(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0055733
(43) 공개일자 2024년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7005287
(22) 출원일자(국제) 2022년08월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월15일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/113170
(87) 국제공개번호 WO 2023/020558
국제공개일자 2023년02월23일
(30) 우선권주장
PCT/CN2021/113239 2021년08월18일 중국(CN)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
레전드 바이오테크 아일랜드 리미티드
아일랜드, 더블린 1, 노스 월 콰이, 원 스펜서 독
(72) 발명자
주, 얀량
중국 211100 지앙수 난징 지앙닝 디스트릭트 롱미안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스 타운 넘버 6
지앙, 쿵링
중국 211100 지앙수 난징 지앙닝 디스트릭트 롱미안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스 타운 넘버 6
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 71 항

(54) 발명의 명칭 **TLR 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포**

(57) 요 약

본 출원은 TLR 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포를 제공한다. 상기 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 본 출원은 이러한 변형된 면역 세포를 사용하는 암을 치료하는 방법 및 약학 조성물을 더 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/4613 (2023.05)
A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/4632 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C12N 5/0638 (2023.05)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자
투, 종규안
중국 211100 지앙수 난징 지앙닝 디스트릭트 롱미안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스 타운 넘버 6
장, 야펭
중국 211100 지앙수 난징 지앙닝 디스트릭트 롱미안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스 타운 넘버 6
우, 슈
중국 211100 지앙수 난징 지앙닝 디스트릭트 롱미안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스 타운 넘버 6
판, 샤오후
중국 211100 지앙수 난징 지앙닝 디스트릭트 롱미안 애비뉴 넘버 568 빌딩 오브 난징 라이프 사이언스 타운 넘버 6

(30) 우선권주장
PCT/CN2021/122129 2021년09월30일 중국(CN)
PCT/CN2021/133061 2021년11월25일 중국(CN)
PCT/CN2022/112578 2022년08월15일 중국(CN)

명 세 서

청구범위

청구항 1

변형된 면역 세포로서,

a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및

b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 상기 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 상기 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하는 변형된 면역 세포.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 상기 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합되는 변형된 면역 세포.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일한 변형된 면역 세포.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이한 변형된 면역 세포.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 상기 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되는 변형된 면역 세포.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 상기 제2 결합 도메인은 각각 상기 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합되는 변형된 면역 세포.

청구항 7

제1항 내지 제3항 및 제5항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 상기 제2 표적 결합 도메인은 동일한 변형된 면역 세포.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 상기 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되는 변형된 면역 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 TLR 막횡단 도메인 및 상기 제1 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래되는 변형된 면역 세포.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 TLR 막횡단 도메인 및 상기 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래되는 변형된 면역 세포.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 TLR 막횡단 도메인 및 상기 제2 TLR 막횡단 도메인은 동일한 변형된 면역 세포.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 상기 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 변형된 면역 세포.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

상기 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR4로부터 유래되는 변형된 면역 세포.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 TLR 막횡단 도메인 및 상기 제2 TLR 막횡단 도메인은 상이한 변형된 면역 세포.

청구항 15

제1항 내지 제11항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 상기 제2 TLR 신호 전달 도메인은 상이한 변형된 면역 세포.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되는 변형된 면역 세포.

청구항 17

제14항 또는 제15항에 있어서,

상기 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR6으로부터 유래되는 변형된 면역 세포.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래되는 변형된 면역 세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및/또는 상기 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편인 변형된 면역 세포.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb인 변형된 면역 세포.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 scFv 또는 sdAb는 CD33, CLL1, CD123, CD19, CD20, CD22, BCMA, GPRC5D 및 GPC3에 특이적으로 결합하는 변형된 면역 세포.

청구항 22

제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 분자는 면역 체크포인트 단백질인 변형된 면역 세포.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 표적 분자는 PD-1, CD70, CD27, SIRPα 및 TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형된 면역 세포.

청구항 24

제5항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 분자는 면역 세포에서 발현되는 천연 단백질인 변형된 면역 세포.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 표적 분자는 NKG2D인 변형된 면역 세포.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

상기 표적 분자는 NKG2D의 전장 서열인 변형된 면역 세포.

청구항 27

제24항 또는 제25항에 있어서,

상기 표적 분자는 돌연변이된 NKG2D인 변형된 면역 세포.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 돌연변이된 NKG2D는 절단된 서열 및/또는 아미노산 치환, 돌연변이, 첨가 및/또는 결실을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 29

제24항 또는 제25항에 있어서,

상기 표적 분자는 NKG2D의 세포외 항원 결합 도메인인 변형된 면역 세포.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형된 면역 세포.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 변형된 면역 세포는 NK세포인 변형된 면역 세포.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포인 변형된 면역 세포.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)인 변형된 면역 세포.

청구항 35

제33항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 변형된 T세포 수용체(TCR)인 변형된 면역 세포.

청구항 36

제33항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체인 변형된 면역 세포.

청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 상기 제1 폴리펩티드 및/또는 상기 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 상기 제1 폴리펩티드 및/또는 상기 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 CD19, CLL1, BCMA 및 GPC3 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 40

제39항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 SEQ ID NO: 1, 3, 57-60, 61-65, 71-73 중 어느 하나의 아미노산 서열과 적어도 약 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, SEQ ID NO: 1, 3, 57-60, 61-65, 71-73 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형된 면역 세포는 상기 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 및 상기 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 42

제1항 내지 제3항, 제5항 내지 제7항, 제9항 내지 제13항 및 제19항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드는 동일하고, 상기 변형된 면역 세포는 상기 제1 폴리펩티드 및 상기 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 43

제33항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형된 면역 세포는 상기 조작된 수용체를 코딩하는 제3 핵산을 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 핵산 및 상기 제2 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 변형된 면역 세포.

청구항 45

제41항 또는 제43항에 있어서,

상기 제1 핵산 및 상기 제2 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 변형된 면역 세포.

청구항 46

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 핵산 및 상기 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 변형된 면역 세포.

청구항 47

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 핵산 및 상기 제3 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 변형된 면역 세포.

청구항 48

제43항, 제44항 및 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 핵산, 상기 제2 핵산 및 상기 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 변형된 면역 세포.

청구항 49

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 표적 결합 도메인 및 상기 제2 표적 결합 도메인은 CD20의 서브 유닛을 특이적으로 인식하는 변형된 면역 세포.

청구항 50

제8항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

(1) 상기 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 상기 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하거나; 또는

(2) 상기 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 상기 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식하는 변형된 면역 세포.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 상기 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인을 추가로 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 52

제51항에 있어서,

상기 제1 세포내 도메인 및 상기 제2 세포내 도메인은 동일한 변형된 면역 세포.

청구항 53

제51항에 있어서,

상기 제1 세포내 도메인 및 상기 제2 세포내 도메인은 상이한 변형된 면역 세포.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 사이토카인 수용체 및/또는 상기 제2 사이토카인 수용체는 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형된 면역 세포.

청구항 55

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 사이토카인 수용체의 상기 제1 세포내 도메인 및/또는 상기 제2 사이토카인 수용체의 상기 제2 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 변형된 면역 세포.

청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 사이토카인 수용체의 상기 제1 세포내 도메인의 C-말단은 상기 제1 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합되고; 및/또는 상기 제2 사이토카인 수용체의 상기 제2 세포내 도메인의 C-말단은 상기 제2 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합되는 변형된 면역 세포.

청구항 57

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 사이토카인 수용체의 상기 제1 세포내 도메인의 N-말단은 상기 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합되고, 및/또는 상기 제2 사이토카인 수용체의 상기 제2 세포내 도메인의 N-말단은 상기 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합되는 변형된 면역 세포.

청구항 58

상기 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 및 선택적으로 상기 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산을 전구체 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는 제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 따른 변형된 면역 세포를 생성하는

방법.

청구항 59

제58항에 있어서,

상기 전구체 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, NK세포, NK-T세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서,

상기 전구체 면역 세포는 조작된 수용체를 포함하는 방법.

청구항 61

제58항 또는 제59항에 있어서,

조작된 수용체를 코딩하는 제3 핵산을 상기 전구체 면역 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서,

상기 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 변형된 T세포 수용체(TCR) 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체인 방법.

청구항 63

제58항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 핵산, 상기 제2 핵산 및/또는 상기 제3 핵산은 동일한 벡터 상에 있는 방법.

청구항 64

제63항에 있어서,

상기 벡터는 바이러스 벡터인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 66

제58항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 핵산, 상기 제2 핵산 및/또는 상기 제3 핵산을 포함하는 면역 세포를 분리하거나 농축하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 67

제58항 내지 제66항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생성되는 변형된 면역 세포.

청구항 68

제1항 내지 제57항 및 제67항에 따른 변형된 면역 세포, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 69

개체에게 유효량의 제68항에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 개체의 질환을 치료하는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서,

상기 질환은 암인 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서,

상기 개체는 인간인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 8월 18일에 출원된 국제출원번호 PCT/CN2021/113239, 2021년 9월 30일에 제출된 국제출원번호 PCT/CN2021/122129, 2021년 11월 25일에 제출된 국제출원번호 PCT/CN2021/133061 및 2022년 8월 15일에 제출된 국제출원번호 PCT/CN2022/112578의 우선권을 주장하고, 그 내용은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일로 제출된 서열목록

[0004] 이하 ASCII 텍스트 파일로 제출된 내용은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 컴퓨터 판독 가능 형식(CRF)의 서열목록(파일명: P11234-PCT.220817.Sequence listing.xml, 기록일: 2022년 8월 17일, 크기: 117 KB).

[0005] 기술분야

[0006] 본 출원은 TLR 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포, 및 이를 사용하여 암과 같은 질환 또는 병증을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포는 면역 응답을 유발하는 조작된 T 세포 수용체를 생성하도록 변형된 세포이다. 예를 들어, CAR-T 세포는 암세포를 보다 효과적으로 인식하여 암 요법을 개선하는데 사용될 수 있도록 설계될 수 있다. CAR-T 요법의 성공에도 불구하고, 이러한 방법에는 종종 좋지 않은 체내 T세포 확장 및 고갈 문제가 존재함으로써, 혈액 악성 종양(예를 들어, 급성 골수성 백혈병)을 앓고 있는 환자가 임상에서 완화되는 지속성이 감소된다. 매우 효과적인 세포 기반 암 면역 요법은 여전히 필요하다.

[0008] NKG2D는 C형 렉틴 유사 수용체의 NKG2 패밀리에 속하는 막횡단 단백질이다. 인간의 경우, 이는 NK세포, γδ T 세포 및 CD8+ αβ T세포에 의해 발현된다. NKG2D 리간드는 정상 세포 표면에 완전히 존재하지 않거나 낮은 수준으로만 존재하는 MIC 및 RAET1/ULBP 패밀리의 유도성 자가 단백질이지만, 이들은 감염되고, 형질전환되며, 노화되고 스트레스를 받은 세포에 의해 과발현된다(Zingoni, A et al., 2018, Front Immunol. 9:476).

[0009] Toll 유사 수용체(TLR)는 침입 병원체를 감지하고 선천적 및 적응성 면역 응답을 활성화하는 패턴 인식 수용체이다. TLR은 T세포 상의 효과적인 공동 자극 분자로서, 활성화된 T세포(예를 들어, 기억 CD4+ 및 CD8+ T 세포)의 세포 표면에서 발현된다. 따라서, T세포 상의 TLR의 활성화는 T세포 수용체(TCR) 신호에 의해 유도된 T세포 활성화, 기능 및 생존을 직접적으로 향상시킨다(Gelman, AE et al., 2004, 172(10): 6065-6073). 면역 체계에서의 이들의 중요한 역할을 감안하여, TLR 활성화는 면역 응답을 향상시키는데 사용되어 왔다. 반대로, TLR 활성화 억제제는 자가 면역 및 기타 원치 않는 면역 응답을 감소시킬 수 있다(Lu, H, 2014, Front. in Immunol. 5:83). 연구에 따르면, CAR을 발현하는 T세포와 같은 조작된 면역 세포는 toll/인터루킨-1(IL-1) 수용체(TIR) 도메인으로 무장하여, 향상된 항종양 활성을 제공할 수 있다. 예를 들어 Manavalan, B et al., 2011, Front. Physiol. 2:41을 참조한다.

[0010] 분 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 개시된 특허 출원의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다.

발명의 내용

[0011] 본 출원은 TLR 수용체를 발현하는 변형된 면역 세포, 및 이를 사용하여 암과 같은 질환 또는 병증을 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0012] 본 출원의 일 양태는, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하고, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하는 변형된 면역 세포를 제공한다.

[0013] 변형된 면역 세포에 따른 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 동일하다.

[0014] 본 출원의 다른 양태는, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 상기 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되는, 변형된 면역 세포에 따른 변형된 면역 세포를 제공한다.

[0015] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 막횡단 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR4로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 막횡단 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR6으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래된다.

[0016] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, scFv 또는 sdAb는 CD33, CLL1, CD123, CD19, CD20, CD22, BCMA, GPRC5D 및 GPC3에 특이적으로 결합한다.

[0017] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 표적 분자는 면역 체크포인트 단백질이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 PD-1, CD70, CD27, SIRPα 및 TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0018] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 표적 분자는 면역 세포에서 발현되는 천연 단백질이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 돌연변이된 NKG2D이다. 일부 실시예에서, 돌연변이된 NKG2D는 절단된 서열 및/또는 아미노산 치환, 돌연변이, 첨가 및/또는 결실을 포함한다.

[0019] 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D의 세포외 항원 결합 도메인이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D의 전장 서열이다.

[0020] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 NK세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 변형된 T세포 수용체(TCR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다.

[0021] 본 출원의 다른 양태는, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적

으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하는, 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 변형된 면역 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CD19, CLL1, BCMA 및 GPC3 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0022] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산을 포함한다.

[0023] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일하고, 변형된 면역 세포는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산을 포함한다.

[0024] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 코딩하는 제3 핵산을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 제2 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 제2 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 제3 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산, 제2 핵산 및 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0025] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD20의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 BCMA의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 GPRC5D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다.

[0026] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 세포내 도메인 및 제2 세포내 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 세포내 도메인 및 제2 세포내 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체는 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체는 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인 및 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 C-말단은 제1 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 C-말단은 제2 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 C-말단은 제1 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합되고; 또한, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 C-말단은 제2 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합되고; 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다.

[0027] 본 출원의 일 양태는, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 및 선택적으로 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산을 전구체 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는 변형된 면역 세포를 생성하는 방법을 제공한다.

[0028] 상기 생성 방법 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, NK세포, NK-T세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 조작된 수용체를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 생성 방법은 조작된 수용체를 코딩하는 제3 핵산을 전구체 면역 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 변형된 T세포 수용체(TCR) 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다.

[0029] 상기 생성 방법 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 제1 핵산, 제2 핵산 및/또는 제3 핵산은 동일한 벡터 상에 있다. 일부 실시예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 상기 생성 방법 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 상기 방법은 제1 핵산, 제2 핵산 및/또는 제3 핵산을 포함하는 면역 세포를 분리하거나 농축하는 단계를 추가로 포함한다.

[0031] 상기 생성 방법 중 어느 하나에 따른 방법에 의해 생성되는 변형된 면역 세포를 더 제공한다.

[0032] 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 변형된 면역 세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 더 제공한다.

[0033] 본 출원의 다른 양태는 개체에게 유효량의 상기 약학 조성물 중 어느 하나에 따른 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 개체의 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 질환은 암이다. 일부 실시예에서, 상기 개체는 인간이다.

[0034] 이러한 변형된 면역 세포 중 어느 하나를 포함하는 조성물, 용도, 키트(테스트 키트) 및 제품을 더 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 항CD19-CAR 및 항CD20 TLR 폴리펩티드(CD19-공동CD20 CAR; SEQ ID NO: 1)를 포함하는 CAR 융합 작제물의 바이시스트론 발현 설계를 나타낸다. N-말단으로부터 C-말단까지, CAR 백본의 서열은 이하의 패턴에 부합되는 것으로, 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD19 scFv(SEQ ID NO: 6), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)이고, 이는 유도성 공동 자극 분자에 연결되며, 상기 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD20 scFv(SEQ ID NO: 11), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)(SEQ ID NO: 13)을 포함하고, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통과한다.

도 2는 TLR4로 무장한 CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 세포독성 효과를 나타낸다. 특히, 도 2는 CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR T세포가 체외에서 투여량 의존적 방식으로 Raji 표적 세포 용해를 유도하는 것을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, "unT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 3은 Raji 표적 세포와 공동 배양한, TLR4로 무장한 CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 IFNγ 사이토카인 절편을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, "unT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 4는 Raji 표적 세포와 공동 배양한, TLR4로 무장한 CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 TNFα 사이토카인 절편을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, "unT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 5는 Raji 표적 세포를 사용한 반복적인 종양 자극 분석에서, TLR4로 무장한 CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 사멸 효능을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, "UNT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 6은 Raji 표적 세포와 함께 인큐베이션한 후, TLR4로 무장한 CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 증식(예를 들어, 증폭 배수)을 나타낸다.

도 7은 항CLL1-CAR 및 항CD33 TLR 폴리펩티드(CLL1-공동CD33 CAR; SEQ ID NO: 3 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T; SEQ ID NO: 71)를 포함하는 CAR 융합 작제물의 바이시스트론 발현 설계를 나타낸다.

도 8은 TLR2 및 TLR1로 무장한 CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T세포 및 TLR4로 무장한 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포의 체외 세포독성 효과를 나타낸다. 특히, 도 8은 CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포가 체외에서 투여량 의존적 방식으로 U937 표적 세포 용해를 유도하는 것을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, "unT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 9는 U937 표적 세포와 공동 배양한, TLR2 및 TLR1로 무장한 CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T세포 및 TLR4로 무장한 CLL1-공동CD33-2 CAR-T의 체외 IFNγ 사이토카인 절편을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, "unT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 10은 U937 표적 세포와 공동 배양한, TLR2 및 TLR1로 무장한 CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T세포 및

TLR4로 무장한 CLL1-공동CD33-2 CAR-T의 체외 TNFα사이토카인 절편을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, “unT”)는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 11은 U937 표적 세포를 사용한 반복적인 종양 자극 분석에서, TLR2 및 TLR1로 무장한 CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T세포 및 TLR4로 무장한 CLL1-공동CD33-2 CAR-T의 체외 사멸 효능을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, “UNT”)는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 12는 U937 표적 세포와 함께 인큐베이션한 후, TLR2 및 TLR1로 무장한 CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T세포 및 TLR4로 무장한 CLL1-공동CD33-2 CAR-T의 체외 증식(예를 들어, 증폭 배수)을 나타낸다.

도 13은 U937-Luc 이종이식 마우스 모델에서, 예시적인 CLL1-공동CD33 CAR αβT 및 CLL1-공동CD33 CAR γδT 치료의 체내 효능 연구의 모식도를 나타낸다.

도 14는 U937-Luc 이종이식 마우스 모델에서, CLL1-공동CD33 CAR αβT세포의 체내 효능을 나타낸다.

도 15는 U937-Luc 이종이식 마우스 모델에서, CLL1-공동CD33 CAR γδT세포 및 CLL1-공동CD33-2 CAR γδT세포의 체내 효능을 나타낸다.

도 16a 내지 도 16b는 NKG2D 또는 돌연변이된 NKG2D TLR키메라 수용체로 무장한 CAR 또는 TCR의 예시적인 작제물을 나타낸다. 도 16a는 NKG2D 또는 돌연변이된 NKG2D TLR키메라 수용체로 무장한 CAR의 모식도를 나타낸다. 도 16b는 NKG2D 또는 돌연변이된 NKG2D TLR키메라 수용체로 무장한 TCR의 모식도를 나타낸다.

도 17a 내지 도 17b는 키메라 수용체로 무장한 CAR 또는 TCR의 예시적인 작제물을 나타내고, 상기 키메라 수용체는 NKG2D 리간드를 표적화하는 결합 도메인, TLR 막횡단 도메인 및 세포내 이펙터 도메인을 포함한다. 도 17a는 키메라 수용체로 무장한 CAR의 모식도를 나타내고, 상기 키메라 수용체는 NKG2D 리간드를 표적화하는 결합 도메인, TLR 막횡단 도메인 및 세포내 이펙터 도메인을 포함한다. 도 17b는 키메라 수용체로 무장한 TCR의 모식도를 나타내고, 상기 키메라 수용체는 NKG2D 리간드를 표적화하는 결합 도메인, TLR 막횡단 도메인 및 세포내 이펙터 도메인을 포함한다.

도 18a 내지 도 18b는 NKG2D 또는 돌연변이된 NKG2D TLR4 키메라 수용체로 무장한 CAR 또는 TCR의 예시적인 작제물을 나타낸다. 도 18a는 NKG2D 또는 돌연변이된 NKG2D TLR4 키메라 수용체로 무장한 2세대 CAR을 나타낸다. 도 18b는 NKG2D 또는 돌연변이된 NKG2D TLR4 키메라 수용체로 무장한 TCR을 나타낸다.

도 19는 Huh7 표적 세포를 사용한 반복적인 종양 자극 분석에서, NKG2D-TLR4 또는 NKG2D-CD8-TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR-T 및 항GPC3 CAR-T세포의 체외 사멸 효능을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, “UNT”)는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 20은 Huh7 표적 세포와 함께 인큐베이션한 후, NKG2D-TLR4 또는 NKG2D-CD8-TLR4 키메라 수용체로 무장한 항-GPC3 CAR-T 및 항-GPC3 CAR-T세포의 체외 증식을 나타낸다.

도 21은 Huh7 표적 세포와 공동 배양한, NKG2D-TLR4 또는 NKG2D-CD8-TLR4 키메라 수용체로 무장한 항-GPC3 CAR-T 및 항-GPC3 CAR-T세포의 체외 IFNγ사이토카인 절편을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, “UNT”)는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 22는 Raji 표적 표적 세포를 사용한 반복적인 종양 자극 분석에서, NKG2D-TLR4 또는 NKG2D-CD8-TLR4 키메라 수용체로 무장한 항CD19 CAR-T 및 항CD19 CAR-T세포의 체외 사멸 효능을 나타낸다. 형질도입되지 않은 T세포(즉, “UNT”)는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 23은 Raji 표적 세포와 함께 인큐베이션한 후, NKG2D-TLR4 또는 NKG2D-CD8-TLR4 키메라 수용체로 무장한 항CD19 CAR-T 및 항CD19 CAR-T세포의 체외 증식을 나타낸다.

도 24는 Huh7 이종이식 모델에서, NKG2D-CD8-TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR-T세포 및 항GPC3 CAR-T세포의 체내 효능을 나타낸다.

도 25는 CAR 융합 작제물의 바이시스트론 발현 설계를 나타내고, 상기 CAR 융합 작제물은 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 61) 또는 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 62), 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD8 CAR(SEQ ID NO: 63), 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR(SEQ ID NO: 64), 및 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR(SEQ ID NO: 65), 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR(SEQ ID NO: 72), 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD28 CAR(SEQ ID NO: 73)을 포함한다.

도 26은 TLR4 세포내 신호 전달로 무장한 항BCMA-CAR-γδT 및 항BCMA-공동 항BCMA-γδT세포의 체외 세포독성 작용을 나타낸다. 형질도입되지 않은 γδT세포(즉, "Un-γδT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 27은 BCMA 양성 NCI-H929 표적 종양 세포와 공동 배양한, TLR4 세포내 신호 전달로 무장한 항BCMA- CAR-γδT 및 항BCMA-공동 항BCMA-γδT세포의 체외 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF 사이토카인 분비를 나타낸다. 형질도입되지 않은 γδT세포(즉, "Un-γδT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 28은 BCMA 양성 NCI-H929 표적 종양 세포를 사용한 반복적인 종양 자극 분석에서, 직렬 항BCMA-CAR-γδT, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA-CAR γδT, 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR γδT, 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD8 CAR γδT, 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR γδT, 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D- CAR γδT 및 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR-γδT세포의 체외 사멸 효능 및 지속성을 나타낸다. 형질도입되지 않은 γδT세포(즉, "Un-γδT")는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 29는 TLR4 세포내 신호 전달로 무장한 직렬 항BCMA-CAR-γδT 및 직렬 항BCMA-공동 항BCMA-γδT세포가 동종이계 환경에서의 지속성을 나타내고, 여기서 γδT세포, 동종이계 PBMC 및 BCMA 양성 NCI-H929 표적 종양 세포는 1 : 60 : 1의 비율로 공동 인큐베이션한다.

도 30은 BCMA 양성 RPMI-8226 종양 보유 이종이식 모델에서, TLR4 세포내 신호 전달로 무장된 직렬 항BCMA-CAR-γδT, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA-γδT세포 및 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8-γδT세포의 체내 사멸 효능 및 지속성을 나타낸다. 형질도입되지 않은 γδT세포(즉, "Un-γδT") 및 비히클 HBSS는 이 실험에서 대조로 사용된다.

도 31a 내지 도 31b는 BCMA 양성 RPMI-8226 종양 보유 이종이식 모델에서, TLR4 세포내 신호 전달로 무장한 직렬 항BCMA-CAR-γδT 및 직렬 항BCMA-공동 항BCMA-γδT세포의 체중 변화 및 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF 사이토카인 분비를 나타낸다. 형질도입되지 않은 γδT세포(즉, "Un-γδT") 및 비히클 HBSS는 이 실험에서 대조로 사용된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 출원은 Toll 유사 수용체(TLR) 공동 자극 분자(예를 들어, TLR 폴리펩티드)를 포함하는 변형된 면역 세포, 및 이를 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 제1 TLR 폴리펩티드 및 제2 TLR 폴리펩티드를 함유하는 TLR 기반 다량체를 포함하고, 상기 폴리펩티드를 발현하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, 이러한 변형된 면역 세포는 효과적이고 지속적인 종양 용해 활성과 개선된 고갈 특징을 갖는다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는, i) 제1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하고; 제2 TLR 폴리펩티드는, i) 제2 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함한다. 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 T세포이다.

