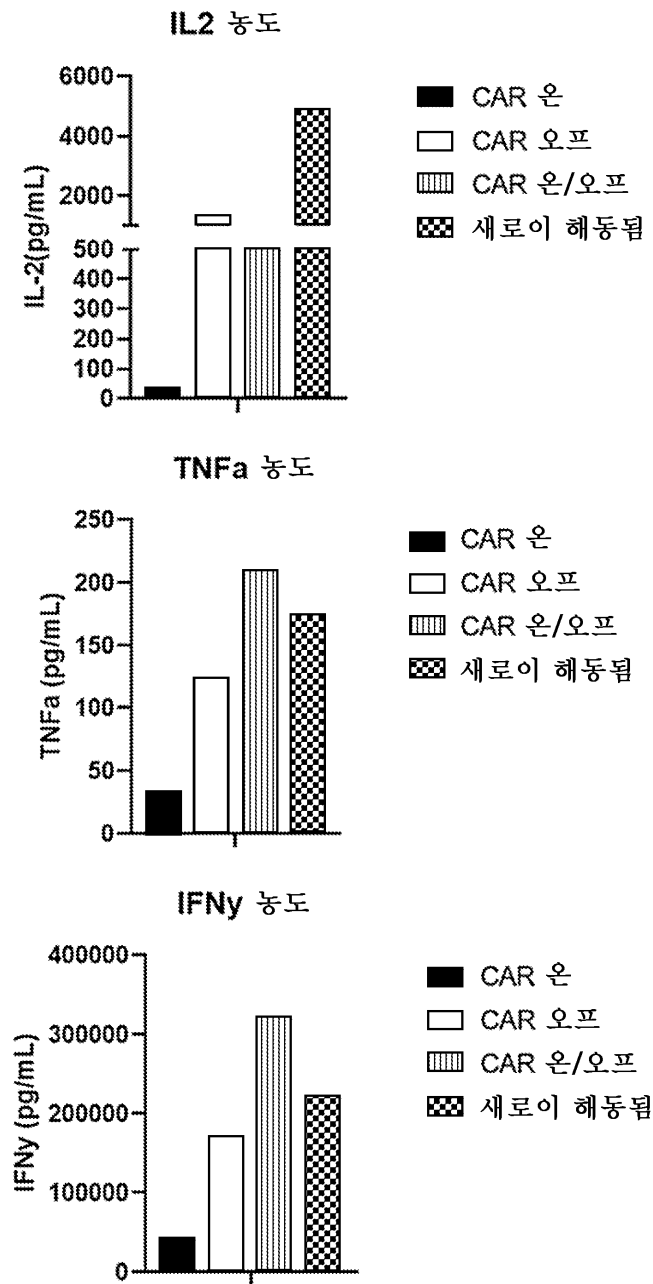
% 나이브 (CD27+CD28+) CD4 공여자 2



% 나이브 (CD27+CD28+) CD8 공여자 2

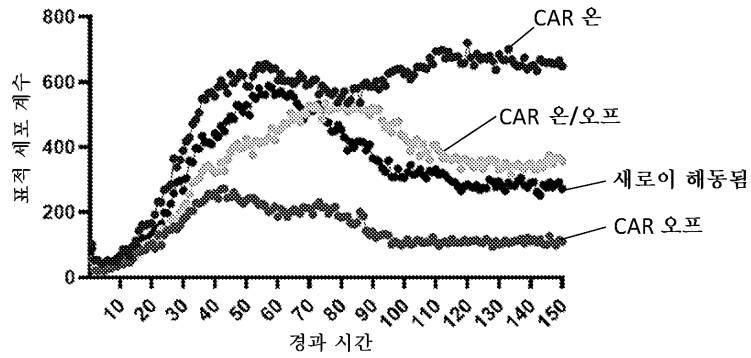


도면17a

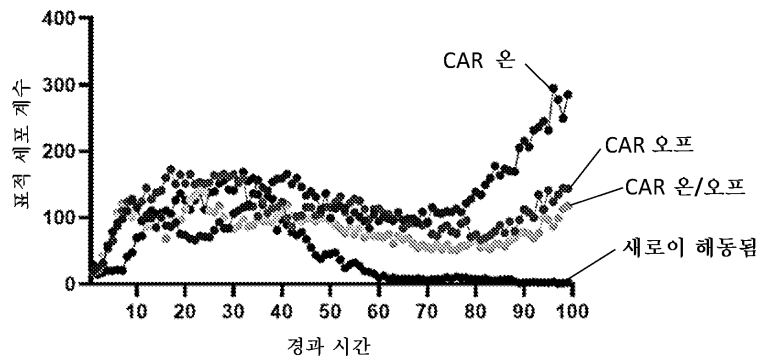


도면17b

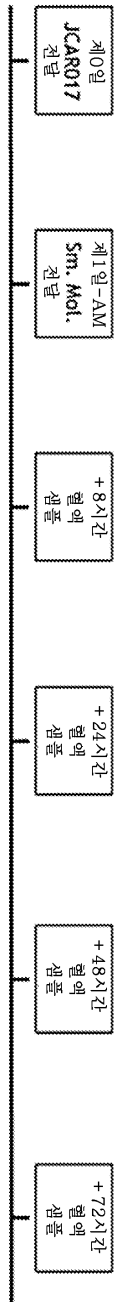
공여자 1 타원 중앙 세포 사멸



공여자 2 타원 중앙 세포 사멸



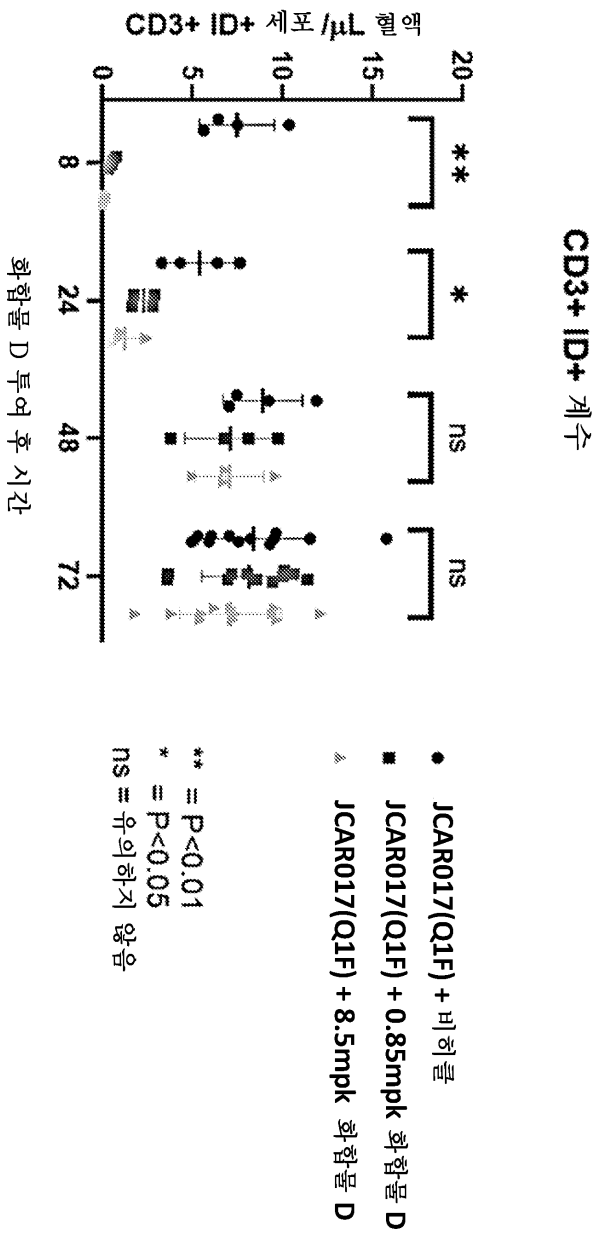
도면18a



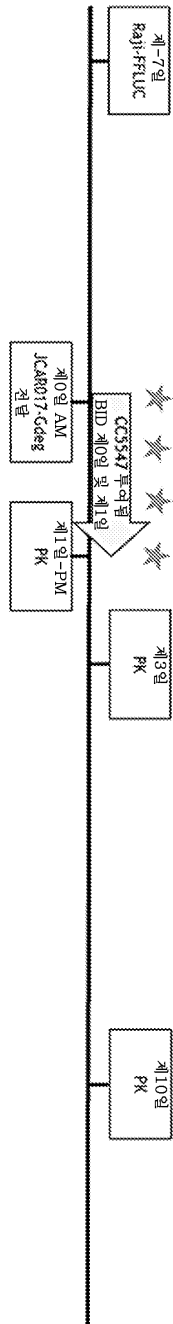
도면18b

| 군                      | N  | JCAR017-Gdeg# | SM 용량<br>(mpk) | 용량<br>(mg/마우스) | Mg/군 (x1.5) |
|------------------------|----|---------------|----------------|----------------|-------------|
| JCAR017Gdeg + VEH      | 12 | 2E6           | 0              | 0              | 0           |
| JCAR017Gdeg +<br>화합물 D | 12 | 2E6           | 0.85           | 0.017          | 0.306       |
| JCAR017Gdeg +<br>화합물 D | 12 | 2E6           | 8.5            | 0.17           | 3.06        |