[0037] 일부 실시예에서, 변형된 세포는 관심 표적 항원을 특이적으로 인식하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 추가로 발현한다. 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드는 CAR-T세포 증식을 증가하고 항종양 활성을 향상시킨다.

[0038] TLR 폴리펩티드 상의 TLR 신호 전달의 활성화는 표적 의존적이고, 이량체화 또는 다량체화 TLR 폴리펩티드 및 TLR 폴리펩티드가 대응하는 표적 분자에 결합된 후 TLR 신호 전달 모이어티의 형성에 의해 개시된다. 본 출원은 TLR 신호 전달 모이어티의 형성을 유도하기 위한 다양한 전략을 제공한다. 첫 번째 전략에서, 제1 폴리펩티드의 제1 표적 결합 도메인 및 제2 폴리펩티드의 제2 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 표적 결합 도메인이 이의 동족 표적 서브 유닛에 결합되는 경우, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 두 번째 전략에서, 제1 폴리펩티드의 제1 표적 결합 도메인 및 제2 폴리펩티드의 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합된다. 표적 결합 도메인이 이의 동족 표적 분자에 결합되는 경우, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 세 번째 전략에서, 면역 세포가 세포외 도메인을 함유하는 조작된 수용체를 포함하는 경우, 세포외 도메인 및 제1 또는 제2 표적 결합 도메인은 각각 동일한 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 측에 결합된다. 이론에 얽매이지 않고, 조작된 수용체의 세포외 도메인이 표적 분자에 결합되는 경우, 조작된 수용체 주위에 면역 시냅스가 형성되는 것으로 간주된다. 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일한 면역 시냅스에 동원되어, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서

로 결합되어, TLR 신호 전달 모이어티를 형성하는 것을 허용한다. 또 다른 전략에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 동일한 단량체성 표적 분자(예를 들어, 동일한 표적 부위에서)에 결합되고, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 표적 분자에 결합되어, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인이 서로 결합되도록 허용함으로써, TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다.

[0039] 따라서, 본 출원의 일 양태는, a) i) 제1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하는 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체, 변형된 T세포 수용체 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다.

[0040] 본 출원의 다른 양태는, a) i) 제1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하는 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 변형된 T세포 수용체 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다.

[0041] 본 출원의 다른 양태는, a) i) 제1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 단편), ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인, 및 c) 조작된 수용체(예를 들어, CAR)를 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하는 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0042] 이러한 변형된 면역 세포를 포함하는 조성물(예컨대 약학 조성물), 키트, 제품, 및 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포를 사용하여 질환 또는 병증(예를 들어, 암)을 치료하는 방법을 더 제공한다.

[0043] **I. 정의**

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같이, “치료(treatment 또는 treating)”는 유익하거나 원하는 결과(임상 결과 포함)를 얻기 위한 방법이다. 본 출원의 목적으로, 유익하거나 원하는 임상 결과는 질환으로 인한 하나 또는 복수의 증상 완화, 질환의 정도 감소, 질환의 안정화(예를 들어, 질환의 악화 예방 또는 지연), 질환의 확산(예를 들어, 전이)을 예방 또는 지연, 질환의 재발을 예방 또는 지연, 질환의 진행을 지연 또는 완화, 질환 상태 개선, 질환의 완화(부분적으로 또는 전제척으로) 제공, 질환 치료에 필요한 하나 또는 복수의 다른 약물의 조제량 감소, 질환의 진행 지연, 삶의 질 증가, 및/또는 생존 연장 중 하나 또는 복수를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. “치료”는 질환(예를 들어, 암)의 병리학적 결과를 감소시키는 것도 포함한다. 본 출원의 방법은 이러한 치료 측면 중 임의의 하나 또는 복수를 고려하였다.

[0045] 용어 “예방(prevent)” 및 “예방(prevented, preventing)”과 같은 유사한 단어는 질환 또는 병증(예를 들어, 암)의 재발 가능성을 예방, 억제 또는 감소시키는데 사용되는 방법을 나타낸다. 이는 질환 또는 병증의 재발을

지연시키거나 질환 또는 병증의 증상의 재발을 지연시키는 것도 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "예방(prevention)" 및 유사한 단어는 질환 또는 병증의 재발 전에 질환 또는 병증의 강도, 작용을 감소시키고, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것도 포함한다.

[0046] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 암의 발달을 "지연"시킨다는 것은 질환의 발달을 연기, 방해, 완화, 지체, 안정화 및/또는 늦추는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질환의 병력 및/또는 치료받는 개체에 따라 상이한 시간 길이를 가질 수 있다. 상기 방법을 사용하지 않는 것과 비교하여, 암의 발달을 "지연"시키는 방법은 주어진 시간 범위 내에서 질환 발달의 가능성을 감소시키거나 및/또는 주어진 시간 범위 내에서 질환의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는 일반적으로 통계학적으로 유의미한 수의 개체로 진행한 임상 연구를 기반으로 한다. 표준 방법을 사용하여 암의 발달을 검출할 수 있으며, 이러한 표준 방법은 컴퓨터 축 단층 촬영(CAT 스캔), 자기 공명 영상(MRI), 복부 초음파, 혈액 응고 검사, 동맥 조영술 또는 생검을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 발달은 또한 초기에 검출할 수 없을 수 있는 암의 진행을 의미할 수 있으며, 발생, 재발 및 발병을 포함한다.

[0047] 본 명세서에 사용된 용어 "유효량"은 특정 장애, 병증 또는 질환을 치료하는데, 예를 들어 이의 하나 또는 복수의 증상을 개선, 경감, 감소 및/또는 지연시키기에 충분한 약제 또는 약제 조합의 양을 의미한다. 암과 관련하여, 유효량은 종양 수축 및/또는 종양의 성장 속도를 감소(예컨대 종양 성장 억제)시키거나 다른 원하지 않은 세포 증식을 예방 또는 지연시키기에 충분한 양을 포함한다. 일부 실시예에서, 유효량은 질환의 진행을 지연시키기에 충분한 양이다. 일부 실시예에서, 유효량은 재발을 예방 또는 지연시키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 또는 여러 회의 투여로 투여될 수 있다. 약물 또는 조성물의 유효량은, (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 종양 크기를 감소시키며; (iii) 말초 기관으로의 암세포 침윤을 어느 정도 억제하고, 늦추며, 완화시키고 바람직하게는 방지하고; (iv) 종양 전이를 억제(즉, 어느 정도 늦추고 바람직하게는 방지)하며; (v) 종양 성장을 억제하고; (vi) 종양의 발생 및/또는 재발을 예방 또는 지연시키며; 및/또는 (vii) 암과 관련된 하나 또는 복수의 증상을 어느 정도 완화시킬 수 있다.

[0048] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "개체" 또는 "대상체"는 포유동물을 의미하고, 사람, 소, 말, 고양이, 개, 설치류 동물 또는 영장류 동물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 상기 개체는 인간이다.

[0049] "단리된" 핵산은 이의 천연 환경의 구성 성분으로부터 단리된 핵산 분자이다. 단리된 핵산은 일반적으로 핵산 분자를 함유하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하지만, 상기 핵산 분자는 염색체 외 또는 이의 천연 염색체 위치와 상이한 염색체 위치에 존재한다.

[0050] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"는 이와 연결된 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 상기 용어는 자가 복제 핵산 구조인 벡터, 및 벡터가 도입된 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터를 포함한다. 일부 벡터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본 명세서에서 "발현 벡터"로 지칭된다.

[0051] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 이종 핵산을 숙주 세포로 전달하거나 도입하는 과정을 의미한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 이종 핵산을 사용하여 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포이다. 상기 세포는 1차 대상 세포 및 그 자손을 포함한다.

[0052] 본 명세서에서 감정된 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은 서열(임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려)을 정렬한 후, 후보 서열에서 비교된 폴리펩티드의 아미노산 잔기와 동일한 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 목적으로, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign(DNASTAR) 또는 MUSCLE 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 본 분야의 기술의 다양한 방식으로 정렬을 달성할 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개 변수를 확정할 수 있고, 비교되는 서열의 전장 범위 내에서 최대 정렬을 해야 하는 임의의 알고리즘을 포함한다. 그러나, 본 명세서의 목적을 위해, 서열 정렬 컴퓨터 프로그램 MUSCLE을 사용하여 아미노산 서열 동일성 %값(Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* 5(1):113, 2004)을 생성할 수 있다.

[0053] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 하나 또는 복수의 항원을 T세포와 같은 세포에 특이적으로 이식하는 유전적으로 조작된 수용체를 의미한다. CAR은 "인공 T세포 수용체", "키메라 T세포 수용체" 또는 "키메라 면역 수용체"로도 지칭된다. 일부 실시예에서, CAR은 종양 항원에 특이적인 항체

의 세포외 가변 도메인 및 T세포 또는 다른 수용체의 세포내 신호 전달 도메인, 예컨대 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인을 포함한다. “CAR-T”는 CAR을 발현하는 T세포를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, “CLL1 CAR”은 CLL1을 특이적으로 인식하는 CAR을 의미하고, “CD19 CAR”은 CD19를 특이적으로 인식하는 CAR을 의미하며, “GPC3 CAR”은 GPC3를 특이적으로 인식하는 CAR을 의미하고, “BCMA CAR”은 BCMA를 특이적으로 인식하는 CAR을 의미한다.

[0054] 본 명세서에 사용된 바와 같이, “T세포 수용체” 또는 “TCR”은 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 내인성 또는 변형된 T세포 수용체를 의미하고, 상기 세포외 항원 결합 도메인은 MHC 분자에 결합된 특이적 항원 펩티드에 결합된다. 일부 실시예에서, TCR은 TCRα 폴리펩티드 사슬 및 TCRβ 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 일부 실시예에서, TCR은 TCRγ 폴리펩티드 사슬 및 TCRδ 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 일부 실시예에서, TCR은 종양 항원에 특이적으로 결합한다. “TCR-T”은 재조합 TCR을 발현하는 T세포를 의미한다.

[0055] 본 명세서에 사용된 바와 같이, “T세포 항원 커플러 수용체” 또는 “TAC 수용체”는 특이적 항원에 결합되는 세포외 항원 결합 도메인 및 T세포 수용체(TCR) 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 공동 수용체 분자의 세포내 도메인을 포함하는 조작된 수용체를 의미한다. TAC 수용체는 표적 세포에 대한 항원 특이적 T세포 응답을 유도하기 위해 TAC 수용체를 발현하는 T세포의 내인성 TCR을 지정한다.

[0056] 본 명세서에서 용어 “항체”는 가장 넓은 의미로 사용되고, 원하는 항원 결합 활성을 나타내는 한, 단일 클론 항체, 다중 클론 항체, 다중 특이적 항체(예를 들어, 이중 특이적 항체) 및 항체 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 항체 구조를 포함한다. 용어 항체는 Fv, 단일 사슬 Fv(scFv), Fab, Fab’ 및 $(Fab')_2$와 같은 항원에 결합될 수 있는 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 용어 항체는 통상적인 4개 사슬 항체 및 단일 도메인 항체, 예를 들어 V_HH와 같은 중쇄만 있는 항체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0057] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 “결합”, “특이적 결합” 또는 “……에 대해 특이적”은 예를 들어 타겟과 항체 사이의 결합과 같은 측정 가능하고 재현 가능한 상호 작용을 의미하고, 이는 이질적인 분자(생체 분자 포함) 집단이 존재 시 표적의 존재를 결정한다. 예를 들어, 결합 또는 특이적 결합 표적(에피토프일 수 있음)의 항체는 상기 타겟에 결합되는 항체이고, 친화력, 결합력(avidity), 준비성 및/또는 지속 시간은 다른 타겟과의 결합보다 우수하다. 일 실시예에서, 항체와 관련되지 않는 표적의 결합 정도는, 예를 들어 방사성면역측정법(RIA)에 의해 측정된 항체와 타겟의 결합보다 약 10% 적다. 일부 실시예에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 1 μM 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하 또는 0.1 nM 이하의 해리 상수(Kd)를 갖는다. 일부 실시예에서, 항체는 상이한 종으로부터의 단백질에 보존된 단백질 에피토프에 특이적으로 결합한다. 다른 실시예에서, 특이적 결합은 배타적 결합을 포함할 수 있지만 이를 요구하지는 않는다.

[0058] 용어 “세포”는 1차 표적 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0059] 본 명세서에 서술된 본 개시의 실시예는 “실시예로 구성되고” 및/또는 “실질적으로 실시예로 구성되는” 것을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0060] 본 명세서는 “약” 값 또는 파라미터에 대한 언급은 해당 값 또는 파라미터 자체에 대한 변형을 포함(및 설명)한다. 예를 들어, “약 X”에 관한 설명은 “X”의 설명을 포함한다.

[0061] 본 명세서에 사용된 바와 같이, “아님” 값 또는 파라미터에 대한 언급은 일반적으로 값 또는 파라미터와 “상이한” 것을 의미하고 설명한다. 예를 들어, 방법이 X형 암을 치료하는데 사용되지 않는 것은, 상기 방법은 X형과 상이한 암을 치료하는데 사용되는 것을 의미한다.

[0062] 본 명세서에 사용된 용어 “약 X-Y”는 “약 X 내지 약 Y”와 동일한 의미를 갖는다.

[0063] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 “하나/한 가지(a/an)” 및 “이러한/상기(the)”는 문맥에서 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다.

[0064] 명확성을 위하여, 독립적인 실시예의 맥락에서 설명된 본 개시의 특정 특징이 단일 실시예에서 조합되어 제공될 수도 있다는 점을 이해해야 한다. 반대로, 간결함을 위해, 단일 실시예의 맥락에서 설명된 본 개시의 상이한 특징은 별도로 또는 임의의 적합한 서브 조합으로 제공될 수도 있다. 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포 및 치료 방법에 관한 실시예의 모든 조합은 모두 본 출원에 명백하게 포함되고, 각각의 조합이 개별적이고 명백하게 개시된 것처럼 본 명세서에 개시된다. 또한, 이러한 변수를 설명하는 실시예에 나열된 변형된 면역 세포의 모든 서브 조합도 모두 본 출원에 명백하게 포함되고, 단백질의 각각의 이러한 서브 조합이 본 명세서에서 개별적이

고 명백하게 개시된 것처럼 본 명세서에 개시된다.

[0065] **II. 변형된 면역 세포**

[0066] 본 출원의 일 양태는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 변형된 면역 세포를 제공하며, 여기서 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드(예를 들어, TLR 공동 자극 폴리펩티드)를 코딩한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드가 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 및 제2 폴리펩티드의 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고, 여기서 TLR 신호 전달 모이어티는 TLR 신호 전달을 유도함으로써, 강한 항종양 효과를 나타낸다. 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0067] 일부 실시예에서, 상기 TLR 폴리펩티드를 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, 제1 및 제2 TLR 폴리펩티드를 포함하는 변형된 면역 세포는 증가된 T세포 수용체(TCR) 신호에 의해 유도된 T세포 활성화, 기능 및/또는 생존을 갖는다. 일부 실시예에서, 상기 TLR 폴리펩티드를 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 의해 증가된 종양 세포 사멸 효능을 유도한다. 일부 실시예에서, 상기 TLR 폴리펩티드를 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 증가된 종양 세포 사멸 효능을 유도하고, 예를 들어 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 12배, 14배, 16배, 20배, 25배, 30배, 40배 또는 그 이상 중 어느 하나로 증가한다. 일부 실시예에서, 상기 TLR 폴리펩티드를 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 대해 지속적인 효능을 부여하고, 예를 들어 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배 또는 그 이상 중 어느 하나로 증가한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드를 포함하는 변형된 면역 세포에 비해, 개체에 투여되는 경우, 변형된 면역 세포는 감소된 체내 독성을 갖는다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드를 포함하는 변형된 면역 세포에 비해, 개체에 투여되는 경우, 변형된 면역 세포는 체내 고갈을 감소시킨다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 공동 자극 분자이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0068] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 상이한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 상이한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 막횡단 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 막횡단 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 상기 하나 또는 복수의 TLR 분자는 TLR1, TLR2, TLR4 또는 TLR6과 같은 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 및 TLR9로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0069] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고, 그중 제1 TLR 막횡단 도메인, 제1 TLR 신호 전달 도메인, 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR4로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추

가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0070] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고; 그중 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되며, 그중 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래되거나, 그중 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래되고, 그중 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0071] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고; 여기서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR6으로부터 유래되고, 그중 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되거나, 그중 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되며, 그중 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR6으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0072] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 CD33, CLL1, CD123, CD19, CD20, CD22, BCMA, GPRC5D, NKG2D 또는 GPC3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드의 표적 분자는 면역 체크포인트 단백질이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드의 표적 분자는 PD-1, CD70, CD27, SIRPα 및 TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택된다. 상기 변형된 면역 세포 중 어느 하나에 따른 일부 실시예에서, 표적 분자는 면역 세포에서 발현되는 천연 단백질이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 돌연변이된 NKG2D이다. 일부 실시예에서, 돌연변이된 NKG2D는 절단된 서열 및/또는 아미노산 치환, 돌연변이, 첨가 및/또는 결실을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D의 세포외 항원 결합 도메인이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D의 전장 서열이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수

용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0073] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD20의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 BCMA의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 NKG2D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 GPRC5D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 NKG2D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CD19, CLL1, BCMA 또는 GPC3 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CAR, 예컨대 CD19 CAR, CLL1 CAR, GPC3 CAR 또는 BCMA CAR(예를 들어, 단일 BCMA CAR 또는 직렬 BCMA CAR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 조작된 TCR이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 TAC 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0074] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD20의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 BCMA의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 NKG2D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 GPRC5D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 NKG2D의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CD19, CLL1, GPC3 및 BCMA 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CAR, 예컨대 CD19 CAR, CLL1 CAR, GPC3 CAR 또는 BCMA CAR(예를 들어, 단일 BCMA CAR 또는 직렬 BCMA CAR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 조작된 TCR이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 TAC 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포,

자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0075] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합되며, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 NKG2D의 세포외 NKG2D결합 도메인이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 CD20에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 BCMA에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR2 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR1 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR1 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR2 신호 전달 도메인 및 제2 TLR1 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0077] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토

카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0078] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D 세포외 도메인(ECD), TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0080] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γ

δT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0081] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0082] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 그중 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0083] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 NKG2D의 세포외 NKG2D결합 도메인이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD20의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 BCMA에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 CD33에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CD19, CLL1, GPC3 및 BCMA 중 어느 하나

를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CAR, 예컨대 CD19 CAR, CLL1 CAR, GPC3 CAR 또는 BCMA CAR(예를 들어, 단일 BCMA CAR 또는 직렬 BCMA CAR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 조작된 TCR이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 TAC 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0084] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 NKG2D의 세포외 NKG2D결합 도메인이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 CD20에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 BCMA에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 CD33에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0085] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR2 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR1 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR1 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR2 신호 전달 도메인 및 제2 TLR1 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0086] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 폴리펩티

드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0087] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0088] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0089] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인

및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)를 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0090] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0091] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c)

조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드와 동일한 표적 분자(제2 폴리펩티드와 상이한 표적 분자)를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자(제1 폴리펩티드와 상이한 표적 분자)를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 CD20의 서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CD19, CLL1, GPC3 및 BCMA 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 CAR, 예컨대 CD19 CAR, CLL1 CAR, GPC3 CAR 또는 BCMA CAR이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 조작된 TCR이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 TAC 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드; 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 NKG2D의 세포외 NKG2D결합 도메인이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 CD20에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 scFv이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 BCMA에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 CD33에 특이적으로 결합하는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0094] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR2 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR1 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR1 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드; 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자

를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR2 신호 전달 도메인 및 제2 TLR1 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인은 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인은 CD33의 V서브 유닛을 특이적으로 인식하고, 제2 표적 결합 도메인은 CD33의 C2서브 유닛을 특이적으로 인식한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0095] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0096] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0097] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c)

조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0098] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0099] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0100] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포(예를 들어, T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인,

ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하며, 그중 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함하며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK 세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0101] 일부 실시예에서, CAR을 발현하는 면역 세포(예를 들어, CAR-T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이하다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, CAR은 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 CD19, CLL1, GPC3 및 BCMA 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인(예를 들어, 단일 BCMA CAR 또는 직렬 BCMA CAR)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT 세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0102] 일부 실시예에서, TCR을 발현하는 면역 세포(예를 들어, TCR-T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이하다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, TCR은 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TCR은 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TCR은 CD19, CLL1, GPC3

및 BCMA 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인(예를 들어, 단일 BCMA TCR 또는 직렬 BCMA TCR)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT 세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0103] 일부 실시예에서, TAC를 발현하는 면역 세포(예를 들어, TAC-T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 상이하다. 일부 실시예에서, 다량체 표적 분자의 서브 유닛은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, TAC는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TAC는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TAC는 CD19, CLL1, GPC3 및 BCMA 중 어느 하나를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인(예를 들어, 단일 BCMA TAC 또는 직렬 BCMA TAC)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT 세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0104] 일부 실시예에서, CAR을 발현하는 면역 세포(예를 들어, CAR-T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편), ii) 제1 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편), ii) 제2 TLR4 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR4 신호 전달 도메인 및 제2 TLR4 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR4 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR4 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 신호 펩티드(예를 들어, 리더 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항CD19 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항 CLL1 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3

ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 SEQ ID NO: 4와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 SEQ ID NO: 4를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR)을 발현한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 67과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 67을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포 항GPC3 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 SEQ ID NO: 56과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 SEQ ID NO: 56을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항CD20 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단

(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항GPC3 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단

(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0105] 일부 실시예에서, CAR을 발현하는 면역 세포(예를 들어, CAR-T세포)를 제공하며, a) i) 제1 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편), ii) TLR2 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인(예를 들어, 항체 모이어티 또는 이의 항원 결합 단편), ii) TLR1 막횡단 도메인, 및 iii) TLR1 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, TLR1 신호 전달 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드는 신호 펩티드(예를 들어, 리더 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 V도메인 sdAb, TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항 CLL1 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항CLL1/CD33 이중 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, 항CD33 V도메인sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 SEQ ID NO: 43과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 SEQ ID NO: 43을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 42와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 42를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인, TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포

내 부분), P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0106] ***면역 세포***

[0107] 변형된 면역 세포는 다양한 세포 유형과 세포 공급원으로부터 유래될 수 있다. 본 명세서는 마우스, 래트, 기니아 피그, 토끼, 개, 원숭이 및 인간을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 포유동물 종으로부터 유래되는 세포를 고려한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 인간 세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 수용자 개체와 동종이계이다(즉, 동일한 종이지만, 상이한 공여자로부터 유래됨). 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 자가 유래이다(즉, 공여자 및 수용자는 동일함). 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 동종유전자이다(즉, 공여자 및 수용자는 상이한 개체이지만, 일란성 쌍둥이임).

[0108] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 1차 세포로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 개체로부터 단리된 1차 세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 개체로부터 단리된 1차 세포로부터 증식(예를 들어 증식 및/또는 분화)된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 조혈 계통의 세포이다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 흉선으로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 림프 또는 림프절(예를 들어 종양 배수 림프절)로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 비장으로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 골수로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 말초 혈액과 같은 혈액으로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 말초 혈액 단핵구(PBMC)이다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 혈장으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 종양으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 점막 면역 체계로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 1차 세포는 생검 샘플로부터 획득된다.

[0109] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포주로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 상업용 세포주로부터 획득된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 개체로부터 단리된 1차 세포로부터 구축된 세포주이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포주로부터 증식(예를 들어 증식 및/또는 분화)된다. 일부 실시예에서, 세포주는 비불멸(mortal) 세포주이다. 일부 실시예에서, 세포주는 불멸화 세포주이다. 일부 실시예에서, 세포주는 백혈병 또는 림프종 세포주와 같은 종양 세포주이다. 일부 실시예에서, 세포주는 PBMC로부터 유래된 세포주이다. 일부 실시예에서, 세포주는 줄기 세포주이다. 일부 실시예에서, 세포주는 HEK293-6E세포, NK-92세포 및 Jurkat세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0110] 본 출원에 사용될 수 있는 예시적인 면역 세포는 수지상 세포(미성숙 수지상 세포 및 성숙한 수지상 세포 포함), T림프구(예컨대 초기 T세포, 이펙터 T세포, 기억 T세포, 세포독성 T림프구, T헬퍼 세포, 자연 살해T세포, Treg세포, 종양 침윤 림프구(TIL) 및 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포), B세포, 자연 살해(NK) 세포, 단핵구 세포, 대식세포, 호중구, 과립구, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 면역 세포 하위 집단은 본 분야에 공지된 하나 또는 복수의 세포 표면 마커(예를 들어, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD11c, CD123, CD56, CD34, CD14, CD33 등)의 존재 또는 부재에 의해 정의될 수 있다. 약학 조성물이 복수의 변형된 면역 세포를 포함하는 경우, 이러한 변형된 면역 세포는 면역 세포 유형의 특정 하위 집단, 면역 세포 유형의 하위 집단의 조합, 또는 두 가지 또는 그 이상의 면역 세포 유형의 조합일 수 있다. 일부 실시예에서, 면역 세포는 동질 세포 집단에 존재한다. 일부 실시예에서, 면역 세포는 면역 세포에서 향상된 이종 세포 집단에 존재한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 림프구이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 림프구가 아니다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 입양 면역 요법에 적용된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 PBMC이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 PBMC로부터 유래된 면역 세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 T세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 $CD4^+$ T세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 $CD8^+$ T세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 B세포이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 NK세포이다.

[0111] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 전능성 줄기 세포이다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 만능 줄기 세포이다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 단능성 줄기 세포이다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 전구 세포이다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부

실시예에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 일부 실시예에서, 줄기 세포는 유도 만능 줄기 세포(iPSC)이다.

[0112] 변형된 면역 세포는 임의의 수(예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 1000 또는 그 이상 중 어느 하나)의 이종 핵산 서열(제1 및 제2 핵산 서열 포함)을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 단일 카피의 제1 및/또는 제2 이종 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 다중 카피의 제1 및/또는 제2 이종 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 적어도 하나의 별도의 이종 핵산 서열, 예를 들어, 사이토카인, 케모카인 및/또는 면역 체크포인트 억제제와 같은 면역 조절제를 코딩하는 이종 핵산 서열을 더 포함한다.

[0113] 본 명세서에 기재된 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열을 포함하는 하나 또는 복수의 핵산을 변형된 면역 세포에 일시적으로 또는 안정적으로 통합할 수 있다. 일부 실시예에서, 하나 또는 복수의 핵산은 변형된 면역 세포에서 일시적으로 발현된다. 예를 들어, 하나 또는 복수의 핵산은 염색체외 배열의 형태로 변형된 면역 세포의 세포핵에 존재할 수 있다. 본 분야에 공지된 임의의 형질감염 또는 형질도입 방법(바이러스 또는 비바이러스 방법)을 사용하여, 하나 또는 복수의 핵산을 변형된 면역 세포에 도입할 수 있다. 예시적은 비바이러스성 형질감염 방법은 인산칼슘, 덴드리머, 리포솜, 또는 양이온성 중합체(예를 들어, DEAE-덱스트란 또는 폴리에틸렌이민)를 사용하는 것과 같은 화학 기반 형질감염; 전기천공, 세포 압출, 초음파천공, 광학적 형질감염, 펀치 형질감염, 원형질체 융합, 유체역학적 전달 또는 트랜스포존과 같은 비화학적 방법; 유전자총 사용, 자기 형질감염 또는 자석 보조 형질감염, 입자 충격과 같은 입자 기반 방법; 및 뉴클레오펙션과 같은 혼합 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0114] 일부 실시예에서, 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열이 변형된 면역 세포의 게놈에 존재한다. 예를 들어, 본 분야에 공지된 임의의 방법으로 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열을 포함하는 하나 또는 복수의 핵산을 변형된 면역 세포의 게놈에 통합할 수 있고, 이러한 방법은 바이러스 매개 통합, 무작위 통합, 상동 재조합 방법 및 부위별 통합 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 예를 들어 부위 특이적 재조합 효소 또는 통합 효소, 트랜스포사제, 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN®), CRISPR/Cas9 및 아연 핑거 뉴클레아제를 사용한다. 일부 실시예에서, 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열을 변형된 면역 세포 게놈의 특정 설계된 유전자좌에 통합한다. 일부 실시예에서, 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열을 변형된 면역 세포 게놈의 통합 핫스팟에 통합한다. 일부 실시예에서, 이종 핵산(서열)을 변형된 면역 세포 게놈의 무작위 유전자좌에 통합한다. 단일 변형된 면역 세포에 다중 카피의 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열이 존재하는 경우, 이종 핵산 서열을 변형된 면역 세포 게놈의 복수의 유전자좌에 통합할 수 있다.

[0115] ***TLR 폴리펩티드***

[0116] 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포는 Toll 유사 수용체(TLR) 폴리펩티드(예를 들어, 제1 TLR 폴리펩티드 및 제2 TLR 폴리펩티드; 본 명세서에서 각각 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드라고도 지칭)를 발현한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 적어도 하나의 TLR 폴리펩티드를 발현한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 두 가지 TLR 폴리펩티드를 발현한다. 본 출원은 TLR 폴리펩티드 및 이의 조성물을 더 제공한다. 일부 실시예에서, 본 명세서에서 제공하는 TLR 폴리펩티드는 항원 자극 후 TLR 신호 전달을 유도하여 강한 공동 자극 항종양 효과를 제공한다.

[0117] TLR 폴리펩티드는 TLR 분자로부터 유래된다. TLR은 I형 막횡단 당단백질로서, 리간드 인식을 매개하는 역할을 하는 류신이 풍부한 반복 서열(LRR)을 포함하는 세포외 도메인의 존재를 특징으로 한다. 세포외 도메인 뒤에는 단일 막횡단 나선과 세포내 Toll 유사/인터루킨-1(IL-1) 수용체(TIR) 도메인이다. 일부 실시예에서, TIR 도메인은 다운스트림 신호 전달(예를 들어, TLR 신호 전달 유도)을 담당한다. TLR의 도메인 및 기능은 본 분야에 공지된 것이다. 예를 들어, Jin et al., 2008 29(2):182-91을 참조한다.

[0118] 일부 실시예에서, 이러한 TLR 분자는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR2로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR6으로부터 유래된다.

[0119] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때 이량체화되고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인이 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하도록 한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 동종이량체(예

를 들어, 두 개의 동일한 TLR 분자의 이량체화)를 형성한다. 동종이량체는 TLR3, TLR4, TLR5 또는 TLR9로부터 유래된 TLR 폴리펩티드로 형성될 수 있다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 TLR 폴리펩티드는 각각 TLR3 막횡단 도메인 및 TLR3신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 TLR 폴리펩티드는 각각 TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 TLR 폴리펩티드는 각각 TLR5 막횡단 도메인 및 TLR5 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 및 제2 TLR 폴리펩티드는 각각 TLR9막횡단 도메인 및 TLR9신호 전달 도메인을 포함한다.

[0120] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 이종이량체(예를 들어, 두 가지 상이한 TLR 폴리펩티드의 이량체화)를 형성한다. 이종이량체는 TLR1/TLR2, TLR1/TLR4, TLR2/TLR6, TLR2/TLR10 또는 TLR4/TLR5로부터 유래된 TLR 폴리펩티드로 형성될 수 있다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하거나; 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하거나; 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR6 막횡단 도메인 및 TLR6 신호 전달 도메인을 포함하거나; 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR6 막횡단 도메인 및 TLR6 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR10 막횡단 도메인 및 TLR10 신호 전달 도메인을 포함하거나; 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR10 막횡단 도메인 및 TLR10 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR5 막횡단 도메인 및 TLR5 신호 전달 도메인을 포함하거나; 제1 TLR 폴리펩티드는 TLR5 막횡단 도메인 및 TLR5 신호 전달 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0121] 예시적인 TLR 분자는 표 1에 나열되어 있다.

[0122] 표 1. 예시적인 Toll 유사 수용체 서열.

[0123]

명칭	UniProt ID	NCBI GeneID	아미노산 서열 (막횡단 도메인은 이중 밑줄이 그어져 있고; TIR 도메인은 밑줄이 그어져 있음)	SEQ ID NO.
TLR1	Q15399	7096	MTSIFHFAIIFMLILQIRIQLSEESEFLVDRSKNGLIHVPKDLSQK TTILNISQNYISELWTSDILSLSKLRILIISHNRIQYLDISVFKFN QELEYLDLSHNKLVKISCHPTVNLKHLDLSFNAFDALPICKEFGNM SQLKFLGLSTTHLEKSSVLPIAHLNISKVLLVLGETYGEKEDPEGL	30

			QDFNTESLHIVFPTNKEFHFILDVSVKTVANLELSNIKCVLEDNKC SYFLSILAKLQTNPKLSNLTLNNIETTWNSFIRILQLVWHTTVWYF SISNVKLQGQLDFRDFDYSGTSLKALSIHQVVSDVFGFPQSYIYEI FSNMNIKNFTVSGTRMVHMLCPSKISFFLHLDFSNNLLTDTVFENC GHLTELETLILQMNQLKELSKIAEMTTQMKSLQQLDISQNSVSYDE KKGDCSWTKSLLSLNMSSNILTDTIFRCLPPRIKVLDLHSNKIKSI PKQVVKLEALQELNVAFNSLTDLPGCGSFSSLSVLIIDHNSVSHPS ADFFQSCQKMRSIKAGDNPFQCTCELGEFVKNIDQVSSEVLEGWPD SYKCDYPESYRGTLLKDFHMSELSCNITLLIVTIVATMLVLAVTVT SLCSYLDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYS GHDSFWVKNELLPNLEKEGMQICLHERNFVPGKSIVENIITCIEKS YKSIFVLSPNFVQSEWCHYELYFAHHNLFHEGSNSLILILLEPIPQ YSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKRGLFWANLRAAINIKLTE QAKK	
TLR2	O60603	7097	MPHTLWMVWVLGVIISLSKEESSNQASLSCDRNGICKGSSGSLNSI PSGLTEAVKSLDLSNNRITYISNSDLQRCVNLQALVLTSNGINTIE EDSFSSLGSLEHLDLSYNYLSNLSSSWFKPLSSLTFLNLLGNPYKT LGETSLFSHLTKLQILRVGNMDTFTKIQRKDFAGLTFLEELEIDAS DLQSYEPKSLKSIQNVSHLILHMKQHILLLEIFVDVTSSVECLELR DTDLDTFHFSELSTGETNSLIKKFTFRNVKITDESLFQVMKLLNQI	31

[0124]

			SGLLELEFDDCTLNGVGNFRASDNDRVIDPGKVETLTIRRLHIPRF YLFYDLSTLYSLTERVKRITVENSKVFLVPCLLSQHLKSLEYLDLS ENLMVEEYLKNSACEDAWPSLQTLILRQNHLASLEKTGETLLTLKN LTNIDISKNSFHSMPETCQWPEKMKYLNLSSTRIHSVTGCIPKTLE ILDVSNNNLNLFSLNLPQLKELYISRNKLMTLPDASLLPMLLVLKI SRNAITTFSKEQLDSFHTLKTLEAGGNNFICSCEFLSFTQEQQALA KVLIDWPANYLCDSPSHVRGQQVQDVRLSVSECHRTALVSGMCCAL FLLILLTGVLCHRFHGLWYMKMMWAWLQAKRKPRKAPSRNICYDAF VSYSERDAYWVENLMVQELENFNPPFKLCLHKRDFIPGKWIIDNII DSIEKSHKTVFVLSENFVKSEWCKYELDFSHFRLFDENNDAAILIL LEPIEKKAIPQRFCKLRKIMNTKTYLEWPMDEAQREGFWVNLRAAI KS	
TLR3	O15455	7098	MRQTLPCIYFWGGLLPFGMLCASSTTKCTVSHEVADCSHLKLTQVP DDLPTNITVLNLTHNQLRRLPAANFTRYSQLTSLDVGFNTISKLEP ELCQKLPMLKVLNLQHNELSQLSDKTFAFCTNLTELHLMSNSIQKI KNNPFVKQKNLITLDLSHNGLSSTKLGTQVQLENLQELLLSNNKIQ ALKSEELDIFANSSLKKLELSSNQIKEFSPGCFHAIGRLFGLFLNN VQLGPSLTEKLCLELANTSIRNLSLSNSQLSTTSNTTFLGLKWTNL TMLDLSYNNLNVVGNDSFAWLPQLEYFFLEYNNIQHLFSHSLHGLF NVRYLNLKRSFTKQSISLASLPKIDDFSFQWLKCLEHLNMEDNDIP	32

[0125]

			GIKSNMFTGLINLKYLSLSNSFTSLRTLTNETFVSLAHSPLHILNL TKNKISKIESDAFSWLGHLEVLDLGLNEIGQELTGQEWRGLENIFE IYLSYNKYLQLTRNSFALVPSLQRLMLRRVALKNVDSSPSPFQPLR NLTILDLSNNNIANINDDMLEGLEKLEILDLQHNNLARLWKHANPG GPIYFLKGLSHLHILNLESNGFDEIPVEVFKDLFELKIIDLGLNNL NTLPASVFNNQVSLKSLNLQKNLITSVEKKVFGPAFRNLTELDMRF NPFDCTCESIAWFVNWINETHTNIPELSSHYLCNTPPHYHGFPVRL FDTSSCKDSAPFELFFMINTSILLIFIFIVLLIHFEGWRISFYWNV SVHRVLGFKEIDRQTEQFEYAAYIIHAYKDKDWVWEHFSSMEKEDQ SLKFCLEERDFEAGVFELEAIVNSIKRSRKIIFVITHHLLKDPLCK RFKVHHAVQQAIEQNLDSIILVFLEEIPDYKLNHALCLRRGMFKSH CILNWPVQKERIGAFRHKLQVALGSK NSVH	
TLR4	000206	7099	MMSASRLAGTLIPAMAFLSCVRPESWEPCVEVVPNITYQCMELNFY KIPDNLPFSTKNLDLSFNPLRHLGSYSFFSFPELQVLDLSRCEIQT IEDGAYQSLSHLSTLILTGNPIQSLALGAFSGLSSLQKLVAVETNL ASLENFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSFKLPEYFSNLTNLEHLDLSS NKIQSIYCTDLRVLHQMPLLNLSLDLSLNPMNFIQPGAFKEIRLHK LTLRNNFDSLNVMKTCIQGLAGLEVHRLVLGEFRNEGNLEKFDKSA LEGLCNLTIEEFRLAYLDYYLDDIIDLFNCLTNVSSFSLVSVTIER	33

[0126]

			VKDFSYNFGWQHLELVNCKFGQFPTLKLKSLKRLTFTSNKGGNAFS EVDLPSLEFLDLSRNGLSFKGCCSQSDFGTTSLKYLDLSFNGVITM SSNFLG LEQLEHLDFQHSNLKQMSEFSVFLSLRNLIYLDISHTHTRVAFNGI FNGLSSLEVLKMAGNSFQENFLPDIFTELRNLTFLDLSQCQLEQLS PTAFNSLSSLQVLNMSHNNFFSLDTFPYKCLNSLQVLDYSLNHIMT SKKQELQHFPSSLAFLNLTQNDFACTCEHQSFLQWIKDQRQLLVEV ERMECATPSDKQGMPVLSLNITCQMNKTIIGVSVLSVLVVSVVAVL VYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNL EEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFI QSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRL LSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQ EATSI	
TLR5	060602	7100	MGDHLDLLLGVVLMAGPVFGIPSCSFDGRIAFYRFCNLTQVPQVLN TTERLLLSFNYIRTVTASSFPFLEQLQLLELGSQYTPLTIDKEAFR NLPNLRILDLGSSKIYFLHPDAFQGLFHLFELRLYFCGLSDAVLKD GYFRNLKALTRLDLSKNQIRSLYLHPSFGKLNSLKSIDFSSNQIFL VCEHELEPLQGKTLSFFSLAANSLYSRVSVDWGKCMNPFRNMVLEI LDVSGNGWTVDITGNFSNAISKSQAFSLILAHHIMGAGFGFHNIKD PDQNTFAGLARSSVRHLDLSHGFVFSLNSRVFETLKDLKVLNLAYN	34

[0127]

			KINKIADEAFYGLDNLQVLNLSYNLLGELYSSNFYGLPKVAYIDLQ KNHIAIIQDQTFKFLEKLQTLDLRDNALTTIHFIPSIPDIFLSGNK LVTLPKINLTANLIHLSENRLENLDILYFLLRVPHLQILILNQNRF SSCSGDQTPSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELCWDVFEGLSHLQV LYLNHNYLNSLPPGVFSHLTALRGLSLNSNRLTVLSHNDLPANLEI LDISRNQLLAPNPDVFVSLSVLDITHNKFICECELSTFINWLNHTN VTIAGPPADIYCVYPDSFSGVSLFSLSTEGCDEEEVLKSLKFSLFI VCTVTLTLFLMTILTVTKFRGFCFICYKTAQRLVFKDHPQGTEPDM YKYDAYLCFSSKDFTWVQNALLKHLDTQYSDQNRFNLCFEERDFVP GENRIANIQDAIWNSRKIVCLVSRHFLRDGWCLEAFSYAQGRCLSD LNSALIMVVVGSLSQYQLMKHQSIRGFVQKQQYLRWPEDFQDVGWF LHKLSQQILKKEKEKKKDNNIPLQTVATIS	
TLR6	Q9Y2C9	10333	MTKDKEPIVKSFHFVCLMIIIVGTRIQFSDGNEFAVDKSKRGLIHV PKDLPLKTKVLDMSQNYIAELQVSDMSFLSELTVLRLSHNRIQLLD LSVFKFNQDLEYLDLSHNQLQKISCHPIVSFRHLDLSFNDFKALPI CKEFGNLSQLNFLGLSAMKLQKLDLLPIAHLHLSYILLDLRNYYIK ENETESLQILNAKTLHLVFHPTSLFAIQVNISVNTLGCLQLTNIKL NDDNCQVFIKFLSELTRGSTLLNFTLNHIETTWKCLVRVFQFLWPK PVEYLNIYNLTIIESIREEDFTYSKTTLKALTIEHITNQVFLFSQT ALYTVFSEMNIMMLTISDTPFIHMLCPHAPSTFKFLNFTQNVFTDS	35

[0128]

			IFEKCSTLVKLETLILQKNGLKDLFKVGLMTKDMPSLEILDVSWNS LESGRHKENCTWVESIVVLNLSSNMLTDSVFRCLPPRIKVLDLHSN KIKSVPKQVVKLEALQELNVAFNSLTDLPGCGSFSSLSVLIIDHNS VSHPSADFFQSCQKMRSIKAGDNPFQCTCELREFVKNIDQVSSEVL EGWPDSYKCDYPESYRGSPLKDFHMSELSCNITLLIVTIGATMLVL AVTVTSLCIYLDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHA FISYSEHDSAWVKSELVPYLEKEDIQICLHERNFVPGKSIVENIIN CIEKSYKSIFVLSPNFVQSEWCHYELYFAHHNLFHEGSNNLILILL EPIPQNSIPNKYHKLKALMTQRTYLQWPKEKSKRGLFWANIRAAFN MKLTLVTENNDVKS	
TLR7	QONYK1	51284	MVFPMWTLKRQILILFNIILISKLLGARWFPKTLPCDVTLDVPKNH VIVDCTDKHLTEIPGGIPTNTTNLTLTINHIPDISPASFHRLDHLV EIDFRCNCVPIPLGSKNNMCIKRLQIKPRSFSGLTYLKSLYLDGNQ LLEIPQGLPPSLQLLSLEANNIFSIRKENLTELANIEILYLGQNCY YRNPCYVSYSIEKDAFLNLTKLKVLSLKDNNVTAVPTVLPSTLTEL YLYNNMIAKIQEDDFNNLNQLQILDLSGNCPRCYNAPFPCAPCKNN SPLQIPVNAFDALTELKVLRLHSNSLQHVPPRWFKNINKLQELDLS QNFLAKEIGDAKFLHFLPSLIQLDLSFNFELQVYRASMNLSQAFSS LKSLKILRIRGYVFKELKSFNLSPLHNLQNLEVLDLGTNFIKIANL SMFKQFKRLKVIDLSVNKISPSGDSSEVGFCSNARTSVESYEPQVL	36

[0129]

			EQLHYFRYDKYARSCRFKNKEASFMSVNESCYKYGQTLDLSKNSIF FVKSSDFQHLSFLKCLNLSGNLISQTLNGSEFQPLAELRYLDFSNN RLDLLHSTAFEELHKLEVLDISSNSHYFQSEGITHMLNFTKNLKVL QKLMMNDNDISSSTSRTMESESLRTLEFRGNHLDVLWREGDNRYLQ LFKNLLKLEELDISKNSLSFLPSGVFDGMPPNLKNLSLAKNGLKSF SWKKLQCLKNLETLDLSHNQLTTVPERLSNCSRSLKNLILKNNQIR SLTKYFLQDAFQLRYLDLSSNKIQMIQKTSFPENVLNNLKMLLLHH NRFLCTCDAVWFVWWVNHTEVTIPYLATDVTCVGPGAHKGQSVISL DLYTCELDLTNLILFSLSISVSLFLMVMMTASHLYFWDVWYIYHFC KAKIKGYQRLISPDCCYDAFIVYDTKDPAVTEWVLAELVAKLEDPR EKHFNLCLEERDWLPGQPVLENLSQSIQLSKKTVFVMTDKYAKTEN FKIAFYLSHQRLMDEKVDVIILIFLEKPFQKSKFLQLRKRLCGSSV LEWPTNPQAHPYFWQCLKNALATDNHVAYSQVFKETV	
TLR8	Q9NR97	51311	VGKYVTELDLSDNFITHITNESFQGLQNLTKINLNHNPNVQHQNGN PGIQSNGLNITDGAFLNLKNLRELLLEDNQLPQIPSGLPESLTELS LIQNNIYNITKEGISRLINLKNLYLAWNCYFNKVCEKTNIEDGVFE TLTNLELLSLSFNSLSHVPPKLPSSLRKLFLSNTQIKYISEEDFKG LINLTLLDLSGNCPRCFNAPFPCVPCDGGASINIDRFAFQNLTQLR YLNLSSTSLRKINAAWFKNMPHLKVLDLEFNYLVGEIASGAFLTML PRLEILDLSFNYIKGSYPQHINISRNFSKLLSLRALHLRGYVFQEL	37

[0130]

			REDDFQPLMQLPNLSTINLGINFIKQIDFKLFQNFSNLEIIYLSEN RISPLVKDTRQSYANSSSFQRHIRKRRSTDFEFDPHSNFYHFTRPL IKPQCAAYGKALDLSLNSIFFIGPNQFENLPDIACLNLSANSNAQV LSGTEFSAIPHVKYLDLTNNRLDFDNASALTELSDLEVLDLSYNSH YFRIAGVTHHLEFIQNFTNLKVLNLSHNNIYTLTDKYNLESKSLVE LVFSGNRLDILWNDDDNRYISIFKGLKNLTRLDLSLNRLKHIPNEA FLNLPASLTELHINDNMLKFFNWTLLQQFPRLELLDLRGNKLLFLT DSLSDFTSSLRTLLLSHNRISHLPSGFLSEVSSLKHLDLSSNLLKT INKSALETKTTTKLSMLELHGNPFECTCDIGDFRRWMDEHLNVKIP RLVDVICASPGDQRGKSIVSLELTTCVSDVTAVILFFFTFFITTMV MLAALAHHLFYWDVWFIYNVCLAKVKGYRSLSTSQTFYDAYISYDT KDASVTDWVINELRYHLEESRDKNVLLCLEERDWDPGLAIIDNLMQ SINQSKKTVFVLTKKYAKSWNFKTAF YLALQRLMDENMDVIIFILLEPVLQHSQYLRLRQRICKSSILQWPD NPKAEGLFWQTLRNVVLTENDSRYNNMYVDSIKQY	
TLR9	Q9NR96	54106	MGFCRSALHPLSLLVQAIMLAMTLALGTLPAFLPCELQPHGLVNCN WLFLKSVPHFSMAAPRGNVTSLSLSSNRIHHLHDSDFAHLPSLRHL NLKWNCPPVGLSPMHFPCHMTIEPSTFLAVPTLEELNLSYNNIMTV PALPKSLISLSLSHTNILMLDSASLAGLHALRFLFMDGNCYYKNPC RQALEVAPGALLGLGNLTHLSLKYNNLTVVPRNLPSSLEYLLLSYN	38

[0131]

			RIVKLAPEDLANLTALRVLDVGGNCRRCDHAPNPCMECPRHFPQLH PDTFSHLSRLEGLVLKDSSLSWLNASWFRGLGNLRVLDLSENFLYK CITKTKAFQGLTQLRKLNLSFNYQKRVSFAHLSLAPSFGSLVALKE LDMHGIFFRSLDETTLRPLARLPMLQTLRLQMNFINQAQLGIFRAF PGLRYVDLSDNRISGASELTATMGEADGGEKVWLQPGDLAPAPVDT PSSEDFRPNCSTLNFTLDLSRNNLVTVQPEMFAQLSHLQCLRLSHN CISQAVNGSQFLPLTGLQVLDLSHNKLDLYHEHSFTELPRLEALDL SYNSQPFGMQGVGHNFSFVAHLRTLRHLSLAHNNIHSQVSQQLCST SLRALDFSGNALGHMWAEGDLYLHFFQGLSGLIWLDLSQNRLHTLL PQTLRNLPKSLQVLRLRDNYLAFFKWWSLHFLPKLEVLDLAGNQLK ALTNGSLPAGTRLRRLDVSCNSISFVAPGFFSKAKELRELNLSANA LKTVDHSWFGPLASALQILDVSANPLHCACGAAFMDFLLEVQAAVP GLPSRVKCGSPGQLQGLSIFAQDLRLCLDEALSWDCFALSLLAVAL GLGVPMLHHLCGWDLWYCFHLCLAWLPWRGRQSGRDEDALPYDAFV VFDKTQSAVADWVYNELRGQLEECRGRWALRLCLEERDWLPGKTLF ENLWASVYGSRKTLFVLAHTDRVSGLLRASFLLAQQRLLEDRKDVV VLVILSPDGRRSRYVRLRQRLCRQSVLLWPHQPSGQRSFWAQLGMA LTRDNHHFYNRNFCQGPTAE	
TLR10	Q9BXR5	81793	MRLIRNIYIFCSIVMTAEGDAPELPEERELMTNCSNMSLRKVPADL TPATTTLDLSYNLLFQLQSSDFHSVSKLRVLILCHNRIQQLDLKTF	39

[0132]

			EFNKELRYLDLSNNRLKSVTWYLLAGLRYLDLSFNDFDTMPICEEA GNMSHLEILGLSGAKIQKSDFQKIAHLHLNTVFLGFRTLPHYEEGS LPILNTTKLHIVLPMDTNFWVLLRDGIKTSKILEMTNIDGKSQFVS YEMQRNLSLENAKTSVLLLNKVDLLWDDLFLILQFVWHTSVEHFQI RNVTFGGKAYLDHNSFDYSNTVMRTIKLEHVHFRVFYIQQDKIYLL LTKMDIENLTISNAQMPHMLFPNYPTKFQYLNFANNILTDELFKRT IQLPHLKTLILNGNKLETLSLVSCFANNTPLEHLDLSQNLLQHKND ENCSWPETVVNMNLSYNKLSDSVFRCLPKSIQILDLNNNQIQTVPK ETIHLMALRELNIAFNFLTDLPGCSHFSRLSVLNIEMNFILSPSLD FVQSCQEVKTLNAGRNPFRCTCELKNFIQLETYSEVMMVGWSDSYT CEYPLNLRGTRLKDVHLHELSCNTALLIVTIVVIMLVLGLAVAFCC LHFDLPWYLRMLGQCTQTWHRVRKTTQEQLKRNVRFHAFISYSEHD SLWVKNELIPNLEKEDGSILICLYESYFDPGKSISENIVSFIEKSY KSIFVLSPNFVQNEWCHYEFYFAHHNLFHENSDHIILILLEPIPFY CIPTRYHKLKALLEKKAYLEWPKDRRKCGLFWANLRAAINVNVLAT REMYELQTFTELNEESRGSTISLMRTDCL	

[0133]

[0134] 일부 실시예에서, 상기 TLR 수용체 도메인을 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 의해 표적 세포에 대한 세포독성의 증가를 유도하고, 예를 들어 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 2배, 4배, 6배 또는 그 이상 중 어느 하나만큼 증가한다. 일부 실시예에서, 상기 TLR 수용체 도메인을 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 수용체 도메인은 변형된 면역 세포에 의해 표적 세포에 대한 세포독성의 증가를 유도하고, 예를 들어 약 6배, 4배, 2배, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 이하 중 어느 하나 이하만큼 증가한다. 일부 실시예에서, 락테이트 탈수소 효소(LDH) 세포독성 측정 및/또는 표적 종양 세포와의 공동배양 측정에 의해 세포독성을 측정한다. 일부 실시예에서, 세포 기반 측정에서 세포독성 및 종양 세포 사멸 능력을 측정한다. 일부 실시예에서, 체내에서 세포독성 및 종양 세포 사멸 능력을 측정한다.