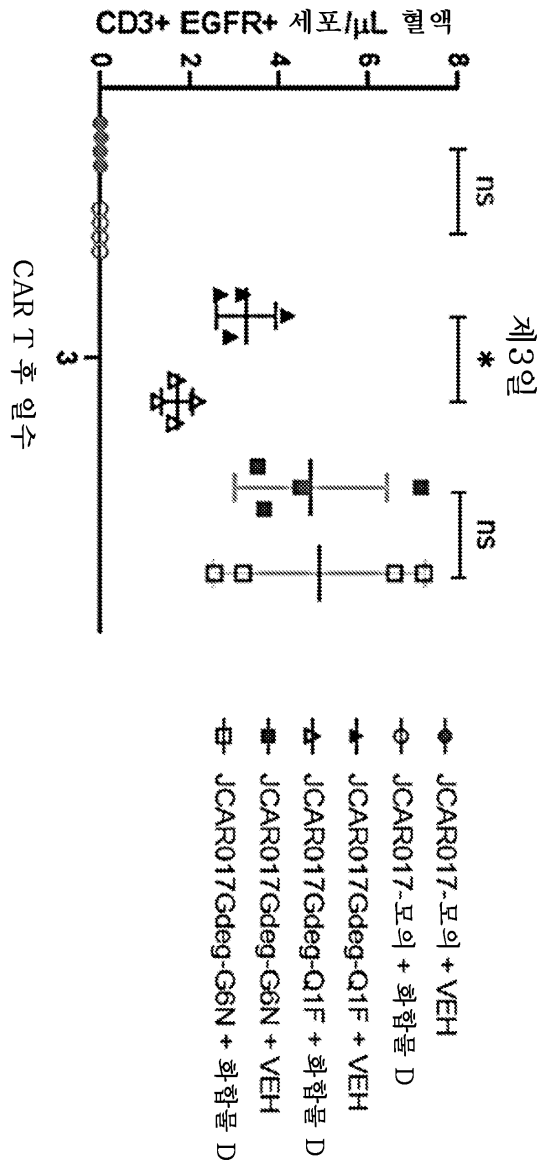
도면18c



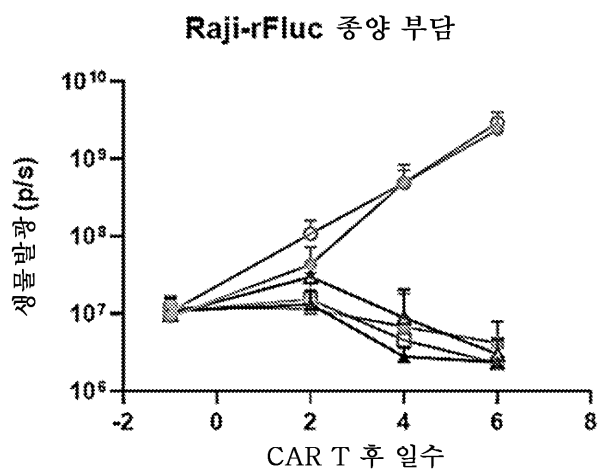
도면19a



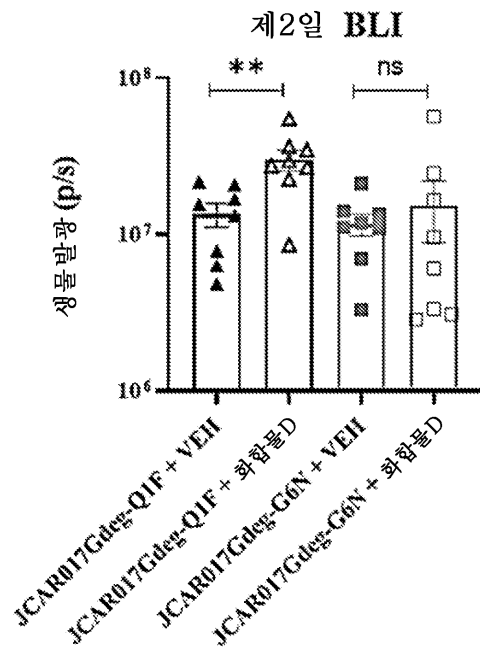
도면19b



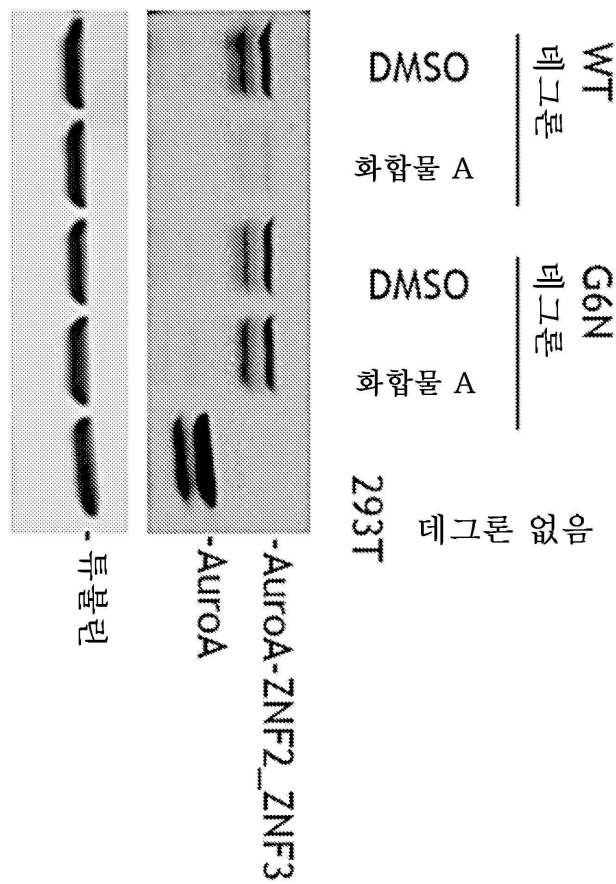
도면19c