[0135] 일부 실시예에서, 상기 TLR 수용체 도메인을 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 의해 염증성 사이토카인의 분비 수준의 감소를 유도하고, 예를 들어 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 2배, 4배, 6배, 8배, 10배, 12배, 14배, 16배, 18배, 20배, 30배, 50배, 100배, 200배, 500배, 1000배 또는 그 이상 중 어느 하나만큼 감소된다. 일부 실시예에서, 상기 TLR 폴리펩티드를 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 의해 염증성 사이토카인의 분비 수준의 감소를 유도하고, 예를 들어 약 1000배, 500배, 200배, 100배, 50배, 30배, 20배, 18배, 16배, 14배, 12배, 10배, 8배, 6배, 4배, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 이하 중 어느 하나 이하만큼 감소된다. 일부 실시예에서, 상기 TLR 폴리펩티드를 포함하지 않는 변형된 면역 세포에 비해, TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 의해 염증성 사이토카인의 분비 수준의 감소를 유도하고, 예를 들어 약 10%-50%, 2-1000배, 2-50배, 50-100배, 100-1000배, 50-500배, 10-100배, 10-50배 또는 50-200배 중 어느 하나만큼 감소된다. 예시적인 염증성 사이토카인은 예를 들어 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 혈청 면역 측정(예컨대 효소

결합 면역 흡착 측정(ELISA), 화학 발광 면역 측정(CIA) 또는 유세포 분석)에서 염증성 사이토카인의 분비 수준을 측정한다. 일부 실시예에서, 세포 기반 측정에서 염증성 사이토카인의 분비 수준을 측정한다. 일부 실시예에서, 체내에서 염증성 사이토카인의 분비 수준을 측정한다.

[0136] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 공동 자극 분자이다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 공동 자극 분자는 유도성 공동 자극 분자이고, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다.

[0137] 일부 실시예에서, 유도성 공동 자극 분자는 자가 절단 펩티드(예컨대 P2A)를 통해 조작된 수용체(예를 들어, 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나)에 연결된다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 공동 자극 분자이고, TLR 막횡단 도메인 및 TLR 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 신호 전달 도메인은 세포내 신호 전달 도메인과 같은 세포내 도메인이다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 (a) 표적 결합 도메인, (b) 막횡단 도메인; 및 (c) 신호 전달 도메인(예를 들어, 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 선택적으로, TLR 폴리펩티드는 신호 전달 펩티드를 추가로 포함한다.

[0138] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR 신호 전달 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 융합된 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 표적 결합 도메인(예를 들어, 제1 표적 결합 도메인 및/또는 제2 표적 결합 도메인)에 직접적으로 또는 간접적으로 융합된 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 표적 결합 도메인 및 TLR 신호 전달 도메인 모두에 직접적으로 또는 간접적으로 융합된 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR 분자로부터 유래된 TLR 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 분자는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10으로부터 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, TLR 막횡단 도메인은 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TLR 막횡단 도메인은 TLR2로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TLR 막횡단 도메인은 TLR4로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TLR 막횡단 도메인은 TLR6으로부터 유래된다.

[0139] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 표적 결합 도메인, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 제2 표적 결합 도메인, 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0140] 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제1 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10으로 이루어진 군으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1, TLR2, TLR4 및 TLR6으로 이루어진 군으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR4로부터 유래된다.

[0141] 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일한 TLR 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10으로 이루어진 군으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1, TLR2, TLR4 및 TLR6으로 이루어진 군으로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제2 TLR 막횡단 도메인 및/또는 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래된다.

[0142] 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 막횡단 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인은 TLR1로부터 유래되고, 제2 TLR 막횡단 도메인은 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인은 TLR2로부터 유래되고, 제2 TLR 막횡단 도메인은 TLR2로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인은 TLR4로부터 유래되고, 제2 TLR 막횡단 도메인은 TLR4로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인은 TLR6으로부터 유래되고, 제2 TLR 막횡단 도메인은 TLR6으로부터 유래된다.

[0143] 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래되고, 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되고, 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR4로부터 유래되고, 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR4로부터 유

래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR6으로부터 유래되고, 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR6으로부터 유래된다.

[0144] 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인 및 제2 TLR 막횡단 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인은 TLR2로부터 유래되고, 제2 TLR 막횡단 도메인은 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되고, 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 막횡단 도메인은 TLR2로부터 유래되고, 제1 TLR 신호 전달 도메인은 TLR2로부터 유래되며, 제2 TLR 막횡단 도메인은 TLR1로부터 유래되고, 제2 TLR 신호 전달 도메인은 TLR1로부터 유래된다.

[0145] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 수용체 또는 리간드로부터 유래되지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ로부터 유래되지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ가 아니다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ 세포외 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 TGFβ의 세포외 TGFβ 결합 도메인(예를 들어, TGFβR1 및/또는 TGFβR2)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 TGFβR1의 세포외 TGFβ 결합 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 TGFβR2의 세포외 TGFβ 결합 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 세포외 TGFβ 결합 도메인이 아니다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 TGFβR2의 세포외 TGFβ 결합 도메인이 아니다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 TGFβR1의 세포외 TGFβ 결합 도메인이 아니다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드(예를 들어, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드)는 WO 2018/094244 A1에 설명된 키메라 TGFβ 수용체CTBR 신호 변환기가 아니고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다.

[0146] 일부 실시예에서, 본 명세서에 제공된 변형된 면역 세포는 제1 및 제2 TLR 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 TLR 폴리펩티드는 제1 표적 결합 도메인을 포함하고, 제2 TLR 폴리펩티드는 제2 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 상이하다.

[0147] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드의 표적 결합 도메인은 scFv, Fv, Fab, $(Fab')_2$, 단일 도메인 항체(sdAb), 또는 V_HH도메인과 같은 항체 또는 항체 단편이다. 일부 실시예에서, 상기 폴리펩티드는 표적 분자의 수용체의 리간드 또는 세포외 부분이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 종양 항원이다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드의 표적 결합 도메인은 단일 종양 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 종양 항원은 CD19, BCMA, NY-ESO-1, VEGFR2, MAGE-A3, CD20, CD22, CD33, CLL1, CD38, CEA, EGFR(예컨대 EGFRvIII), GD2, HER2, IGF1R, 메조텔린, PSMA, ROR1, WT1, 및 임상적으로 중요한 기타 종양 항원, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 NKG2D, GPRC5D, BCMA, NY-ESO-1, VEGFR2, MAGE-A3, AFP, CD4, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD70, CD123, CEA, EGFR(예컨대 EGFRvIII), GD2, GPC-2, GPC3, CLDN18.2, HER2, LILRB4, IL-13Rα2, IGF1R, 메조텔린, PSMA, ROR1, WT1, NKG2D, CLL1, TGFaRII, TGFbRII, CCR5, CXCR4, CCR4, HPV 관련 항원 및 EBV 관련 항원(예를 들어, LMP1 또는 LMP2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 표적 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 CD33, CLL1, CD123, CD19, CD20, CD22, BCMA, NKG2D, GPRC5D 또는 GPC3에 특이적으로 결합한다.

[0148] 일부 실시예에서, 표적 분자는 면역 체크포인트 단백질이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 PD-1, CD70, CD27, SIRPα 및 TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0149] 일부 실시예에서, 표적 분자는 면역 세포에서 발현되는 천연 단백질이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 돌연변이된 NKG2D이다. 일부 실시예에서, 돌연변이된 NKG2D는 절단된 서열 및/또는 아미노산 치환, 돌연변이, 첨가 및/또는 결실을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D의 세포외 항원 결합 도메인(본 명세서에서는 "NKG2D ECD"라고도 지칭)이다. 일부 실시예에서, 표적 분자는 NKG2D의 전장 서열이다. 일부 실시예에서, NKG2D는 SEQ ID NO: 54와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 54를 포함한다. 일부 실시예에서, NKG2D는 NKG2D의 ECD 전장 서열의 위치 81-216의 아미노산(SEQ ID NO: 54)을 포함한다. 일부 실시예에서, NKG2D는 SEQ ID NO: 51과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한

다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 51을 포함한다. 일부 실시예에서, NKG2D는 NKG2D의 ECD전장 서열의 위치 89-216의 아미노산(SEQ ID NO: 54)을 포함한다. 일부 실시예에서, NKG2D는 SEQ ID NO: 52와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 52를 포함한다. 일부 실시예에서, NKG2D는 NKG2D의 ECD전장 서열의 위치 98-216의 아미노산(SEQ ID NO: 54)을 포함한다. 일부 실시예에서, NKG2D는 SEQ ID NO: 53과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 53을 포함한다.

[0150] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR 폴리펩티드를 세포(예를 들어, ER)의 분비 경로에 표적화하고, TLR 폴리펩티드가 숙주 세포의 지질 이중층에 통합되어 고정되도록 허용하는 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드에 적용되고 천연적으로 존재하는 단백질의 신호 서열 또는 합성된, 비천연적으로 존재하는 신호 서열을 포함하는 신호 펩티드는 당업자에게 자명한 것이다. 일부 실시예에서, 신호 펩티드는 CD8α, GM-CSF수용체α, IL-3, 및 IgG1중쇄로 이루어진 군으로부터 선택된 분자로부터 유래된다. 일부 실시예에서, 신호 펩티드는 CD8α로부터 유래된다.

[0151] TLR 폴리펩티드는 상이한 도메인 사이에 위치하는 하나 또는 복수의 펩티드 링커를 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 결합 도메인 및 TLR 막횡단 도메인 및/또는 TLR 막횡단 도메인 및 TLR 신호 전달 도메인은 펩티드 결합을 통하거나 펩티드 링커를 통해 서로 융합될 수 있다. 상이한 도메인을 연결하는 펩티드 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 각각의 펩티드 링커는 개별적으로 최적화될 수 있다. 펩티드 링커는 임의의 적합한 길이를 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 펩티드 링커의 길이는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50개 또는 그 이상의 아미노산 중 어느 하나이다. 일부 실시예에서, 펩티드 링커의 길이는 약 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5개 또는 그 이하의 아미노산 중 어느 하나 이하이다. 일부 실시예에서, 펩티드 링커의 길이는 약 1개의 아미노산 내지 약 10개의 아미노산, 약 1개의 아미노산 내지 약 20개의 아미노산, 약 1개의 아미노산 내지 약 30개의 아미노산, 약 5개의 아미노산 내지 약 15개의 아미노산, 약 10개의 아미노산 내지 약 25개의 아미노산, 약 5개의 아미노산 내지 약 30개의 아미노산, 약 10개의 아미노산 내지 약 30개의 아미노산 길이, 약 30개의 아미노산 내지 약 50개의 아미노산, 또는 약 1개의 아미노산 내지 약 50개의 아미노산 중 어느 하나이다.

[0152] 펩티드 링커는 자연 발생 서열 또는 비-자연 발생 서열을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 펩티드 링커는 유연한 링커이다. 예시적인 유연한 링커는 글리신 중합체$(G)_n$, 글리신-세린 중합체(예를 들어 $(GS)_n$(SEQ ID NO: 27), $(GSGGS)_n$(SEQ ID NO: 28) 및 $(GGGS)_n$(SEQ ID NO: 29)를 포함하고, 여기서 n은 적어도 1의 정수), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 본 분야에 공지된 다른 유연한 링커를 포함한다. 일부 실시예에서, 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 25 또는 26의 아미노산 서열을 갖는다.

[0153] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR6 막횡단 도메인 및 TLR6 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 신호 펩티드(예를 들어, 리더 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다.

[0154] 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 표적 결합 도메인은 NKG2D, CD33, CLL1, CD123, CD19, CD20, CD22, BCMA, GPRC5D 또는 GPC3에 특이적으로 결합하는 scFv 또는 sdAb이다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 CD33에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 CD33의 V도메인에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR2 막횡단 도메인, 유래된 TLR2 신호 전달 도메인 및 CD33의 V도메인에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 CD33의 C2도메인에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR1 막횡단 도메인, 유래

된 TLR1 신호 전달 도메인 및 CD33의 C2도메인에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 CD20에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인, 유래된 TLR4 신호 전달 도메인 및 CD20에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 CD33에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인, 유래된 TLR4 신호 전달 도메인 및 CD33에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 NKG2D에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인, 유래된 TLR4 신호 전달 도메인 및 NKG2D에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 BCMA에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인, 유래된 TLR4 신호 전달 도메인 및 BCMA에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 동일한 TLR 분자로부터 유래된 막횡단 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 TLR 폴리펩티드는 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 TLR4 막횡단 도메인, 유래된 TLR4 신호 전달 도메인 및 GPRC5D에 특이적으로 결합하는 표적 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 신호 펩티드(예를 들어, 리더 서열)를 추가로 포함한다.

[0155] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 하나 또는 복수의 사이토카인 수용체의 두 개 또는 그 이상의 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체의 세포내 도메인의 C-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체의 세포내 도메인의 C-말단은 TLR 도메인의 N-말단에 직접 융합된다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체의 세포내 도메인의 C-말단은 링커(예를 들어, 유연한 펩티드 링커를 통해) 또는 다른 도메인을 통해 진행되는 것과 같이 TLR 도메인의 N-말단에 간접적으로 융합된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 i) 표적 결합 도메인, ii) 사이토카인 수용체의 세포내 도메인, iii) TLR 막횡단 도메인, 및 iv) TLR 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0156] 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체의 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체의 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단은 직접 융합된다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체의 세포내 도메인의 N-말단은 링커(예를 들어, 유연한 펩티드 링커를 통해) 또는 다른 도메인을 통해 진행되는 것과 같이 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 간접적으로 융합된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 i) 표적 결합 도메인, ii) TLR 막횡단 도메인, iii) TLR 신호 전달 도메인, 및 iv) 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 포함한다.

[0157] 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체 유래 세포내 도메인은 하나 또는 복수의 TLR 폴리펩티드에 개선된 TLR 신호 전달(예를 들어, 항종양 효과)을 부여한다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체 유래 세포내 도메인은 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 사이토카인 수용체 유래 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다.

[0158] 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포는 제1 TLR 폴리펩티드 및 제2 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 TLR 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인 및 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인은 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인 및 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인은 상이하다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체는 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체는 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체 및 제2 사이토카인 수용체는 각각 GM-CSF 수용체, IL-18 수용체, IL-21 수용체, IL-15 수용체 및 IL-23 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인은 면역 수용체 티

로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인 및 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 C-말단은 제1 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 C-말단은 제2 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 C-말단은 제1 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합되고; 또한, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 C-말단은 제2 TLR 신호 전달 도메인의 N-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 사이토카인 수용체의 제1 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합되고; 제2 사이토카인 수용체의 제2 세포내 도메인의 N-말단은 TLR 신호 전달 도메인의 C-말단에 융합된다.

[0159] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 포함된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR분자 및 항CD20 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항CD19 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0160] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR분자 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항CD19 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작

제물은 SEQ ID NO: 59와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0161] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항GPC3 CAR분자 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포 항GPC3 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 SEQ ID NO: 56과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 SEQ ID NO: 56을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0162] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 포함된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR분자 및 항CD33 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항 CLL1 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8

α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0163] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR분자(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 67과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 67을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61과 적어도 약

85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR분자(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0164] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항 CLL1 CAR을 발현한다. 일부

실시예에서, 항CLL1 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 SEQ ID NO: 4와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 SEQ ID NO: 4를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 항CLL1/CD33 이중 CAR을 발현한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, 항CD33 V도메인sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 SEQ ID NO: 43과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 SEQ ID NO: 43을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 42와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 42를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 V도메인 sdAb, TLR2 막횡단 도메인, TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분), P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드 코딩 서열에는 추정된 업스트림 시작 코돈의 일부 또는 전부 서열이 결여된다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 특정 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있고, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인 사이에 TLR 신호 전달 모이어티의 결합을 형성하는 것에 영향을 미치지 않음으로써, TLR 신호 전달의 유도에 영향을 미치지 않는다.

[0165] 본 명세서에 기재된 TLR 도메인(예를 들어, TLR 막횡단 도메인 및/또는 TLR 신호 전달 도메인) 중 어느 하나의 변이체도 본 개시의 범위 내에 있어, TLR 도메인이 면역 세포의 면역 응답을 조절할 수 있도록 한다. 일부 실시예에서, 야생형 대조군에 비해, 공동 자극 신호 전달 도메인은 최대 10개의 아미노산 잔기 변이(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 8개)를 포함한다. 하나 또는 복수의 아미노산 변화를 포함하는 이러한 TLR 도메인은 변이체로 지칭될 수 있다. 돌연변이를 포함하지 않는 공동 자극 신호 전달 도메인에 비해, TLR 신호 전달 도메인의 아미노산 잔기의 돌연변이는 신호 형질도입의 증가 및 면역 응답에 대한 향상된 자극을 초래할 수 있다. 돌연변이를 포함하지 않는 공동 자극 신호 전달 도메인에 비해, TLR 신호 전달 도메인의 아미노산 잔기의 돌연변이는 신호 형질도입의 감소 및 면역 응답에 대한 감소된 자극을 초래할 수 있다.

[0166] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 TLR 도메인(예를 들어, TLR 막횡단 도메인 및/또는 TLR 신호 전달 도메인)의 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드는 본 명세서에 기재된 TLR 분자(예를 들어, TLR 분자의 TLR 막횡단 도메인 및/또는 TLR 신호 전달 도메인)의 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 예를 들어, TLR 폴리펩티드의 생물학적 특성을 조절하는 것이 바람직할 수 있다. TLR 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변형을 도입하거나 펩티드 합성을 통해 이의 TLR 분자(예컨대 이의 TLR 분자의 막횡단 도메인 및/또는 신호 전달 도메인)의 아미노산 서열 변이체를 제조할 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, TLR 분자의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 작제물이 TLR 결합 및/또는 전염증성 활성과 같은 원하는 특징을 갖는다면 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 통해 최종 작제물을 얻을 수 있다.

[0167] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 TLR 분자 중 어느 하나의 서열에 비해, TLR 분자는 하나 또는 복수(예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20개의 아미노산 또는 그 이상)의 보존적 치환을 포함한다. 일부 실시예에서, TLR 분자는 본 명세서에 기재된 TLR 분자 중 어느 하나의 서열은 적어도 약 80% 서열 동일성을 갖고, 예를 들어 적어도 약 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성

중 어느 하나를 갖는다. 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드와 마찬가지로, 변현된 TLR 분자를 포함하는 TLR 폴리펩티드 변이체는 유사한 항종양 활성 및 낮은 독성을 갖는다.

[0168] 보존적 치환은 아래 표 A에 나타낸다.

[0169] **표 A: 보존적 치환**

초기 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu

[0170]

Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu(L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0171]

[0172] 아미노산은 일반적인 측쇄 특성에 따라 상이한 범주로 나눌 수 있다.

[0173] a. 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0174] b. 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0175] c. 산성: Asp, Glu;

[0176] d. 알칼리성: His, Lys, Arg;

[0177] e. 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0178] f. 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0179] 비보존적 치환은 이러한 클래스 중 하나의 구성원을 다른 구성원으로 교환해야 한다.

[0180] 당업자는 돌연변이 유발, 중합효소 연쇄 반응, 상동 재조합 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 유전 공학 기

술을 포함하는 임의의 적합한 방법을 사용하여 목적 유전자에 돌연변이를 발생할 수 있음을 인식할 것이다. 돌연변이는 단일 뉴클레오티드(예컨대 DNA 서열 내 단일 뉴클레오티드 염기의 제거, 첨가 또는 치환을 포함하는 점 돌연변이)를 포함할 수 있거나 다량의 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실을 포함할 수 있다. 돌연변이는 DNA 복제 충실도의 오류와 같은 사건으로 인해 자발적으로 발생하거나, 화학적 또는 물리적 돌연변이 유발제에 노출된 후에 유도될 수 있다. 또한 당업자에게 숙지된 특정 표적화 방법을 사용하여 지정 부위 돌연변이 유발을 수행할 수 있다.

[0181] Cunningham 및 Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085에 설명된 바와 같이, 돌연변이 유발을 표적화할 수 있는 폴리펩티드의 잔기 또는 영역을 확인하는 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"이라고 지칭한다. 이 방법에서, 표적 잔기의 잔기 또는 잔기 그룹(예를 들어, arg, asp, his, lys 및 glu와 같이 전하를 띤 잔기)이 확인되고, 중성 또는 음전하를 띤 아미노산(예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하여, 폴리펩티드 시약과 그의 표적(예를 들어, 제1 TLR 신호 전달 도메인과 제2 TLR 신호 전달 도메인)의 상호 작용이 영향을 받는지 여부를 결정한다. 아미노산 위치에 별도의 치환을 도입하여, 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 증명할 수 있다. 변이체를 스크리닝하여 이들에 원하는 특성이 포함되어 있는지 확정할 수 있다.

[0182] 아미노산 서열 삽입은 1개의 잔기에서 100개 이상의 잔기를 포함하는 폴리펩티드에 이르는 길이 범위의 아미노 말단 및/또는 카르복시 말단뿐만 아니라 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다.

[0183] 일부 실시예에서, TLR 폴리펩티드의 후속 발현 및 트래피킹을 위해 펩티드 태그(일반적으로 획득 가능한 항혈청 또는 화합물에 의해 인식되는 짧은 펩티드 서열)를 포함할 수 있다. 다양한 태그 펩티드는 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드에 사용될 수 있지만, PK 태그, FLAG 옥타펩티드, MYC태그, HIS태그(일반적으로 4 내지 10개의 히스티딘 잔기의 하나의 단편) 및 e-태그(US 6,686,152)에 한정되지 않는다. 여러 개의 태그를 사용할 경우, 하나 또는 복수의 태그 펩티드는 단백질의 N-말단, 이의 C-말단, 내부 또는 이러한 위치 중 어느 하나에 독립적으로 위치할 수 있다. 항 태그 항체를 사용하여 면역 검출 측정법으로 태그 펩티드를 검출할 수 있다.

[0184] ***조작된 수용체***

[0185] 상기 임의의 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 추가로 발현할 수 있다. 예시적인 조작된 수용체는 CAR, 조작된 TCR 및 TAC 수용체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 항원(예를 들어, 종양 항원)에 특이적으로 결합하는 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 1차 세포내 신호 전달 도메인 및/또는 공동 자극 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 TCR 공동 수용체의 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 프로모터(예컨대 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터)에 작동 가능하게 연결된 제3 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시예에서, 단백질을 세포막에 삽입하는 동시에 세포가 미세유체 시스템(예컨대 CELL SQUEEZE®)을 통해, 조작된 수용체를 변형된 면역 세포에 도입한다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20140287509). 조작된 수용체는 변형된 면역 세포를 표적화하고, 신호를 전달하며 및/또는 변형된 면역 세포의 세포독성을 향상시키는 등 변형된 면역 세포의 기능을 향상시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR, TCR 또는 TAC 수용체와 같은 조작된 수용체를 발현하지 않는다.