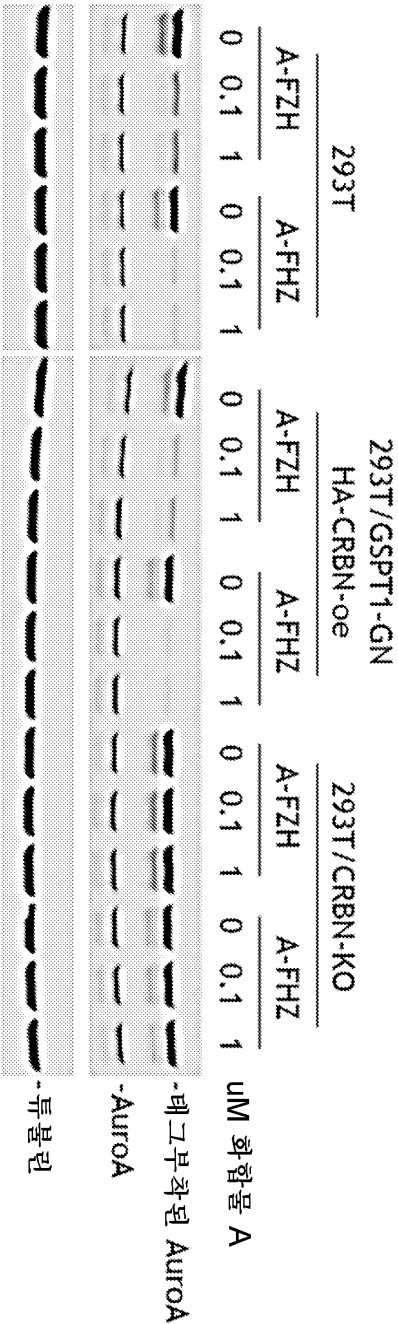
도면19d



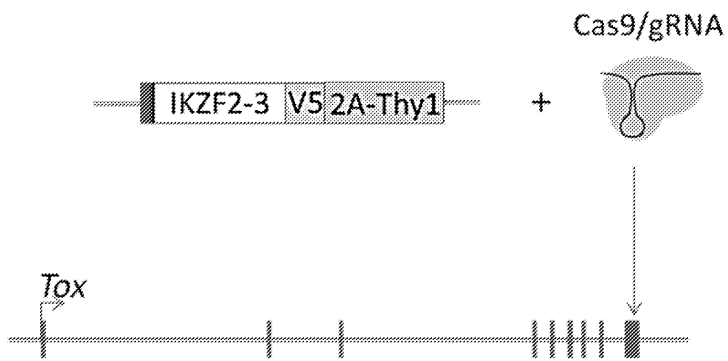
도면20a



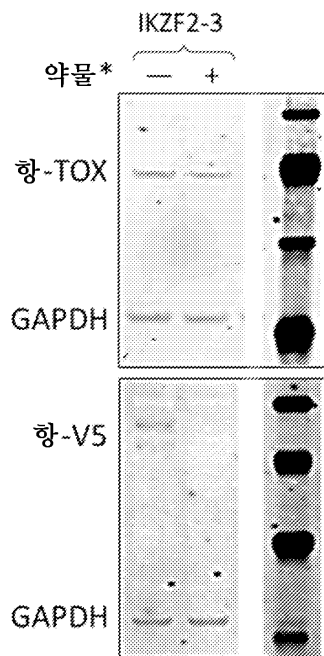
도면20b



도면20c



도면20d



## 서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.