[0186] 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 적어도 하나의 종양 항원을 표적화하는 하나 또는 복수의 특이적 결합 도메인, 및 하나 또는 복수의 세포내 이펙터 도메인, 예컨대 하나 또는 복수의 1차 세포내 신호 전달 도메인 및/또는 공동 자극 도메인을 포함한다.

[0187] 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 많은 키메라 항원 수용체는 본 분야에 공지되어 있고 본 출원의 변형된 면역 세포에 적용될 수 있다. 또한 예를 들어 항체 분자의 항원 결합 단편 또는 항체 가변 도메인을 사용하여 CAR으로 하여금 임의의 세포 표면 마커에 대해 특이적이도록 구축할 수 있다. 본 명세서는 CAR을 생성하는 임의의 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, US 6,410,319, US 7,446, 191, US 7,514,537, US 9765342 B2, WO 2002/077029, WO 2015/142675, US 2010/065818, US 2010/025177, US 2007/059298, WO 2017025038 A1 및 Berger C. et al., J. Clinical Investigation 118: 1 294-308 (2008)를 참조하고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR-T세포이다.

[0188] 본 출원의 CAR은 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하고, 상기 세포외 도메인은 적어도 하나의 종양 항원에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 표적화 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CAR세포(예를 들어, CAR-T세포)의 면역 이펙터 기능을 촉진하는 신호를 생성한다. "면역 이펙터 기능 또는 면역 이펙터 응답"은 표적 세포에 대한 면역 공격을 향상시키거나 촉진하는 면역 이

펙터 세포와 같은 기능 또는 응답을 의미한다. 예를 들어, 면역 이펙터 기능 또는 응답은 표적 세포의 사멸을 촉진하거나 성장 또는 증식을 억제하는 T 또는 NK세포의 특성을 의미할 수 있다. CAR-T세포와 같은 면역 이펙터 기능의 구현예로는, 세포 용해 활성(예컨대 항체 의존성 세포독성, 또는 ADCC) 및 보조 활성(예컨대 사이토카인의 분비)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 면역 이펙터 기능이 감소된 세포내 신호 전달 도메인을 갖는다. 일부 실시예에서, 전장 및 야생형 CD3ζ 및 선택적 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인을 갖는 CAR에 비해, 상기 CAR은 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 이하 중 어느 하나 이하의 면역 이펙터 기능(예컨대 표적 세포에 대한 세포 용해 기능)의 세포내 신호 전달 도메인을 갖는다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CAR 함유 세포의 증식 및/또는 생존을 촉진하는 신호를 생성한다. 일부 실시예에서, CAR은 CD28, CD137, CD3, CD27, CD40, ICOS, GITR 및 OX40의 신호 전달 도메인으로부터 선택된 하나 또는 복수의 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 천연적으로 존재하는 분자의 신호 전달 도메인은 분자 또는 이의 단편 또는 유도체의 전체 세포내(즉 세포내) 부분 또는 전체 천연 세포내 신호 전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0189] 일부 실시예에서, CAR의 세포내 신호 전달 도메인은 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. "1차 세포내 신호 전달 도메인"은 자극 방식으로 작용하여 면역 이펙터 기능을 유도하는 세포내 신호 전달 서열을 의미한다. 일부 실시예에서, 1차 세포내 신호 전달 도메인은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 지칭되는 신호 전달 모티프를 함유한다. 일부 실시예에서, 1차 세포내 신호 전달 도메인은 CD3ζ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, 통상적인 FcRγ(FCER1G), FcRβ(FcεRib), CD79a, CD79b, FcγRIIa, DAP10 및 DAP 12로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 기능적 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 1차 세포내 신호 전달 도메인은 CD3ζ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, 통상적인 FcRγ(FCER1G), FcRβ(FcεRib), CD79a, CD79b, FcγRIIa, DAP10 및 DAP 12로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 비기능적이거나 약화된 신호 전달 도메인을 포함한다. 비기능적이거나 약화된 신호 전달 도메인은 하나 또는 복수의 면역 이펙터 기능(예컨대 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 포함하는 세포 용해 활성 또는 보조 활성)을 약화시키거나 제거하는 점 돌연변이, 삽입 또는 결실을 갖는 돌연변이된 신호 전달 도메인일 수 있다. 일부 실시예에서, CAR은 비기능적이거나 약화된 CD3ζ(즉, CD3ζ 또는 CD3z) 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함하지 않는다. 동일한 작제물을 갖지만 야생형 1차 세포내 신호 전달 도메인을 갖는 CAR에 비해, 약화된 1차 세포내 신호 전달 도메인은 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 또는 그 이하 중 어느 하나 이하의 면역 이펙터 기능(예컨대 표적 세포에 대한 세포 용해 기능)을 유도할 수 있다.

[0190] 일부 실시예에서, CAR의 세포내 신호 전달 도메인은 하나 또는 복수(예컨대 1, 2, 3개 또는 그 이하 중 어느 하나)의 공동 자극 도메인을 포함한다. "공동 자극 도메인"은 공동 자극 분자의 세포내 부분일 수 있다. 용어 "공동 자극 분자"는 면역 세포(예컨대 T세포) 상의 동족 결합 파트너를 의미하고, 이는 공동 자극 리간드에 특이적으로 결합됨으로써, 증식 및 생존과 같으나 이에 한정되지 않는 면역 세포의 공동 자극 응답을 매개한다. 공동 자극 분자는 항원 수용체 또는 이의 리간드 이외의 효율적인 면역 응답에 기여하는 세포 표면 분자이다. 공동 자극 분자는 TNF 수용체 단백질, 면역글로불린 유사 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호 전달 림프구 활성화 분자(SLAM 단백질) 및 활성화 NK세포 수용체와 같은 단백질 패밀리로 나타낼 수 있다. 공동 자극 분자는 MHC I클래스 분자, BTLA 및 Toll 리간드 수용체, 및 OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278) 및 4-1BB(CD137)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 공동 자극 분자의 별도의 구현예는 CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8α, CD8β, IL-2Rβ, IL-2Rγ, IL-7Rα, 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, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TGFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CDIOO(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0191] 일부 실시예에서, CAR은 단일 공동 자극 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 두 개 또는 그 이상의 공동 자극 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 기능적 1차 세포내 신호 전달 도메인 및 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 기능적 1차 세포내 신호 전달 도메인(예컨대 CD3ζ)을 포함하지 않는다. 일부 실시예에서, CAR은 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인으로 구성되거나 실질적으로 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인으로 구성된 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR은 비기능적이거나 약화된 1차 세포내 신호 전달 도메인(예컨대 돌연변이된 CD3ζ) 및 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인으로 구성되거나 실질적으로 비기능적이거나 약화된 1차 세포내 신호 전달 도메인(예컨대 돌연변이된 CD3ζ) 및 하나 또는 복수의 공동 자극 도메인으로 구성된 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다.

표적화 도메인이 종양 항원에 결합된 후, CAR의 공동 자극 도메인은 신호를 형질도입하여 CAR을 갖는 조작된 면역 세포(예컨대 T세포)의 증식, 생존 및 분화를 향상시키고, 활성화 유도된 세포 사멸을 억제할 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 하나 또는 복수의 공동 자극 신호 전달 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB(즉 CD137), OX40, CD30, CD40, CD3, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드로부터 선택된 하나 또는 복수의 분자로부터 유래된다.

[0192] 일부 실시예에서, CAR의 세포내 신호 전달 도메인은 CD28로부터 유래된 공동 자극 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CD3ζ의 세포내 신호 전달 도메인 및 CD28의 공동 자극 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 본 출원의 키메라 수용체 내의 세포내 신호 전달 도메인은 4-1BB(즉 CD137)로부터 유래된 공동 자극 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CD3ζ의 세포내 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동 자극 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0193] 일부 실시예에서, CAR의 세포내 신호 전달 도메인은 CD28의 공동 자극 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동 자극 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CD3ζ의 세포내 신호 전달 도메인, CD28의 공동 자극 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동 자극 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 폴리펩티드를 포함하고, 상기 폴리펩티드는 N-말단에서 C-말단까지 CD28의 공동 자극 신호 전달 도메인, 4-1BB의 공동 자극 신호 전달 도메인 및 CD3ζ의 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0194] 일부 실시예에서, CAR의 표적화 도메인은 scFv, Fv, Fab, $(Fab')_2$, 단일 도메인 항체(sdAb), 또는 V_HH도메인과 같은 항체 또는 항체 단편이다. 일부 실시예에서, CAR의 표적화 도메인은 종양 항원에 특이적으로 결합하는 수용체의 리간드 또는 세포외 부분이다. 일부 실시예에서, CAR의 하나 또는 복수의 표적화 도메인은 단일 종양 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시예에서, CAR은 두 가지 또는 그 이상의 종양 항원에 결합되는 표적화 도메인을 갖는 이중특이적 또는 다중특이적 CAR이다. 일부 실시예에서, 종양 항원은 CD19, NKG2D, BCMA, NY-ESO-1, VEGFR2, MAGE-A3, CD20, CD22, CD33, CD38, CEA, EGFR(예컨대 EGFRvIII), GD2, HER2, IGF1R, 메조텔린, PSMA, ROR1, WT1, 및 임상적으로 중요한 기타 종양 항원, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, CAR은 BCMA, NY-ESO-1, VEGFR2, MAGE-A3, AFP, CD4, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD38, CD70, CD123, CEA, EGFR(예컨대 EGFRvIII), GD2, GPC-2, GPC3, CLDN18.2, HER2, LILRB4, IL-13Rα2, IGF1R, 메조텔린, PSMA, ROR1, WT1, NKG2D, CLL1, TGFaRII, TGFbRII, CCR5, CXCR4, CCR4, HPV 관련 항원 및 EBV 관련 항원(예를 들어, LMP1 또는 LMP2)으로 이루어진 군으로부터 선택된 표적 항원에 특이적으로 결합한다.

[0195] 일부 실시예에서, CAR은 항CD19 CAR이다. 다양한 항원 결합 도메인 서열은 CAR에 대한 표적화 도메인으로 사용될 수 있다. 예를 들어, WO 2012/079000을 참조하고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 scFv는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 SEQ ID NO: 2를 포함한다.

[0196] 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR분자 및 항CD20 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1을 포함한다.

[0197] 일부 실시예에서, 항CD19 CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물

은 항CD19 CAR분자 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60을 포함한다.

[0198] 일부 실시예에서, CAR은 항CLL1 CAR이다. 다양한 항원 결합 도메인 서열은 CAR에 대한 표적화 도메인으로 사용될 수 있다. 예를 들어, WO 2012/079000을 참조하고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 sdAb는 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 SEQ ID NO: 4와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 SEQ ID NO: 4를 포함한다.

[0199] 일부 실시예에서, CAR은 항CLL1/CD33 이중 CAR이다. 다양한 항원 결합 도메인 서열은 CAR에 대한 표적화 도메인으로 사용될 수 있다. 예를 들어, WO 2012/079000을 참조하고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, 항CD33 V도메인sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1 sdAb는 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CD33 V도메인 sdAb는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 SEQ ID NO: 43과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항CLL1/CD33 이중 CAR은 SEQ ID NO: 43을 포함한다.

[0200] 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단 도메인 및 TLR4 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR4의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 각각 SEQ ID NO: 40을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71을 포함한다.

[0201] 일부 실시예에서, 항CLL1 CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인 및 TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 41을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 42와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 42를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인, TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분), P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0202] 일부 실시예에서, CAR은 항GPC3 CAR이다. 다양한 항원 결합 도메인 서열은 CAR에 대한 표적화 도메인으로 사용될 수 있다. 예를 들어, WO 2012/079000을 참조하고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 scFv는 SEQ ID NO: 55의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 SEQ ID NO: 56과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 SEQ ID NO: 56을 포함한다.

[0203] 일부 실시예에서, 항GPC3 CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물은 항GPC3 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58을 포함한다.

[0204] 일부 실시예에서, CAR은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR)이다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 단일 항BCMA CAR이다. 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 직렬 항BCMA CAR이다. 다양한 항원 결합 도메인 서열은 CAR에 대한 표적화 도메인으로 사용될 수 있다. 예를 들어, WO 2012/079000을 참조하고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, 단일 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 단일 항BCMA sdAb는 SEQ ID NO: 68의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 단일 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 67과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 단일 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 67을 포함한다. 일부 실시예에서, 직렬 항BCMA CAR은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 직렬 항BCMA sdAb는 SEQ ID NO: 44의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 직렬 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 직렬 항BCMA CAR은 SEQ ID NO: 66을 포함한다.

[0205] 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61을 포함한다.

[0206] 일부 실시예에서, 항BCMA CAR은 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)의 일부이고, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73을 포함한다.

[0207] 일부 실시예에서, CAR의 막횡단 도메인은 T세포 수용체의 α, β 또는 ζ 사슬, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD11a, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), CD160, CD19, IL-2Rβ, IL-2Rγ, IL-7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TGFR2, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(촉각), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CDIOO(SEMA4D), SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D 및/또는 NKG2C의 막횡단 도메인으로부터 선택된 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD4, CD3, CD8α 또는 CD28 막횡단 도메인이다. 일부 실시예에서, CAR의 막횡단 도메인은 CD8α의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0208] 일부 실시예에서, 세포외 도메인은 힌지 영역에 의해 막횡단 도메인에 연결된다. 일 실시예에서, 힌지 영역은 CD8α의 힌지 영역을 포함한다.

[0209] 일부 실시예에서, CAR은 CD8αSP와 같은 신호 펩티드를 포함한다.

[0210] 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 변형된 T세포 수용체이다. 일부 실시예에서, 조작된 TCR은 종양 항원에 특이적이다. 일부 실시예에서, 종양 항원은 CD19, CLL1, GPC3, BCMA, NY-ESO-1, VEGFR2, MAGE-A3, VEGFR2, MAGE-A3, CD20, CD22, CD33, CD38, CEA, EGFR(예컨대 EGFRvIII), GD2, HER2, IGF1R, 메조텔린, PSMA, ROR1, WT1및 임상적으로 중요한 기타 종양 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 종양 항원은 종양 세포의 세포내 단백질로부터 유래된다. 종양 항원(종양 관련 항원 포함)에 특이적인 다수의 TCR을 설명하였고, 예를 들어 NY-ESO-1 암-고환 항원, p53종양 억제 항원, 흑색종(예를 들어, MARTI, gp 100), 백혈병(예를 들어, WT1, 소수 조직 적합성 항원) 및 유방암(예를 들어, HER2, NY-BR1) 종양 항원에 대한 TCR을 포함한다. 본 분야에 공지된 임의의 TCR은 본 출원에 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, TCR은 종양 항원에 대해 향상된 친화력을 갖는다. 예를 들어 US 5830755 및 Kessels et al. Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat. Immunol.* 2, 957-961 (2001)에서 예시적인 TCR 및 이러한 TCR을 면역 세포에 도입하는 방법을 설명하였다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 TCR-T세포이다.

[0211] TCR 수용체 복합체는 가변 TCR 수용체 α 및 β사슬(γδ T세포의 경우는 γ 및 δ사슬)이 세 개의 이량체 신호 전달 모듈 CD3δ/ε, CD3γ/ε 및 CD247(T세포 표면 당단백질 CD3ζ사슬)ζ/ζ 또는 ζ/η와 형성한 옥타머 복합체이다. 각각의 서브 유닛의 막횡단 도메인 중의 이온화 가능한 잔기는 복합체를 함께 유지하는 상호 작용의 극성 네트워크를 형성한다. TCR 복합체는 T세포에서 신호 전달 계통을 활성화하는 기능을 갖는다.

[0212] 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 하나 또는 복수의 T세포 수용체(TCR) 융합 단백질(TFP)을 포함하는 조작된 TCR이다. 예를 들어 US 20170166622 A1에서 예시적인 TFP를 설명하였고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, TFP는 TCR 서브 유닛을 포함하는 세포외 도메인이고, 상기 TCR 서브 유닛은 TCRα사슬, TCRβ사슬, CD3εTCR서브 유닛, CD3γTCR서브 유닛, CD3δTCR서브 유닛, 이의 기능적 단편 및 적어도 하나이지만 20개를 초과하지 않는 변형을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 세포외 도메인 또는 이의 부분을 포함한다. 일부 실시예에서, TFP는 막횡단 도메인을 포함하고, 상기 막횡단 도메인은 TCRα사슬, TCRβ사슬, CD3εTCR서브 유닛, CD3γTCR서브 유닛, CD3δTCR서브 유닛, 이의 기능적 단편 및 적어도 하나이지만 20개를 초과하지 않는 변형을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TFP는 막횡단 도메인을 포함하고, 상기 막횡단 도메인은 TCRα사슬, TCRβ사슬, TCRζ사슬, CD3εTCR서브 유닛, CD3γTCR서브 유닛, CD3δTCR서브 유닛, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 이의 기능적 단편, 및 적어도

하나이지만 20개를 초과하지 않는 변형을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0213] 일부 실시예에서, TFP는 TCR 서브 유닛 및 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 TCR서브 유닛은 TCR 세포외 도메인의 적어도 일부 및 CD3ε의 세포내 신호 전달 도메인으로부터 유래된 자극 도메인을 함유하는 TCR 세포내 도메인을 포함하며; 여기서 상기 TCR 서브 유닛은 상기 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결되고, T세포에서 발현될 경우, 상기 TFP를 TCR에 통합한다.

[0214] 일부 실시예에서, TFP는 TCR 서브 유닛 및 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 TCR 서브 유닛은 TCR 세포외 도메인의 적어도 일부 및 CD3γ의 세포내 신호 전달 도메인으로부터 유래된 자극 도메인을 함유하는 TCR 세포내 도메인을 포함하며; 여기서 상기 TCR 서브 유닛은 상기 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결되고, T세포에서 발현될 경우, 상기 TFP를 TCR에 통합한다.

[0215] 일부 실시예에서, TFP는 TCR 서브 유닛 및 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 TCR 서브 유닛은 TCR 세포외 도메인의 적어도 일부 및 CD3δ의 세포내 신호 전달 도메인으로부터 유래된 자극 도메인을 함유하는 TCR 세포내 도메인을 포함하며; 여기서 상기 TCR 서브 유닛은 상기 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결되고, T세포에서 발현될 경우, 상기 TFP를 TCR에 통합한다.

[0216] 일부 실시예에서, TFP는 TCR 서브 유닛 및 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 TCR 서브 유닛은 TCR 세포외 도메인의 적어도 일부 및 TCRα의 세포내 신호 전달 도메인으로부터 유래된 자극 도메인을 함유하는 TCR 세포내 도메인을 포함하며; 여기서 상기 TCR 서브 유닛은 상기 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결되고, T세포에서 발현될 경우, 상기 TFP를 TCR에 통합한다.

[0217] 일부 실시예에서, TFP는 TCR 서브 유닛 및 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 TCR 서브 유닛은 TCR 세포외 도메인의 적어도 일부 및 TCRβ의 세포내 신호 전달 도메인으로부터 유래된 자극 도메인을 함유하는 TCR 세포내 도메인을 포함하며; 여기서 상기 TCR 서브 유닛은 상기 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결되고, T세포에서 발현될 경우, 상기 TFP를 TCR에 통합한다.

[0218] 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 예를 들어 US 20160368964 A1에서 예시적인 TAC 수용체를 설명하였고, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 일부 실시예에서, TAC는 표적화 도메인, TCR 복합체와 연관된 단백질에 특이적으로 결합하는 TCR결합 도메인 및 T세포 수용체 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 scFv 또는 V_HH와 같은 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체 단편이다. 일부 실시예에서, 표적화 도메인은 설계된 안키린 반복 서열(DARPin) 폴리펩티드이다. 일부 실시예에서, 종양 항원은 CD19, GPC3, CLL1, BCMA, NY-ESO-1, VEGFR2, MAGE-A3, VEGFR2, MAGE-A3, CD20, CD22, CD33, CD38, CEA, EGFR(예컨대 EGFRvIII), GD2, HER2, IGF1R, 메조텔린, PSMA, ROR1, WT1 및 임상적으로 중요한 기타 종양 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, TCR 복합체와 연관된 단백질은 CD3ε와 같은 CD3이다. 일부 실시예에서, TCR 결합 도메인은 scFv 또는 V_HH와 같은 단일 사슬 항체이다. 일부 실시예에서, TCR 결합 도메인은 UCHT1로부터 유래된다. 일부 실시예에서, TAC 수용체는 세포질 도메인 및 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, T세포 수용체 신호 전달 도메인은 TCR 공동 수용체로부터 유래된 세포질 도메인을 포함한다. 예시적인 TCR 공동 수용체는 CD4, CD8, CD28, CD45, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, TAC 수용체는 막횡단 도메인 및 CD4로부터 유래된 세포질 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, TAC 수용체는 막횡단 도메인 및 CD8(예컨대 CD8α)로부터 유래된 세포질 도메인을 포함한다.

[0219] T세포 공동 수용체는 T세포에서 막 단백질로 발현된다. 이는 TCR: 펩티드: MHC 복합체에 안정성을 제공하고 신호 형질도입을 촉진할 수 있다. T세포 공동 수용체의 두 가지 서브타입 CD4 및 CD8은 특정 MHC 유형에 대해 강한 특이성을 나타낸다. CD4 공동 수용체는 TCR: MHC II 복합체만 안정화할 수 있는 반면, CD8 공동 수용체는 TCR: MHC I 복합체만 안정화할 수 있다. CD4 및 CD8은 상이한 T세포 유형에서의 차이 발현은 상이한 T세포 기능적 하위 집단을 초래한다. CD8+T세포는 세포독성 T세포이다.

[0220] CD4는 면역 세포(예컨대 헬퍼 T세포, 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포)의 표면에서 발현되는 당단백질이다. CD4는 세포외 세포 표면에 노출된 4개의 면역글로불린 도메인(D_1 내지 D_4)을 갖는다. CD4는 짧은 세포내/세포내 꼬리에 특정된 아미노산 서열을 포함하고, CD4 꼬리가 티로신 키나제 Lck를 모집하고 티로신 키나제Lck와 상호작용하도록 허용한다. TCR 복합체와 CD4가 각각 MHC II분자의 상이한 영역에 결합되는 경우, TCR 복합체와 CD4 사이의 밀착 근접은 CD4와의 세포내 꼬리에 결합된 Lck가 CD3의 세포내 도메인 상의 면역 수용체 티로신 활성화

모티프(ITAM)를 티로신 인산화함으로써, TCR에 의해 생성된 신호를 증폭시키도록 허용한다.

[0221] CD8은 두 가닥의 α사슬로 구성된 동종이량체(덜 일반적임) 또는 한 가닥의 α사슬 및 한 가닥의 β사슬로 구성된 이종이량체(더 일반적임)로 구성된 당단백질이고, 이들은 각각 얇은 줄기(thin stalk)를 통해 막에 연결된 면역글로블린 가변(IgV)형 세포외 도메인 및 세포내 꼬리를 포함한다. CD8은 주로 세포독성 T세포의 표면에서 발현되지만, 자연 살해 세포, 피질 흉선 세포 및 수지상 세포에서도 발현될 수 있다. CD8 세포내 꼬리는 Lck와 상호 작용하고, 일단 TCR이 특이적 항원에 결합되면 TCR 복합체의 세포내 CD3 및 ζ사슬을 인산화한다. 세포내 CD3 및 ζ사슬 상의 티로신 인산화는 궁극적으로 유전자 전사로 이어지는 인산화 캐스케이드를 유발한다.

[0222] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR, TCR, TAC 수용체의 임의의 조합과 같은 하나 이상의 조작된 수용체를 발현한다.

[0223] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포에 의해 발현된 조작된 수용체(예컨대 CAR, TCR 또는 TAC)는 하나 또는 복수의 종양 항원을 표적화한다. 종양 항원은 면역 반응, 특히 T 세포 매개 면역 반응을 유도할 수 있는 종양 세포에 의해 생성되는 단백질이다. 본 개시의 표적화 항원의 선택은 치료할 암의 특정 유형에 따라 달라질 것이다. 예시적인 종양 항원은 예를 들어 신경교종 관련 항원, 암배아 항원(CEA), β-인간 융모성 성선 자극 호르몬, 알파-태아 단백질(AFP), 렉틴 반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE-1, MN-CAIX, 인간 텔로머라제 역전사 효소, RU1, RU2(AS), 장내 카르복실 에스테라제, mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타타제, 전립선 특이적 항원(PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, CLL1, BCMA, GPC3, CD19, 프로스타글란딘, PSMA, HER2/neu, 서바이빈 및 텔로머라제, 전립선암 종양 항원-1(PCTA-1), MAGE, ELF2M, 호중구 엘라스타제, 에프린B2(ephrinB2), CD22, 인슐린 성장 인자(IGF)-I, IGF-II, IGF-I 수용체 및 메조텔린을 포함한다.

[0224] 일부 실시예에서, 종양 항원은 악성 종양과 관련된 하나 이상의 항원 암 에피토프를 포함한다. 악성 종양은 면역 공격의 표적 항원으로 사용될 수 있는 많은 단백질을 발현한다. 이러한 분자는 흑색종의 MART-1, 티로시나제 및 gp100과 같은 조직 특이적 항원 및 전립선암의 전립선 산성 포스파타제(PAP) 및 전립선 특이적 항원(PSA)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 다른 표적 분자는 암 유전자 HER2/Neu/ErbB-2와 같은 변형 관련 분자 그룹에 속한다. 다른 그룹의 항원은 암배아 항원(CEA)과 같은 암배아 항원이다. B세포 림프종에서, 종양 특이적 특이형 면역글로블린은 개체 종양에 고유한 실제 종양 특이적 면역글로블린 항원을 구성한다. B세포 분화 항원(예컨대 CD19, CD20 및 CD37)은 B세포 림프종의 표적 항원의 다른 후보이다.

[0225] 일부 실시예에서, 종양 항원은 종양 특이적 항원(TSA) 또는 종양 관련 항원(TAA)이다. TSA는 종양 세포에 고유하며 생체내의 다른 세포에 존재하지 않는다. TAA 관련 항원은 종양 세포에만 고유한 것이 아니라 항원에 대한 면역 관용 상태를 유도하지 않는 조건에서 정상 세포에서도 발현될 수 있다. 종양에 대한 항원의 발현은 면역계가 항원에 반응할 수 있는 조건 하에서 발생할 수 있다. TAA는 배아 발육 과정에서 정상 세포에서 발현되는 항원일 수 있고, 이때 면역 체계는 미성숙하여 응답할 수 없거나, 이들은 정상 세포에서는 매우 낮은 수준으로 존재하지만 종양 세포에서는 훨씬 높은 수준으로 존재하는 항원일 수 있다.

[0226] TSA 또는 TAA 항원의 비제한적 구현예는 MART-1/MelanA(MART-I), gp 100(Pmel 17), 티로시나제, TRP-1, TRP-2와 같은 분화 항원, 및 MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15와 같은 종양 특이적 다계통 항원을 포함한다. CEA와 같은 과발현된 배아 항원; p53, Ras, HER2/neu와 같은 과발현된 암 유전자 및 돌연변이된 종양 억제 유전자; BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR와 같은 염색체 전좌로 인한 독특한 종양 항원; 및 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 항원 EBVA 및 인유두종 바이러스(HPV) 항원 E6 및 E7과 같은 바이러스 항원을 포함한다. 다른 단백질 기반 대형 항원은 TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23HI, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, β-카테닌, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 알파-태아 단백질, β-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3₩CA 27.29₩BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68₩P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733₩EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, TA-90₩Mac-2 결합 단백질₩사이클로필린C 관련 단백질, TAAL6, TAG72, TLP 및 TPS를 포함한다.

[0227] ***핵산***

[0228] 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포는 본 명세서에 기재된 TLR 폴리펩티드(예를 들어, 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드) 및/또는 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열을 포함한다.

[0229] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 폴리펩티드(예를 들어, TLR 폴리펩티드) 중 어느 하나를 코딩하는 핵산

서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시예에서, 핵산은 DNA이다. 일부 실시예에서, 핵산은 RNA이다. 일부 실시예에서, 핵산은 선형이다. 일부 실시예에서, 핵산은 환형이다.

[0230] 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산은 하나 또는 복수의 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 코딩 서열의 전사 및/또는 번역을 제어하는 예시적인 조절 서열은 본 분야에 공지된 것이고, 프로모터; 전사에 사용되는 적절한 개시, 조절 및/또는 종결(예를 들어, 폴리A 전사 종결 서열), mRNA 수송(예를 들어, 핵 위치결정 신호 서열), 가공(예를 들어, 스플라이싱 신호), 안정성(예를 들어, 인트론 및 비코딩 5' 및 3' 서열), 번역(예를 들어, 개시 Met, 삼중항 리더 서열, IRES 리보솜 결합 부위, 신호 펩티드 등)을 위한 별도의 요소; 및 삽입물을 바이러스 벡터에 도입하기 위한 삽입 부위를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 조절 서열은 프로모터, 전사 인핸서 및/또는 TLR 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체의 정확한 발현을 허용하는 서열이다.

[0231] 용어 “조절 서열” 또는 “제어 서열”은 이와 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 영향을 미치는 DNA 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열의 성질은 숙주 생체에 따라 상이하다. 원핵 생물에서, 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 종결자를 포함한다. 진핵 생물에서, 조절 서열은 프로모터, 종결자 및 경우에 따라 인핸서, 트랜스 활성화 인자 또는 전사 인자를 포함한다.

[0232] 용어 “작동 가능하게 연결”은 그중 상기 구성 성분이 의도된 방식으로 작용하도록 허용하는 관계 중의 병치를 의미한다. 코딩 서열에 “작동 가능하게 연결”된 조절 서열은 코딩 서열의 발현이 조절 서열과 상용되는 조건에서 완료되는 방식으로 연결된다.

[0233] 본 명세서에 사용된 바와 같이, “프로모터” 또는 “프로모터 영역”은 이와 작동 가능하게 연결된 DNA 또는 RNA의 전사를 제어하는 DNA 또는 RNA의 세그먼트를 의미한다. 프로모터 영역은 RNA 폴리머라제의 인식, 결합 및 전사 개시에 관한 특정 서열을 포함한다. 또한, 프로모터는 RNA 폴리머라제의 인식, 결합 및 전사 개시 활성(즉, 하나 또는 복수의 전사 인자의 결합)을 조절하는 서열을 포함한다. 이러한 서열은 시스 작용일 수도 있거나, 트랜스 작용 인자에 대해 응답할 수 있다. 조절의 성질에 따라, 프로모터는 구성적 프로모터 또는 조절형 프로모터일 수 있다. 조절형 프로모터는 유도성 또는 환경적으로 응답할 수 있다(예를 들어, pH, 혐기성 조건, 삼투압제, 온도, 빛 또는 세포 밀도와 같은 유인에 응답함). 많은 이러한 프로모터 서열은 본 분야에 공지된 것이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,980,285; 5,631,150; 5,707,928; 5,759,828; 5,888,783; 5,919,670 및 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press (1989)를 참조한다.

[0234] 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 제1 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드는 동일하고, 제1 핵산은 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 동시에 코딩한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0235] 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 조작된 수용체를 코딩하는 제3 핵산을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 제3 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제2 핵산 및 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제2 핵산 및 제3 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산, 제2 핵산 및 제3 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산, 제2 핵산 및 제3 핵산은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0236] 일부 실시예에서, 프로모터는 내인성 프로모터이다. 예를 들어, 본 분야에 공지된 임의의 방법(예컨대 CRISPR/Cas9방법)을 사용하여, 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산을 내인성 프로모터 다운스트림의 변형된 면역 세포의 게놈에 녹인할 수 있다. 일부 실시예에서, 내인성 프로모터는 β-액틴과 같은 풍부한 단백질의 프로모터이다. 일부 실시예에서, 내인성 프로모터는 유도성 프로모터이고, 예를 들어, 변형된 면역 세포의 내인성 활성화 신호에 의해 유도될 수 있다. 일부 실시예에서, 여기서 변형된 면역 세포는 T세포이고, 프로모터는 T세포 활성화 의존성 프로모터(예컨대 IL-2프로모터, NFAT프로모터 또는 NFκB프로모터)이다. 일부 실시예에서, 프로모터는 이종 프로모터이다.

[0237] 포유동물 세포에서의 유전자 발현을 위해 다양한 프로모터가 연구되었고, 본 분야에 공지된 임의의 프로모터는 모두 본 출원에 사용될 수 있다. 프로모터는 대체적으로 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터와 같은 조절형 프로모터로 나눌 수 있다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 이종 핵산 서열은 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 이종 핵산 서열은 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제3 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제1 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제2 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제1 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제2 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제1 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제2 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0238] 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제3 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제2 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제1 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제2 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제1 구성적 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제2 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되고, 제1 구성적 프로모터는 제2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 제2 구성적 프로모터는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0239] 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터는 제1 유도 조건에 의해 유도될 수 있고, 제2 유도성 프로모터는 제2 유도 조건에 의해 유도될 수 있으며, 제3 유도성 프로모터는 제3 유도 조건에 의해 유도될 수 있다. 일부 실시예에서, 제1 유도 조건은 제2 유도 조건과 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 유도 조건은 제3 유도 조건과 동일하다. 일부 실시예에서, 제2 유도 조건은 제3 유도 조건과 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 유도 조건, 제2 유도 조건 및 제3 유도 조건은 모두 동일하다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터 및 제2 유도성 프로모터를 동시에 유도한다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터 및 제3 유도성 프로모터를 동시에 유도한다. 일부 실시

예에서, 제2 유도성 프로모터 및 제3 유도성 프로모터를 동시에 유도한다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터, 제2 유도성 프로모터 및 제3 유도성 프로모터를 동시에 유도한다. 일부 실시예에서, 제1 유도성 프로모터, 제2 유도성 프로모터 및 제3 유도성 프로모터를 순차적으로 유도하고, 예를 들어, 제2 유도성 프로모터 이전에 제1 유도성 프로모터를 유도하며 제3 유도성 프로모터 이전에 제2 유도성 프로모터를 유도하고, 제2 유도성 프로모터 이후에 제1 유도성 프로모터를 유도하며 제3 유도성 프로모터 이전에 제2 유도성 프로모터를 유도하거나, 제2 유도성 프로모터 이후에 제1 유도성 프로모터를 유도하고 제3 유도성 프로모터 이후에 제2 유도성 프로모터를 유도한다.

[0240] 구성적 프로모터는 이종 유전자(전이유전자라고도 함)가 숙주 세포에서 구성적으로 발현되도록 허용한다. 본 명세서에서 고려되는 예시적인 구성적 프로모터는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 인간 신장 인자-1α(hEF1α), 유비퀴틴C 프로모터(UbiC), 포스포글리세롤 키나제 프로모터(PGK), 원숭이 바이러스40 초기 프로모터(SV40) 및 CMV 초기 인핸서에 커플링된 닭β-액틴 프로모터(CAGG)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 전이유전자 발현의 유도에 대한 이러한 구성적 프로모터의 효율성은 많은 연구에서 광범위하게 비교되었다. 일부 실시예에서, 프로모터는 hEF1α프로모터이다.

[0241] 일부 실시예에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 유도성 프로모터는 조절성 프로모터의 범주에 속한다. 유도성 프로모터는 물리적 조건, 변형된 면역 세포의 미세환경 또는 변형된 면역 세포의 생리학적 상태, 유도물(즉, 유도제) 또는 이들의 조합과 같은 하나 또는 복수의 조건에 의해 유도될 수 있다. 일부 실시예에서, 유도 조건은 변형된 면역 세포 및/또는 약학 조성물을 투여받은 대상체에서 내인성 유전자의 발현을 유도하지 않는다. 일부 실시예에서, 유도 조건은 유도물, 방사선(예컨대 전리 방사선, 빛), 온도(예컨대 열), 산화환원 상태, 종양 환경 및 변형된 면역 세포의 활성화 상태로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0242] 일부 실시예에서, 프로모터는 유도물에 의해 유도될 수 있다. 일부 실시예에서, 유도물은 화학적 화합물과 같은 소분자이다. 일부 실시예에서, 소분자는 독시사이클린, 테트라사이클린, 알코올, 금속 또는 스테로이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 화학적으로 유도되는 프로모터는 가장 광범위하게 연구되었다. 이러한 프로모터는 소분자 화학 물질(예컨대 독시사이클린, 테트라사이클린, 알코올, 스테로이드, 금속 및 다른 화합물)의 존재 또는 부재에 따라 전사 활성이 조절되는 프로모터를 포함한다. 역테트라사이클린 제어 트랜스 활성화 인자(rtTA) 및 테트라사이클린 응답 요소 프로모터(TRE)를 갖는 독시사이클린 유도성 시스템은 현재 가장 성숙한 시스템이다. WO 9429442에는 테트라사이클린 응답 프로모터에 의한 진핵 세포에서의 유전자 발현의 엄격한 제어가 설명되었다. WO 9601313에는 테트라사이클린에 의해 조절되는 전사 조절제가 개시되었다. 또한, 예를 들어 TetSystems.com의 웹사이트에 Tet 기술(예컨대 Tet-오픈 시스템)이 설명되었다. 임의의 공지된 화학적으로 조절되는 프로모터는 본 출원의 치료 단백질의 발현을 구동할 수 있다.

[0243] 일부 실시예에서, 유도물은 성장 인자, 호르몬 또는 세포 표면 수용체의 리간드와 같은 폴리펩티드이고, 예를 들어 종양 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드이다. 일부 실시예에서, 상기 폴리펩티드는 변형된 면역 세포에 의해 발현된다. 일부 실시예에서, 상기 폴리펩티드는 이종 핵산 내의 핵산에 의해 코딩된다. 많은 폴리펩티드 유도물도 본 분야에 공지된 것이고, 이들은 본 출원에 적용될 수 있다. 예를 들어, 엑디손 수용체 기반 유전자 스위치, 프로게스테론 수용체 기반 유전자 스위치 및 에스트로겐 수용체 기반 유전자 스위치는 스테로이드 수용체를 사용하여 유래된 트랜스 활성화 인자의 유전자 스위치(WO 9637609 및 WO 9738117 등)에 속한다.

[0244] 일부 실시예에서, 유도물은 소분자 구성 성분 및 하나 또는 복수의 폴리펩티드를 동시에 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 이량체화에 의존하는 유도성 프로모터는 본 분야에 공지된 것이고, 본 출원에 적용될 수 있다. 1993년에 개발된 첫 번째 소분자CID 시스템은 FK1012(약물 FK506의 유도체)를 사용하여 FKBP의 동종이량체화를 유도하였다. 유사한 전략을 사용하여, Wu et al.은 Rapalog/FKPB-FRB* 및 지베렐린(Gibberelline)/GID1-GAI이량체화 의존적 유전자 스위치를 사용하여 CAR-T세포가 온-스위치(ON-switch) 방식으로 성공적으로 적정하였다(C.-Y. Wu et al., Science 350, aab4077 (2015)). 다른 이량체화 의존적 스위치 시스템은 쿠메르마이신/GyrB-GyrB(Nature 383 (6596): 178-81) 및 HaXS/Snap-tag-HaloTag(Chemistry and Biology 20 (4): 549-57)를 포함한다.

[0245] 일부 실시예에서, 프로모터는 광유도성 프로모터이고, 유도 조건은 빛이다. 포유동물 세포에서 유전자 발현을 조절하기 위한 광유도성 프로모도 본 분야에 공지된 것이다(예를 들어, Science 332, 1565-1568 (2011); Nat. Methods 9, 266-269 (2012); Nature 500: 472-476 (2013); Nature Neuroscience 18:1202-1212 (2015)를 참조). 이러한 유전자 조절 시스템이 (1) DNA 결합 또는 (2) DNA 결합 단백질에 대한 전사 활성화 도메인 모집의 조절에 기반하여, 이러한 유전자 조절 시스템은 크게 두 가지 범주로 나눌 수 있다. 예를 들어, 포유동물 세포

에서 멜라놉신을 기반으로 하는 합성 포유동물 청색광 제어 전사 시스템이 개발되어 테스트되었고, 상기 시스템은 청색광(480 nm)에 응답하여 세포내 칼슘의 증가를 유발함으로써, 칼시뉴린 매개 NFAT 동원을 초래한다. 최근, Motta-Mena 등은 천연적으로 존재하는 EL222전사 인자로부터 개발된 새로운 유도성 유전자 발현 시스템을 설명하였고, 상기 시스템은 인간 세포주 및 제브라피시 배아에서 전시 개시에 대한 높은 수준의 청색광 민감성 제어를 부여한다(Nat. Chem. Biol. 10(3):196-202 (2014)). 또한, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 적색광에 의해 유도된 광수용체 피토크롬B(PhyB)와 피토크롬 상호 작용 인자6(PIF6)의 상호 작용은 적색광에 의해 유발되는 유전자 발현을 조절한다. 또한, 자외선B(UVB) 유도성 유전자 발현 시스템이 개발되어 포유동물 세포에서 표적 유전자 전사에 효과적인 것으로 입증되었다(Chapter 25 of Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20th,2015). 본 명세서에 기재된 임의의 광유도성 프로모터는 본 출원의 치료 단백질의 발현을 구동할 수 있다.

[0246] 일부 실시예에서, 프로모터는 광유도성 분자와 빛의 조합에 의해 유도된 광유도성 프로모터이다. 예를 들어, 화학적 유도물의 광절단 가능한 광케이지 그룹(photocaged group)은 광케이지 그룹이 방사선이나 다른 방식에 의해 제거되지 않는 한, 유도물은 비활성을 유지한다. 이러한 광유도성 분자는 소분자 화합물, 올리뉴클레오티드 및 단백질을 포함한다. 예를 들어, 케이지형 엑디손, lac 오페론과 함께 사용하는 케이지형 IPTG, 리보자임 매개 유전자 발현을 위한 케이지형 토요카마이신, Tet-온 시스템과 함께 사용하는 케이지형 독시사이클린 및 광매개 FKBP/FRB 이량체화를 위한 케이지형 Rapalog(예를 들어, Curr Opin Chem Biol. 16(3-4): 292-299 (2012)를 참조)을 개발하였다.

[0247] 일부 실시예에서, 프로모터는 방사선 유도성 프로모터이고, 유도 조건은 전리 방사선과 같은 방사선이다. 방사선 유도성 프로모터도 본 분야에 공지된 것으로, 전이유전자 발현을 조절하는 것이다. 세포에 방사선을 조사한 후에 유전자 발현의 변화가 발생한다. 예를 들어, "즉시 초기 유전자(immediate early gene)"라고 지칭되는 유전자 그룹은 전리 방사선에 신속하게 반응할 수 있다. 예시적인 즉시 초기 유전자는 Erg-1, p21/WAF-1, GADD45α, t-PA, c-Fos, c-Jun, NF-κB 및 AP1을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 즉시 초기 유전자는 프로모터 영역에 방사선 응답 서열을 포함한다. 공통 서열$CC(A/T)_6GG$는 Erg-1프로모터에서 발견되었고, 혈청 응답 요소 또는 CArG 요소로 지칭된다. 방사선 유도성 프로모터 및 전이유전자의 조합이 집중적으로 연구되어, 고효율적인 치료 효과가 있는 것으로 입증되었다. 예를 들어, Cancer Biol Ther. 6(7):1005-12 (2007) 및Chapter 25 of Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20th, 2015를 참조한다.

[0248] 일부 실시예에서, 프로모터는 열유도성 프로모터이고, 유도 조건은 열이다. 본 분야에서는 또한 전이유전자 발현을 구동하는 열유도성 프로모터를 광범위하게 연구하였다. Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp10 등을 비롯한 열 충격 또는 스트레스 단백질(HSP)은 열이나 기타 물리적 및 화학적 스트레스로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 전임상 연구에서 열 충격 단백질(HSP) 프로모터 및 성장 정지 및 DNA 손상(GADD) 153프로모터를 포함하는 열유도성 프로모터를 시도하였다. 1985년에 처음으로 설명된 인간*hsp70B* 유전자의 프로모터는 가장 효율적인 열유도성 프로모터 중 하나로 보인다. Huang 등은 *hsp70B-EGFP*, *hsp70B-TNFα* 및 *hsp70B-IL12* 코딩 서열을 도입한 후, 종양 세포는 열처리 후 극도로 높은 전이유전자 발현을 발현하는 반면, 열처리가 없는 경우, 전이유전자의 발현이 검출되지 않았다고 보고하였다. IL12 전이유전자 가열 처리된 마우스 그룹에서, 체내 종양 성장은 유의하게 지연되었다(Cancer Res. 60:3435 (2000)). 다른 과학자 그룹은 *HSV-tk* 자살 유전자를 hsp70B 프로모터에 연결시키고, 마우스 유방암을 갖는 누드 마우스에서 상기 시스템을 테스트하였다. 열처리를 수행하지 않은 대조군에 비해, 이의 종양에 *hsp70B-HSVtk* 코딩 서열을 투여하고 열처리를 수행한 마우스는 종양 퇴행 및 상당한 생존율을 나타냈다(Hum. Gene Ther.[인간 유전자 요법] 11:2453 (2000)). 본 분야에 공지된 별도의 열유도성 프로모터는 예를 들어 Chapter 25 of Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies, Fourth Edition CRC Press, Jan. 20th, 2015에서 찾을 수 있다. 본 명세서에 논의된 임의의 열유도성 프로모터는 본 출원의 치료 단백질의 발현을 구동할 수 있다.

[0249] 일부 실시예에서, 프로모터는 산화환원 상태에 의해 유도될 수 있다. 산화환원 상태에 의해 유도될 수 있는 예시적인 프로모터는 유도성 프로모터 및 저산소증 유도성 프로모터를 포함한다. 예를 들어, Post DE 등은 HIF 활성 종양 세포에서 전이유전자 발현을 특이적이고 강력하게 유도하는 저산소증 유도 인자(HIF) 응답 프로모터를 개발하였다(Gene Ther. 8: 1801-1807 (2001); Cancer Res. 67: 6872-6881 (2007)).

[0250] 일부 실시예에서, 프로모터는 변형된 면역 세포의 생리학적 상태(예컨대 내인성 활성화 신호)에 의해 유도될 수 있다. 일부 실시예에서, 여기서 변형된 면역 세포는 T세포이고, 프로모터는 변형된 T세포의 내인성 활성화 신호

에 의해 유도될 수 있는 T세포 활성화 의존성 프로모터이다. 일부 실시예에서, 변형된 T세포는 유도물(예컨대 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA), 이오노마이신 또는 렉틴)에 의해 활성화된다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체(예컨대 CAR, TCR 또는 TAC)를 통해 종양 세포 상의 종양 항원을 인식하여 변형된 T세포를 활성화한다. 일부 실시예에서, T세포 활성화 의존성 프로모터는 IL-2프로모터이다. 일부 실시예에서, T세포 활성화 의존성 프로모터는 NFAT프로모터이다. 일부 실시예에서, T세포 활성화 의존성 프로모터는 NFκB프로모터이다.

[0251] 본 명세서에 기재된 하나 또는 복수의 이종 핵산 서열은 이종 유전자 발현 키트에 존재할 수 있고, 상기 이종 유전자 발현 키트는 하나 또는 복수의 단백질 코딩 서열 및 선택적 하나 또는 복수의 프로모터를 포함한다. 일부 실시예에서, 이종 유전자 발현 키트는 단일 단백질 코딩 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 이종 유전자 발현 키트는 단일 프로모터에 의해 구동되는 두 개 또는 그 이상의 단백질 코딩 서열(즉, 폴리시스트론)을 포함한다. 일부 실시예에서, 이종 유전자 발현 키트는 하나 또는 복수의 조절 서열(예컨대 5'UTR, 3'UTR, 인핸서 서열, IRES, 전사 종결 서열), 재조합 부위, 하나 또는 복수의 선택 마커(예컨대 항생제 내성 유전자, 리포터 유전자 등), 신호 서열 또는 이들의 조합을 더 포함한다.

[0252] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 중 어느 하나를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 제1 핵산 서열 및 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 서열은 자가 절단성 링커(예컨대 P2A, T2A, E2A 또는 F2A 펩티드)를 코딩하는 제3 핵산 서열을 통해 조작된 수용체를 코딩하는 제2 핵산 서열에 융합된다. 일부 실시예에서, P2A 서열은 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO: 24)이다. 일부 실시예에서, 제1 벡터 및 제2 벡터를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 제1 벡터는 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하며, 상기 제2 벡터는 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR(예를 들어, CD19 CAR 또는 CLL1 CAR)을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공하고, 여기서 상기 제1 핵산 서열은 자가 절단성 링커(예컨대 P2A)를 코딩하는 제3 핵산 서열을 통해 상기 제2 핵산 서열에 융합된다. 일부 실시예에서, 벡터는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0253] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 중 어느 하나를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 제1 핵산 서열, 본 명세서에 기재된 제2 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 제2 핵산 서열 및 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 서열은 자가 절단성 링커(예컨대 P2A, T2A, E2A 또는 F2A 펩티드)를 코딩하는 제4 핵산 서열을 통해 조작된 수용체를 코딩하는 제2 핵산 서열에 융합된다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 서열은 자가 절단성 링커(예컨대 P2A, T2A, E2A 또는 F2A 펩티드)를 코딩하는 제5 핵산 서열을 통해 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제3 핵산 서열에 별도로 융합된다. 일부 실시예에서, P2A 서열은 GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP(SEQ ID NO: 24)이다. 일부 실시예에서, 제1 벡터, 제2 벡터 및 제3 벡터를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 제1 벡터는 본 명세서에 기재된 제1 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하며, 상기 제2 벡터는 본 명세서에 기재된 제2 폴리펩티드 중 어느 하나를 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하고, 상기 제3 벡터는 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 제3 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR(예를 들어, CD19 CAR 또는 CLL1 CAR)을 코딩하는 제1 핵산 서열, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산 서열 및 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공하고, 그중 제1 핵산 서열은 자가 절단성 링커(예컨대 P2A)를 코딩하는 제4 핵산 서열을 통해 제2 핵산 서열에 융합되며, 그중 제2 핵산 서열은 자가 절단성 링커(예컨대 P2A)를 코딩하는 제5 핵산 서열을 통해 제3 핵산 서열에 융합된다. 일부 실시예에서, 벡터는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0254] "벡터"는 단리된 핵산을 포함하는 조성물이고, 단리된 핵산을 세포 내부로 전달하는데 사용될 수 있다. 본 분야에 공지된 많은 벡터는 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연관된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 생체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 또는 복수의 선택적 마커를 함유한다. 용어 "벡터"는 또한 폴리라이신 화합물, 리포솜 등과 같이 핵산을 세포로 전달하는 것을 촉진하는 비플라스미드 및 비바이러스 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0255] 일부 실시예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터의 구현예는 아데노바이러스벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스벡터, 우두 벡터, 단순포진 바이러스 벡터 및 이의 유도체를 포

함하지만 이에 한정되지 않는다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Sambrook 등(2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) 및 다른 바이러스학 및 분자생물학 매뉴얼에 설명되어 있다.

[0256] 포유동물 세포로의 유전자 전달을 위해 다수의 바이러스 기반 시스템이 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 당업계에 공지된 기술을 사용하여 이종 핵산을 벡터에 삽입하고 레트로바이러스 입자에 패키징할 수 있다. 다음 재조합 바이러스를 분리하여, 체외 또는 생체외에서 변형된 면역 세포에 전달할 수 있다. 많은 레트로바이러스 시스템은 당업계에 공지된 것이다. 일부 실시예에서, 아데노바이러스벡터를 사용한다. 일부 실시예에서, 렌티바이러스 벡터를 사용한다. 일부 실시예에서, 자가-불활성화 렌티바이러스 벡터를 사용한다. 예를 들어, 본 분야에 공지된 방안을 사용하여 자가-불활성화 렌티바이러스 벡터를 패키징할 수 있다. 본 분야에 공지된 방법을 사용하여, 얻은 렌티바이러스 벡터를 포유동물 세포(예컨대 인간 T세포)를 형질도입하는데 사용할 수 있다.

[0257] 일부 실시예에서, 벡터는 비바이러스 벡터(예컨대 플라스미드) 또는 에피솜 발현 벡터이다.

[0258] 일부 실시예에서, 벡터는 발현 벡터이다. “발현 벡터”는 선택된 숙주를 형질전환시키고 선택된 숙주에서의 발현을 위한 코딩 서열을 제공하는데 사용될 수 있는 작제물이다. 발현 벡터는 예를 들어 클로닝 벡터, 바이너리 벡터 또는 통합 벡터일 수 있다. 발현은 바람직하게는 핵산 분자를 번역 가능한 mRNA로 전사하는 것을 포함한다. 진핵 세포에서의 발현을 보장하는 조절 요소는 당업자에게 숙지된 것이다. 진핵 세포의 경우, 이들은 일반적으로 전사 개시를 보장하는 프로모터와 선택적 전사 종결 및 전사물의 안정화를 보장하는 폴리A신호를 포함한다. 진핵 숙주 세포에서 발현을 허용하는 조절 요소의 구현예는 효모의 AOX1 또는 GAL1 프로모터 또는 포유동물 및 기타 동물 세포의 CMV-, SV40-, RSV-프로모터(로우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus)), CMV-인핸서, SV40-인핸서 또는 글로빈 인트론이다. 또한, 사용된 발현 시스템에 따라, 폴리펩티드를 세포 구획으로 유도하거나 매질로 분비할 수 있는 신호 펩티드(예를 들어, 리더 서열)를 상기 핵산 서열의 코딩 서열에 첨가할 수 있고, 이러한 신호 펩티드는 본 분야에 공지된 것이다. 하나 또는 복수의 신호 펩티드는 적절한 단계에서 번역, 개시 및 종결 서열과 함께 조립되고, 바람직하게는, 번역된 단백질 또는 이의 일부의 분비를 주변 세포질 공간 또는 세포외 매질의 신호 펩티드로 분비하도록 유도할 수 있다. 선택적으로, 핵산 서열은 원하는 특성(예를 들어, 발현된 재조합 생성물의 안정화 또는 단순화된 정제)을 부여하는 N-말단 감정 펩티드를 포함하는 융합 단백질을 코딩할 수 있다. 적합한 발현 벡터는 본 분야에 공지된 것으로, 예를 들어 Okayama-Berg cDNA 발현 벡터 pcDV1(Pharmacia), pEF-Neo, pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3(Invitrogen), pEF-DHFR 및 pEF-ADA(Raum et al., Cancer Immunol Immunother (2001) 50(3), 141-150) 또는 pSPORT1(GIBCO BRL)이다.

[0259] ***제조 방법***

[0260] 본 출원은 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포 중 어느 하나를 제조하는 방법을 제공한다.

[0261] 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 핵산 및 선택적으로 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 핵산을 전구체 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는 변형된 면역 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK-T세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 세포독성 T세포이다. 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 γδT세포이다. 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 종양 침윤 T세포 또는 DC 활성화 T세포이다. 일부 실시예에서, 전구체 면역 세포는 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 조작된 수용체 중 어느 하나를 코딩하는 제3 핵산을 전구체 면역 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함한다.

[0262] 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 변형된 T세포 수용체(TCR)이다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 서열, 선택적 제2 핵산 서열 및 제3 핵산 서열은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 서열, 선택적 제2 핵산 서열 및 제3 핵산 서열은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 선택적 제2 핵산 및/또는 제3 핵산 서열은 동일한 벡터 상에 있다. 일부 실시예에서, 제1 핵산 및 선택적 제2 핵산 및/또는 제3 핵산 서열은 별개의 벡터 상에 있다. 일부 실시예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시예에서, 벡터는 비바이러스 벡터이다. 일부 실시예에서, 벡터는 에피솜 발현 벡터이다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 제1 핵산 서열 및/또는 제2 핵산 서열을 포함하는 면역 세포를 분리하거나 농축하

는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 변형된 면역 세포를 조제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0263] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 핵산 또는 벡터 중 어느 하나를 포함하는 단리된 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체, 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체를 코딩하는 핵산 또는 벡터의 발현 또는 클로닝에 사용될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 원핵 세포, 진균 세포, 효모 세포 또는 고등 진핵 세포(예컨대 포유동물 세포)를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 제1 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터, 제2 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터 및 제3 폴리펩티드(예를 들어, 조작된 수용체)를 코딩하는 제3 벡터를 포함한다. 일부 실시예에서, 숙주 세포는 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및 제3 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산을 함유하는 단일 벡터를 포함한다.

[0264] 본 분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 전구체 면역 세포를 제조할 수 있다. 예를 들어, 일차 면역 세포(예컨대 T세포)는 말초 혈액 단핵구, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막삼출액, 비장 조직 및 종양을 포함하는 다양한 기원으로부터 획득할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 분야에 공지된 다양한 기술(예컨대 FICOLL™ 분리)을 사용하여 개체로부터 수집된 혈액 단위로부터 면역 세포(예컨대 T세포)를 획득할 수 있다. 일부 실시예에서, 개체의 순환 혈액으로부터 유래된 세포는 성분채집술(apheresis)에 의해 얻어진다. 성분채집술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 일부 실시예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 부분을 제거할 수 있고, 후속 처리 단계를 위해 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣는다. 일부 실시예에서, 세포는 인산염 완충 식염수(PBS) 또는 2가 양이온(예컨대 칼슘 및 마그네슘)이 결여된 세척 용액으로 세척된다. 당업자가 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이, 세척 단계는 당업자에게 공지된 방법으로 완료될수 있고, 예를 들어 제조업체의 지침에 따라 반자동 “유통형(flow-through)” 원심분리기(예를 들어, Cobe 2991세포 처리기, Baxter CytoMate 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 사용한다. 세척 후, 세포를 Ca^{2+}가 없고, Mg^{2+}가 없는 PBS, PlasmaLyte A 또는 완충액을 함유하거나 함유하지 않는 기타 식염수 용액과 같은 다양한 생체 적합성 완충액에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 단일 샘플의 원하지 않는 구성 성분을 제거하고, 세포를 배지에 직접 재현탁시킬 수 있다.

[0265] 일부 실시예에서, 예를 들어 PERCOLL™ 구배 원심분리 또는 역류 원심분리 용출을 통해 적혈구를 용해시키고 단핵구를 소모하여 말초 혈액 림프구로부터 일차 T세포를 단리한다. 양성 또는 음성 선택 기술을 통해 $CD3^+$, $CD28^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, CD45RA 및 CD45RO세포와 같은 T세포의 특정 하위 집단을 추가로 단리할 수 있다. 예를 들어, 일 실시예에서, 항CD3/항CD28(즉, 3×28) 접합 비드, 예컨대 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T와 함께 인큐베이션하여 원하는 T세포의 시간대를 양성으로 선택하여 충분한 시간 동안 T세포를 분리한다.

[0266] 일부 실시예에서, 음성으로 선택된 세포에 특이적인 표면 마커에 대한 항체의 조합을 사용하여 음성 선택을 통해 T세포 집단을 추가로 농축할 수 있다. 예를 들어, 음성으로 선택된 세포에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단일 클론 항체의 혼합물을 사용하는 음성 자기 면역 부착 또는 유세포 분석을 통한 세포 분류 및/또는 선택을 포함하는 방법에 관한 것이다. 예를 들어, 음성 선택을 통해 $CD4^+$세포를 농축하기 위하여, 단일 클론 항체 혼합물은 일반적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 실시예에서, 일반적으로 $CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^{hi}$, $GITR^+$ 및 $FoxP3^+$을 발현하는 조절T세포를 농축하거나 양성으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 일부 실시예에서, 항C25 접합 비드 또는 다른 유사한 선택 방법에 의해 T조절 세포를 소모한다.

[0267] 벡터 또는 핵산을 숙주 세포(예컨대 전구체 면역 세포)에 도입하는 방법은 본 분야에 공지된 것이다. 물리적, 화학적 또는 생물학적 방법을 통해 벡터 또는 핵산을 숙주 세포에 전이시킬 수 있다.

[0268] 하나 또는 복수의 벡터 또는 하나 또는 복수의 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 물리적 방법에는 인산칼슘 침전, 지질 형질감염, 입자 충격, 미세주입, 전기천공 등이 포함된다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 함유하는 세포의 생성 방법은 당업계에 잘 알려진 것이다. 예를 들어, Sambrook et al., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York를 참조한다. 일부 실시예에서, 전기천공에 의해 벡터를 세포에 도입한다.

[0269] 하나 또는 복수의 벡터 또는 하나 또는 복수의 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 생물학적 방법에는 DNA 및 RNA 벡터의 사용이 포함된다. 바이러스 벡터는 유전자를 인간 세포와 같은 포유동물에 삽입하기 위한 가장 널리

사용되는 방법이 되었다.

[0270] 하나 또는 복수의 벡터 또는 하나 또는 복수의 핵산을 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 방법에는 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드 및 수중유 에멀젼, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 비롯한 지질 기반 시스템과 같은 콜로이드 분산 시스템이 포함된다. 시험관내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포좀(예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0271] 일부 실시예에서, 형질도입되거나 형질감염된 전구체 면역 세포를 하나 또는 복수의 이종 핵산을 도입한 후 생체외에서 증식시킨다. 일부 실시예에서, 형질도입되거나 형질감염된 전구체 면역 세포는 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일 또는 14일 중 어느 하나의 기간 동안 증식되도록 배양한다. 일부 실시예에서, 형질도입되거나 형질감염된 전구체 면역 세포는 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일 또는 14일 중 어느 하나 이하의 기간 동안 배양한다. 일부 실시예에서, 형질도입되거나 형질감염된 전구체 면역 세포를 추가로 평가하거나 스크리닝하여 변형된 면역 세포를 선택한다.

[0272] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절 서열의 기능을 평가하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 발현되지 않는 유전자이며, 상기 리포터 유전자는 폴리펩티드를 코딩하고, 상기 폴리펩티드의 발현은 검출이 용이한 일부 특성(예를 들어, 효소 활성)에 의해 나타난다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용 세포에 도입된 후 적합한 시간에 검출된다. 적합한 리포터 유전자는 루시퍼라제, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제, 분비성 알칼리성 포스파타제를 코딩하는 유전자 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어, Ui-Tei et al., FEBS Letters 479: 79-82 (2000)).

[0273] 전구체 면역 세포에서 하나 또는 복수의 이종 핵산의 존재를 입증하는 다른 방법에는 예를 들어 당업자가 숙지하는 DNA 블로팅과 RNA 블로팅, RT-PCR 및 PCR과 같은 분자 생물학 측정; 면역학적 방법(예컨대 ELISA 및 단백질 블로팅)을 통해 특정 펩티드의 유무를 검출하는 생물학적 측정이 포함된다.

[0274] **III. 치료 방법**

[0275] 본 출원의 일 양태는 개체에게 유효량의 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포 중 어느 하나를 투여하는 단계를 포함하는 개체의 질환 또는 병증(예를 들어, 암)을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 출원은 단독으로 투여되거나 다른 요법과 임의의 조합으로 투여될 수 있고, 적어도 일부 양태에서, 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제와 함께 투여될 수 있는 변형된 면역 세포를 고려하였다. 일부 실시예에서, 투여 전에, 변형된 면역 세포를 본 분야에 공지된 적합한 약물 담체 및 부형제와 조합할 수 있다.

[0276] 일부 실시예에서, 개체에게 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 개체(예를 들어, 인간)에서 암(예를 들어, 고형암)을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 약학 조성물은 변형된 면역 세포(예를 들어, CAR-T세포) 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하며, 여기서 변형된 면역 세포는 a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 다량체 표적 분자의 서브 유닛에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합된다. 일부 실시예에서, 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 각각 표적 분자 상의 동일한 표적 부위에 결합된다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 CAR 및 TLR 폴리펩티드(예를 들어, CAR에 융합된 두 개 또는 그 이상의 TLR 폴리펩티드)를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항CD20 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물

은 SEQ ID NO: 1을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항GPC3 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 단일 항BCMA CAR 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에

서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 직렬 항BCMA CAR 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인, TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분), P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0277] 일부 실시예에서, 개체에게 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 개체(예를 들어, 인간)에서 암

(예를 들어, 고형암)을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 약학 조성물은 변형된 면역 세포(예를 들어, CAR-T세포) 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하며, 여기서 변형된 면역 세포는 a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; 및 b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 여기서 제1 표적 결합 도메인 및 제2 결합 도메인은 동일한 표적 분자에 결합되고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인은 각각 단일 표적 분자 상의 상이한 비중첩 표적 부위에 결합되며, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체와 같은 조작된 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 CAR 및 TLR 폴리펩티드(예를 들어, CAR에 융합된 두 개 또는 그 이상의 TLR 폴리펩티드)를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항CD20 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항GPC3 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 단일 항BCMA CAR 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서,

CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 직렬 항BCMA CAR 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호

펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인, TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분), P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK 세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0278] 일부 실시예에서, 개체에게 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 개체(예를 들어, 인간)에서 암(예를 들어, 고형암)을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 약학 조성물은 변형된 면역 세포(예를 들어, CAR-T세포) 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하며, 여기서 변형된 면역 세포는 a) i) 제1 표적 결합 도메인, ii) 제1 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제1 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제1 폴리펩티드; b) i) 제2 표적 결합 도메인, ii) 제2 TLR 막횡단 도메인, 및 iii) 제2 TLR 신호 전달 도메인을 포함하는, 제2 폴리펩티드를 포함하되, 및 c) 조작된 수용체를 포함하되, 여기서 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함하고, 그중 제1 표적 결합 도메인 및 제2 표적 결합 도메인이 이들의 대응하는 표적에 결합될 때, 제1 TLR 신호 전달 도메인 및 제2 TLR 신호 전달 도메인은 서로 결합되어 TLR 신호 전달을 유도할 수 있는 TLR 신호 전달 모이어티를 형성한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 제1 폴리펩티드 및/또는 제2 폴리펩티드와 동일한 표적 분자 상의 비중첩 표적 부위를 특이적으로 인식하는 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시예에서, 조작된 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), 조작된 TCR 또는 T세포 항원 커플러(TAC) 수용체이다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 CAR 및 TLR 폴리펩티드(예를 들어, CAR에 융합된 두 개 또는 그 이상의 TLR 폴리펩티드)를 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항CD20 TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD20 scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 1을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CD19 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 59를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CD19 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 60을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항GPC3 CAR 및 항NKG2D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 57을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항GPC3 scFv, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항NKG2D ECD, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 58을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 단일 항BCMA CAR 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 62를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 63을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 단일 항BCMA sdAb, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 64를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 직렬 항BCMA CAR 및 항BCMA TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 61을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항BCMA CAR(예를 들어, 단일 항BCMA CAR 또는 직렬 항BCMA CAR) 및 항GPRC5D TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1

차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 65를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD8α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72와 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 72를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 직렬 항BCMA sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항GPRC5D scFv, CD28α 힌지 도메인, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 73을 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 CAR 시스템(예를 들어, CAR 융합 작제물)을 포함하되, 여기서 CAR 융합 작제물은 항CLL1 CAR 및 항CD33(예를 들어, 항CD33 V도메인 및/또는 항CD33 C2도메인) TLR 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD8α 힌지 도메인, CD8α 막횡단(TM) 도메인, 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 sdAb, TLR4 막횡단(TM) 영역 및 TLR4의 세포내 부분(예를 들어, TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 71을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드, 항CLL1 sdAb, CD28α 힌지 도메인, CD28α 막횡단(TM) 도메인, CD28공동 자극 신호 전달 도메인의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인, P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 V도메인sdAb, TLR2 막횡단 도메인, TLR2 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR2의 세포내 부분), P2A 절단 부위, 신호 펩티드, 항CD33 C2도메인sdAb, TLR1 막횡단 도메인 및 TLR1 신호 전달 도메인(예를 들어, TLR1의 세포내 부분)을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3과 적어도 약 85%(예를 들어, 적어도 약 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 중 어느 하나) 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, CAR 융합 작제물은 SEQ ID NO: 3을 포함한다. 일부 실시예에서, 제1 폴리펩티드는 제1 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 및/또는 제2 폴리펩티드는 제2 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포는 세포독성 T세포, 헬퍼 T세포, 자연 살해(NK) 세포, NK세포, iNK-T세포, NK-T 유사 세포, αβT세포 및 γδT세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0279] 일부 실시예에서, 암을 치료하는 방법은 (1) 암세포 사멸; (2) 암세포의 증식 억제; (3) 말초 T세포의 재분배 유도; (4) 종양에서 면역 응답 유도; (5) 종양 크기 감소; (6) 암을 앓고 있는 개체의 하나 또는 복수의 증상 완화; (7) 종양 전이 억제; (8) 생존 기간 연장; (9) 암 진행까지의 시간 연장; (10) 암 재발 가능성을 예방, 억제 또는 감소; (11) 개체의 삶의 질 향상; (12) 종양에서의 T세포 침윤 촉진 및 (13) 기존 종양의 전이(예컨대 림프절로의 전이) 발생률 또는 부담 감소 중 하나 또는 복수의 생물학적 활성을 갖는다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 이상 중 어느 하나의 종양 세포 사망률을 실현한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 적어도 약 10%(예를 들어, 적어도 약 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 중 어느 하나를 포함)의 종양 크기를 감소시킨다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 적어도 약 10%(예를 들어, 적어도 약 20%, 30%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 중 어느 하나를 포함)의 전이를 억제한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 개체의 생존 기간을 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24 또는 그 이상 중 어느 하나만큼 연장한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 암 진행까지의 시간을 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24개월 또는 그 이상 중 어느 하나만큼 연장한다.

[0280] 본 명세서에 기재된 방법은 고형암과 액상암 양자를 포함하는 다양한 암 치료에 적용된다. 이러한 방법은 초기 암, 비전이암, 원발암, 말기암, 국소진행암, 전이암 또는 관해암을 포함하는 모든 단계의 암에 적용될 수 있다.

본 명세서에 기재된 방법은 보조 치료 또는 신보조 치료에서 제1 요법, 제2 요법, 제3 요법 또는 본 분야에 공지된 다른 유형의 암 요법(예컨대 화학적 요법, 수술, 호르몬 요법, 방사선, 유전자 요법, 면역 요법(예컨대 T 세포 요법), 골수이식, 줄기 세포 이식, 표적화 요법, 냉동 요법, 초음파 요법, 광역동 요법, 고주파 절제 등)과의 조합 요법(즉, 상기 방법은 기본 요법/표적 요법 전에 수행될 수 있음)으로 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 이전에 치료를 받은 개체를 치료하는데 사용된다. 일부 실시예에서, 암은 이전 요법에 불응성이다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 이전에 치료받지 않은 개체를 치료하는데 사용된다.

[0281] 일부 실시예에서, 상기 개체는 낮은 종양 부하를 갖는다. 고형암(RECIST) 1.1 지침의 응답 평가 표준에 따라 고형암의 종양 부하를 측정할 수 있다. Eisenhauer EA et al., European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247을 참조한다. 예를 들어, 치료 기준선에서 측정할 수 있는 종양의 종양 부하는, (1) 종양 병변(예를 들어, CT 스캔, 임상 검사에 의한 캘리퍼 측정 및/또는 흉부 X-선에 의함) 및 (2) 악성 림프절을 기반으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 고형암의 종양 부하는 5개의 표적 병변(장기당 최대 2개)의 직경의 합으로 정량화할 수 있다. 방사선 전문의가 평가한 Cheson 2007 표준에 따라, 액체 암종의 종양 부하를 최대 6개의 인덱스 병변의 생성물 직경의 합으로 측정할 수 있다. Cheson BD et al., J. Clin. Oncol., 2007; 25(5): 579-586을 참조한다. 일부 실시예에서, 낮은 종양 부하를 갖는 개체의 종양 부하는 약 4×10^3, 3×10^3, 2×10^3, 1×10^3, 5×10^2, 2×10^2, 1×10^2 또는 그 이하의 mm^2 중 어느 하나를 초과하지 않는다.

[0282] 일부 실시예에서, 상기 개체는 치료를 받은 후 3등급 또는 4등급의 부작용을 경험하지 않는다. 부작용은 부작용 통용 용어 표준 v3.0(CTCAE)에 따라 매겨졌다. 일부 실시예에서, 상기 개체는 치료 후 사이토카인 폭풍을 경험하지 않는다.

[0283] 본 명세서에 기재된 방법에서 투여되는 변형된 면역 세포의 유효량은 치료되는 암의 특정 유형 및 단계, 투여 경로, 제1 폴리펩티드, 제2 폴리펩티드 및/또는 조작된 수용체의 활성과 같은 많은 요인에 따라 달라질 것이다. 적절한 투여량 방안은 의사가 임상 요인에 기반하여 결정할 수 있고, 이러한 임상 요인은 환자의 체형, 체표면적, 연령, 투여할 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강 상태 및 동시에 투여되는 기타 약물을 포함한다. 일부 실시예에서, 약학 조성물의 상기 유효량은 독성학적 효과(즉, 임상적으로 허용 가능한 독성 수준을 초과한 효과)를 유도하는 수준 미만이거나, 약학 조성물이 개체에게 투여될 때 제어되거나 잠재적인 부작용 내성 수준이다. 일부 실시예에서, 약학 조성물의 유효량은 약 10^5 내지 약 10^{10}개의 변형된 면역 세포을 포함한다.

[0284] 일부 실시예에서, 약학 조성물은 1회 투여된다(예를 들어, 볼루스 주사). 일부 실시예에서, 약학 조성물은 여러 회(예컨대 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상 중 어느 하나) 투여된다. 여러 회 투여되는 경우, 동일하거나 상이한 경로로 투여될 수 있고, 동일한 부위 또는 대체 부위에 투여될 수 있다. 약학 조성물은 1일 1회에서 1년에 1회와 같은 적합한 빈도로 투여될 수 있다. 환자의 질환 징후를 모니터링하고 상응하게 치료를 조절하며, 의료 분야의 숙련된 자는 특정 환자에 대한 최적의 복용량과 치료 방안을 용이하게 결정할 수 있다.

[0285] 일부 실시예에서, 치료될 개체는 포유동물이다. 포유동물의 구현예는 인간, 원숭이, 래트, 마우스, 햄스터, 기니아 피그, 개, 고양이, 토끼, 돼지, 양, 염소, 말, 소 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 상기 개체는 인간이다.

[0286] ***약물 조성물***

[0287] 본 출원은 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포 중 어느 하나 및 선택적 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 더 제공한다.

[0288] 본 출원인의 약학 조성물은 임의의 수의 변형된 면역 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 단일 카피의 변형된 면역 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 적어도 약 1, 10, 100, 1000, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 또는 더 이상의 카피 중 어느 하나의 변형된 면역 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 단일 유형의 변형된 면역 세포를 포함한다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 적어도 두 가지 유형의 변형된 면역 세포를 포함하고, 여기서 상이한 유형의 변형된 면역 세포의 차이점은 세포 기원, 세포 유형, 발현된 키메라 수용체 및/또는 프로모터 등이다.

[0289] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "담체"는 사용된 투여량 및 농도에서 노출되는 세포 또는 개체에 독성이 없는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정제를 포함한다. 생리학적으로 허용 가능한 담체는 일반적으로

pH 완충 수용액이다. 적합한 약물 담체의 구현예는 본 분야에 공지된 것이고, 인산염 완충 식염수 용액, 물, 오일/물 에멀젼과 같은 에멀젼, 다양한 유형의 습윤제, 멸균 용액 등을 포함한다. 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 독성을 나타내지 않는다.

[0290] 이러한 담체를 포함하는 약학 조성물은 공지된 통상적인 방법에 의해 조제될 수 있다. 용매 또는 희석제는 바람직하게는 등장성, 저장성 또는 약 고장성이며, 상대적으로 낮은 이온 강도를 갖는다. 대표적인 구현예는 멸균수, 생리 식염수(예를 들어, 염화나트륨), 링거 용액, 포도당, 트레할로스 또는 수크로스 용액, 행크 용액(Hank's solution) 및 기타 생리학적 균형잡힌 식염수 용액을 포함한다(예를 들어 최근 버전의 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins을 참조).

[0291] 본 명세서에 기재된 약학 조성물은 임의의 적합한 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 비경구, 경피(진피 진입), 관내, 동맥내(동맥 진입), 근육내(근육 진입), 척수강내 또는 정맥내로 투여된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 피하(피부 내)로 투여된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 정맥내로 투여된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 주입 또는 주사를 통해 개체에게 투여된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 내부 또는 외부 표적 부위로의 생물학적 전달에 의해 또는 카테터를 통해 동맥 부위로의 전달과 같이 표적 부위에 직접 투여된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 국소적으로(예를 들어, 종양내) 투여된다. 투여는 대상체에게 하나 또는 복수의 활성제의 전달을 촉진하거나 개선하는 통상적인 주사기 및 니들 또는 본 분야에서 획득할 있는 임의의 화합물 또는 장치를 사용할 수 있다.

[0292] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 수용액 또는 비수용액, 현탁액 및 에멀젼을 포함한다. 비수성 용매의 구현예는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 기름(예컨대 올리브유) 및 주사 가능한 유기 에스테르(예컨대 에틸 올레이트)이다. 수성 담체는 물, 알코올/수용액, 식염수 및 완충 매질을 포함한 에멀젼 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 포도당, 포도당 및 염화나트륨, 젖산 링거 용액 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예컨대 링거 포도당 기반 보충제) 등을 포함한다. 방부제와 항균제, 항산화제, 킬레이트제, 불활성 가스 등의 기타 첨가제도 존재할 수 있다. 또한, 본 개시의 약학 조성물은 예를 들어 바람직하게는 인간 유래의 혈청 알부민 또는 면역글로블린과 같은 단백질 담체를 포함할 수 있다. 본 분야에서 냉동, 액체 또는 동결건조 형태를 이루는 다양한 바이러스 조제품을 획득할 수 있다(예를 들어, WO 98/02522, WO 01/66137, WO 03/053463, WO 2007/056847 및 WO 2008/114021 등). 고체(예를 들어, 건조 분말 고체 또는 동결건조된 고체) 조성물은 진공 건조 및 동결건조를 포함하는 방법에 의해 획득할 수 있다(예를 들어 WO 2014/053571을 참조). 본 개시의 약학 조성물은 약학 조성물의 원하는 용도에 따라 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포 외에 다른 생물 활성제를 더 포함할 수 있는 것으로 고려된다.

[0293] 일부 실시예에서, 약학 조성물은 인간 사용에 적절하게 완충된다. 적합한 완충액에는 인산염 완충액(예를 들어, PBS), 탄산수소염 완충액 및/또는 생리학적 또는 약알칼리성 pH(예를 들어, 약 pH 7 내지 약 pH 9)를 유지할 수 있는 Tris 완충액이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 또한 적합한 장력 조절제(예컨대 글리세롤)를 첨가하여 혈액과 등장되도록 할 수 있다.

[0294] 일부 실시예에서, 약학 조성물은 일회용 바이알(예컨대 일회용 밀봉 바이알)에 함유된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 다용도 바이알에 함유된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 용기에 벌크로 함유된다.

[0295] 일부 실시예에서, 약학 조성물은 개체에 대한 투여를 위한 특정 표준을 충족시켜야 한다. 예를 들어, 미국 식품의약국은 21 CFR 610 및 21 CFR 610.13을 포함하여 세포 기반 면역 치료 제품에 대한 표준을 설정하는 규제 지침을 발표하였다. 약학 조성물의 외관, 특성, 순도, 안전성 및/또는 효능을 평가하는 방법은 본 분야에 공지되어 있다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 세포 배양에 사용되는 변형된 면역 세포 이외의 동물 기원의 단백질과 같이 알레르기 효과를 생성할 수 있는 외래 단백질을 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 실시예에서, “실질적으로 함유하지 않는”은 약학 조성물의 총 부피 또는 중량의 약 10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 1 ppm 또는 그 이하 중 어느 하나 미만이다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 GMP 수준 워크숍(GMP-level workshop)에서 제조된다. 일부 실시예에서, 비경구 투여의 경우, 약학 조성물은 약 5 EU/kg체중/시간 미만의 내독소를 포함한다. 일부 실시예에서, 정맥내 투여의 경우, 약학 조성물 중 적어도 약 70%의 변형된 면역 세포가 생존 가능하다. 일부 실시예에서, 미국 약전(USP)에 기재된 바와 같은 14일 직접 접종 테스트 방법을 사용하여 평가할 때, 약학 조성물은 “무성장”의 결과를 갖는다. 일부 실시예에서, 약학 조성물을 투여하기 전에, 변형된 면역 세포 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 양자를 포함하는 샘플은 최종 수확 전 약 48-72시간(또는 배양물의 최종 재공급(re-feeding)과 동시에)에 꺼내어 멸균 테스트에 사용된다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 마이코플라스마 오염을 함유하지 않는다. 일부 실시예에서, 약학 조성물은 검출할 수 있는 미생물 제제를 함유하지 않는다.

일부 실시예에서, 약학 조성물은 HIV I형, HIV II형, HBV, HCV, 인간 T림프 친화 바이러스I형; 및 인간 T림프 친화 바이러스II형과 같은 감염원을 함유하지 않는다.

[0296] **IV. 키트 및 제품**

[0297] 본 명세서에 기재된 변형된 면역 세포 중 어느 하나 또는 조성물(예를 들어, 약학 조성물)을 포함하는 키트, 단위 투여량 및 제품이 더 제공된다. 일부 실시예에서, 본 명세서에 따른 약학적 조성물 중 어느 하나를 포함하는 키트를 제공하며, 바람직하게는 그의 사용 지침을 제공한다. 일부 실시예에서, 변형된 면역 세포 이외에, 키트는 화학 요법, 호르몬 요법 및/또는 면역 요법과 같은 2차 암 요법을 더 포함한다. 하나 또는 복수의 키트는 개체의 특정 암에 맞게 맞춤화될 수 있고, 개체에게 적합한 2차 암 요법을 포함할 수 있다.

[0298] 키트는 변형된 면역 세포의 증식 또는 유도를 허용하는 용기, 시약, 배지, 유도물, 사이토카인, 완충액, 항체 등과 같은 하나 또는 복수의 별도의 구성 성분을 포함할 수 있다. 키트는 약학 조성물을 종양 부위에 국소 투여(예컨대 종양내 주사)하기 위한 장치를 더 포함할 수 있다.

[0299] 본 출원의 키트는 적합한 포장에 있다. 적합한 포장에는 바이알, 병, 단지, 플랙시블 패키징(예를 들어, 밀봉된 마일라 또는 비닐 백) 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 키트는 선택적으로 완충액 및 해석 정보와 같은 다른 구성 요소를 제공할 수 있다. 따라서 본 출원은 바이알(예를 들어, 밀봉된 바이알), 병, 항아리, 가요성 포장 등을 포함하는 제품을 더 제공한다. 키트의 일부 구성 성분은 수성 매질 또는 동결건조 형태로 포장될 수 있다.

[0300] 상기 제품은 용기 및 상기 용기 상에 있거나 상기 용기와 연관된 태그 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 용기는 다양한 재료(예를 들어, 유리 또는 플라스틱)로 형성될 수 있다. 일반적으로, 용기는 본 명세서에 기재된 질환 또는 병증(예컨대 암)을 효과적으로 치료하는 조성물을 수용하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥 주사 용액 백 또는 피하 주사침으로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알일 수 있음). 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 개체의 특정 병태를 치료하는데 사용됨을 나타낸다. 태그 또는 포장 삽입물에는 개체에게 조성물을 투여하기 위한 지침이 추가로 포함될 것이다. 라벨에는 재구성 및/또는 사용 지침이 표시되어 있을 수 있다. 약학적 조성물을 수용하는 용기는 재구성된 제형의 반복 투여(예를 들어, 2-6회 투여)를 허용하는 여러 회 사용되는 바이알일 수 있다. 패키지 삽입물은 치료 제품의 사용에 관한 적응증, 용법, 용량, 투여, 금기 사항 및/또는 경고에 대한 정보를 포함하는 치료 제품의 상업용 패키지에 일반적으로 포함되는 지침을 의미한다. 대안적으로, 제품은 약학적으로 허용 가능한 완충액, 예를 들어 정균 주사용수(BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거 용액 및 포도당 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충액, 희석제, 필터, 주사침 및 주사기를 포함하는 상업적 및 사용자 관점에서 원하는 대로 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.

[0301] 키트 또는 제품은 약국(예를 들어, 병원 약국 및 조제 약국)에서 보관 및 사용하기에 충분한 양으로 포장된 복수의 단위 용량의 약학적 조성물 및 사용 설명서를 포함할 수 있다.

[0302] 구현예

[0303] 이하 구현예는 본 개시를 예시하기 위한 것일 뿐이므로, 어떠한 방식으로든 본 개시를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이하 구현예 및 상세한 설명은 설명으로서 제공되며 제한으로서 제공되지 않는다.

[0304] **구현예 1: 외인성 도입된 CD19 및 CD20 Toll 유사 수용체(TLR) 도메인을 발현하는 CAR-T세포의 제조**

[0305] 이 구현예는 외인성 도입된 Toll 유사 수용체(TLR) 도메인을 발현하는 예시적인 무장한 CAR-T세포의 구축을 나타낸다. 특히, 이 구현예는 CD19 및/또는 CD20을 발현하는 CAR-T세포의 구축을 나타낸다.

[0306] ***1.1. 키메라 항원 수용체(CAR)의 구축***

[0307] CD19-공동CD20 CAR(SEQ ID NO: 1)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD19 scFv(SEQ ID NO: 6), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD20 scFv(SEQ ID NO: 11), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다. 이 작제물은 도 1에 도시된다. CAR 백본

및 공동 자극 분자를 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 2세대 렌티바이러스 벡터)에 클로닝하고, 체외 전사를 위해 구성적 hEF1α 프로모터에 다운스트림 및 작동 가능하게 연결된다. *Blood* (2006) 108 (12): 3890-3897에 예시된 바를 참조하고, 일시적인 레트로바이러스 상청액을 생성하였다.

[0308] 상술한 바와 같이 4-1BB를 공동 자극 도메인으로서 함유하는 제2 CD19 CAR 백본(“CD19 BM CAR”)을 제조하고, 이는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD19 scFv(SEQ ID NO: 6), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9) 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함하여, 비교 분석에 사용하였다.

[0309] ***1.2. CAR-T세포의 구축***

[0310] **바이러스 제조**

[0311] pCMV-ΔR-8.47 및 pMD2.G를 포함하는 렌티바이러스 패키징 플라스미드 혼합물은 Addgene에서 구입하고, 적절한 CAR 코딩 플라스미드와 미리 최적화된 비율로 폴리에틸렌이민과 혼합하였다. HEK293세포를 렌티바이러스 및 CAR 작제물의 혼합물로 형질감염시키고, 밤새 배양하였다. 밤새 배양한 후, 상청액을 수집하였다. 상청액을 원심분리하여 세포 잔해를 추가로 제거하고, 0.45 μm PES 필터를 통해 여과하였다. 바이러스 입자를 펠렛화하고 미리 냉각된 DPBS로 세척하였다. 바이러스를 분취하여 즉시 -80° C에서 보관하고, 유세포 분석법을 사용하여 supT1 세포주 형질도입 효율을 측정하여 바이러스 역가를 결정하였다.

[0312] **T세포의 바이러스 형질도입**

[0313] 성분채집을 통해 건강한 기증자로부터 백혈구를 수집하였다. FICOLL-PAQUE™ PLUS 배지를 사용하여 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 분리하고, Pan T세포 분리 키트(Miltenyi)를 사용하여 PMBC로부터 인간 T세포를 정제하였다. 다음 정제된 T세포를 인간 T세포 활성화/확장 키트(Miltenyi)를 사용하여 48시간 동안 사전 활성화하였다. 사전 활성화 후, 1:2의 비드 대 세포 비율로 항CD3/CD28 MACSiBead™ 입자를 첨가하여 T세포를 증폭시켰다.

[0314] 사전 활성화된 T세포를 8 μg/mL 폴리브렌의 존재 하에 렌티바이러스로 형질도입하였다. 세포를 6웰 조직 배양 플레이트에서 4 × 10^6개 T세포/웰로 배양하고, 37° C에서 대략 48시간 동안 배양하였다. 형질도입된 세포를 원심분리하고, 상청액을 제거하며, 펠릿화된 세포를 배양을 위해 0.5 × 10^6개 세포/mL를 300 IU/ml IL-2가 보충된 신선한 배지에 재현탁시켰다. 2일 내지 3일마다 세포 농도를 0.5 × 10^6개 세포/mL로 조절하였다.

[0315] 단백질L 및 토끼-항sdAb를 CAR 배양된 세포와 혼합하여 T세포에서의 CAR 발현을 검출하여, 세포 표면 scFv 및 sdAb를 각각 검출하였다.

[0316] **구현예 2: CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 세포독성 평가**

[0317] 이 구현예는 CD19-공동CD20 CAR-T세포의 체외 항종양 활성을 나타낸다.

[0318] ***2.1 락테이트 탈수소 효소(LDH) 세포독성***

[0319] 체외에서 조작된 T세포(예를 들어, CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포)의 항종양 활성을 신속하게 평가하기 위해, 세포독성의 락테이트 탈수소 효소(LDH) 측정을 수행하였다. 형질도입 후 제5일 또는 제9일에, CD19-공동CD20 CAR으로 형질도입된 T세포(SEQ ID NO: 1)를 수확하고, 각각 표적 세포(CD19 및 CD20을 발현하는 BLL 종양 Raji세포)와 1:1, 1:0.3의 E/T 비율(이펙터: CAR-T/표적 비율)로 20시간 동안 공동 인큐베이션하였다. CD19 BM CAR-T세포(SEQ ID NO: 2)를 양성 대조군으로 사용하고, 동일한 배치로부터의 형질도입되지 않은 T세포(“UnT”)를 음성 대조군으로 사용하였다. 제조업체의 매뉴얼(Roche)에 따라 측정을 수행하였다.

[0320] 체외 세포독성은 이하의 공식으로 계산된다([LDH]$_{E+T}$: E/T 공동 인큐베이션에서 방출된 LDH, [LDH]$_E$: 이펙터에서만 방출된 LDH, [LDH]$_{max}$: Triton X-100로 처리된 표적 세포에서 방출된 LDH, [LDH]$_{min}$: 미처리 표적 세포에서 방출된 LDH).

[0321] $$\text{세포독성 \%} = \frac{[LDH]_{E+T} - [LDH]_E - [LDH]_{min}}{[LDH]_{max} - [LDH]_{min}} \times 100\%$$

[0322] 테스트된 모든 CAR 작제물(예를 들어, CD19-공동CD20 CAR-T, CD19 BM CAR-T 및 UnT세포)은 모두 인간 T세포에

효율적으로 형질도입되고, CAR 발현율은 25% 내지 60% 사이이다. 동일한 배치의 실험에서, 형질도입되지 않은 T 세포에 비해, 형질도입된 세포의 세포 성장 및 생존력은 영향을 받지 않았다. 도 2에 도시된 바와 같이, CD19 BM CAR-T 및 CD19-공동CD20 CAR-T세포는 체외에서 투여량 의존적 방식으로 표적 세포 용해를 유도하였다. 또한, 낮은 E/T 비율에서, CD19-공동CD20 CAR-T세포는 CD19 BM CAR-T보다 표적 세포에 대해 더 강한 세포독성을 나타낸다.

[0323] *2.2 균질한 시간 분해 형광(HTRF)에 의한 사이토카인 분비*

[0324] 이펙터 T세포 활성화 및 증식의 다른 척도는 IFNɣ 및 TNFα와 같은 이펙터 사이토카인의 생성이다. 체외 세포독성 분석으로부터 상청액을 수집하여 CAR 유도된 사이토카인 방출을 평가하고, 제조업체의 매뉴얼에 따라 IFN-ɣ의 균질한 시간 분해 형광(HTRF) 분석(Cisbio)을 수행하였다.

[0325] CAR-T세포(예를 들어, CD19 BM CAR-T, CD19-공동CD20 CAR-T 및 형질도입되지 않은 "unT" CAR-T세포)를 Raji 표적 세포와 공동 배양하였다. T세포 활성화의 척도로서 24 h 후 배양 상청액을 수집하여 IFNɣ 및 TNFα의 방출을 평가하였다. 도 3 및 도 4에 도시된 바와 같이, 표적 세포와 공동 배양된 CD19-공동CD20 CAR-T세포는 유의한 양의 TNFα 및 IFNɣ를 분비하였다. 또한, TNFα 분비 수준은 양성 대조군 CD19 BM CAR-T세포보다 높았다.

[0326] *2.3 장기 공동 배양 분석*

[0327] CD19-공동CD20 CAR-T세포의 장기 사멸 효능을 평가하기 위하여, 장기 공동 배양 분석을 수행하여 체내의 동적 사멸 과정을 시뮬레이션하였다. 외인성 사이토카인(예를 들어, IL-2)이 존재하지 않는 경우, 형질도입(예를 들어, CD19 BM CAR-T 또는 CD19-공동CD20 CAR-T)되거나 형질도입되지 않은(예를 들어, unT) T세포(1 × 10^5개/웰)를 Raji 표적 세포(4 × 10^5개/웰)와 1:4의 E:T 비율로 24웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 2일 또는 3일 동안 공동 배양한 후, 이러한 세포 중 일부를 수확하여 CD3에 대해 염색하였다. CD3 및 CAR 신호를 통해 CAR-T세포를 감정하였다. 일련의 공동 배양 분석에 있어서, 동일한 E:T 비율로 신선한 Raji 표적 세포를 사용하여 남은 T세포를 다시 공격하였다. 종양 세포가 웰 부피보다 커질 때까지 공동 배양을 수행하였다. 각각의 시점에서의 T세포 증식률은 해당 시점의 T세포 수를 T세포의 초기 수로 나누어 계산하였다.

[0328] 반복적인 종양 자극 분석에서 다양한 CAR-T세포의 사멸 효능은 도 5에 도시된다. CD19 BM CAR-T세포는 5라운드의 종양 자극 후 소진된 반면(예를 들어, CD3%로 측정된 추가 표적 종양 세포를 죽일 수 없음), CD19-공동CD20 CAR-T세포는 7라운드까지 표적 종양 세포를 지속적으로 죽였다. 또한, CD19-공동CD20 CAR-T세포는 체외에서 증식하여 CD19 BM CAR-T세포보다 더 우수한 장기 증폭을 나타낸다(도 6). 이러한 결과는, TLR4신호 전달의 활성화가 CAR-T세포가 고갈에 대한 저항성을 갖도록 하고, 체외에서 표적 종양 세포를 죽이는 능력을 향상시켜, 이러한 치료제 발전에 대한 주요 장애물을 해결하는 것을 입증한다.

[0329] **구현예 3: 외인성 도입된 CLL1 및 CD33 Toll 유사 수용체(TLR) 도메인을 발현하는 CAR-T세포의 제조**

[0330] 이 구현예는 외인성 도입된 Toll 유사 수용체(TLR) 도메인을 발현하는 예시적인 무장한 CAR-T세포의 구축을 나타낸다. 특히, 이 구현예는 CLL1 및/또는 CD33을 발현하는 CAR-T세포의 구축을 나타낸다.

[0331] *3.1. 키메라 항원 수용체(CAR)의 구축*

[0332] 이 구현예는 두 가지 CAR 작제물을 포함한다. CLL1-공동CD33 CAR(SEQ ID NO: 3)으로 명명된 제1 CAR 작제물에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 제1 CAR 작제물은 CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열이며, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CLL1 sdAb(SEQ ID NO: 14), CD28α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 15), CD28 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 16), CD28분자(SEQ ID NO: 17)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 제1 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 제1 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD33 V도메인sdAb(SEQ ID NO: 21), TLR2 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 22) 및 TLR2의 세포내 부분(SEQ ID NO: 23)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다. 또한 제2 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 제2 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD33 C2도메인sdAb(SEQ ID NO: 18), TLR1 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 19) 및 TLR1의 세포내 부분(SEQ ID NO: 20)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 제1 유도성 공동 자극 분자에 연결된다. 이 작제물은 도 7에 도시된다.

[0333] CLL1-공동CD33-2 CAR(SEQ ID NO: 71)으로 명명된 제2 CAR 작제물에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 제2 CAR 작제물은 CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열이며, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CLL1 sdAb(SEQ ID NO: 14), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137)분자(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD33 sdAb(SEQ ID NO: 21), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다. 이 작제물은 도 7에 도시된다.

[0334] CAR 백본 및 공동 자극 분자를 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 2세대 렌티바이러스 벡터)에 클로닝하고, 체외 전사를 위해 구성적 hEF1α 프로모터에 다운스트림 및 작동 가능하게 연결된다. *Blood* (2006) 108 (12): 3890-3897에 예시된 바를 참조하고, 일시적인 레트로바이러스 상청액을 생성하였다.

[0335] 또한 항CLL1 기준 CAR(CLL1 BM CAR)을 코딩하는 작제물은 비교 분석을 위해 상기 기재된 바와 같이 제조되었다(SEQ ID NO: 4).

[0336] 또한 항CLL1/CD33 이중 CAR(CLL1/CD33 이중 CAR)을 코딩하는 작제물은 비교 분석을 위해 상기 기재된 바와 같이 제조되었다(SEQ ID NO: 43).

[0337] ***3.2. T세포의 바이러스 제조 및 형질도입***

[0338] 구현예 1에 기재된 바와 같이 렌티바이러스를 제조하였다. 구현예 1에 설명된 방법에 따라 T세포 림프구를 수집하고 렌티바이러스로 형질도입하였다.

[0339] **구현예 4: CLL1-공동CD33 CAR-T세포의 체외 세포독성 측정**

[0340] 이 구현예는 CLL1-공동CD33 CAR-T 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포의 체외 항종양 활성을 나타낸다.

[0341] ***4.1 락테이트 탈수소 효소(LDH) 세포독성***

[0342] 구현예 2.1에 기재된 바와 같이, 24시간 동안 배양한 후 LDH 분석을 수행하여 세포독성을 측정하였다. CLL1 및 CD33을 발현하는 AML세포주U937을 표적 세포로 사용하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, CLL1 BM CAR-T세포, CLL1-공동CD33 CAR-T 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포는 U937 표적 세포에 대해 상당한 체외 세포독성을 나타낸다.

[0343] ***4.2 균질한 시간 분해 형광(HTRF)에 의한 사이토카인 분비***

[0344] 체외 세포독성 분석으로부터 상청액을 수집하여 CAR 유도된 사이토카인 방출을 평가하고, 제조업체의 매뉴얼 및 구현예 2.2에 따라 IFN-γ의 균질한 시간 분해 형광(HTRF) 분석(Cisbio)을 수행하였다.

[0345] CAR-T세포(예를 들어, CLL1 BM CAR-T세포, CLL1-공동CD33 CAR-T와 CLL1-공동CD33-2 CAR-T 및 형질도입되지 않은 "unT" CAR-T세포)를 U937 표적 세포와 공동 배양하였다. T세포 활성화의 척도로서 24 h 후 배양 상청액을 수집하여 IFNγ 및 TNFα의 방출을 평가하였다. 도 9 및 도 10에 도시된 바와 같이, 표적 세포와 공동 배양된 CLL1-공동CD33 CAR-T 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포는 상당한 양의 TNFα 및 IFNγ를 분비하였다. 또한, TNFα 및 IFNγ 분비 수준은 모두 양성 대조군 CLL1 BM CAR-T세포보다 높았다.

[0346] ***4.3 장기 공동 배양 분석***

[0347] CLL1-공동CD33 CAR-T세포의 장기 사멸 효능을 평가하기 위하여, 장기 공동 배양 분석을 수행하여 체내의 동적 사멸 과정을 시뮬레이션하였다. 외인성 사이토카인(예를 들어, IL-2)이 존재하지 않는 경우, 형질도입되거나(예를 들어, CLL1 BM CAR-T, CLL1-공동CD33 CAR-T 또는 CLL1-공동CD33-2 CAR-T) 형질도입되지 않은(예를 들어, unT) T세포(1×10^5개/웰)를 U937 표적 세포(4×10^5개/웰)와 1:4의 E:T 비율로 24웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 2일 또는 3일 동안 공동 배양한 후, 이러한 세포 중 일부를 수확하여 CD3에 대해 염색하였다. CD3 및 CAR 신호를 통해 CAR-T세포를 감정하였다. 일련의 공동 배양 분석에 있어서, 동일한 E:T 비율로 신선한 U937 표적 세포를 사용하여 남은 T세포를 다시 공격하였다. 종양 세포가 웰 부피보다 커질 때까지 공동 배양을 수행하였다. 각각의 시점에서의 T세포 증식률은 해당 시점의 T세포 수를 T세포의 초기 수로 나누어 계산하였다.

[0348] 반복적인 종양 자극 분석에서 다양한 CAR-T세포의 사멸 효능은 도 11에 도시된다. CLL1 BM CAR-T세포는 재공격

제15일 후에 표적 종양 세포를 죽일 수 없는 반면, CLL1-공동CD33 CAR-T 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포는 제20일까지 표적 종양 세포를 지속적으로 죽였다. 또한, CLL1-공동CD33 CAR-T 및 CLL1-공동CD33-2 CAR-T세포는 체외에서 증식하여 CLL1 BM CAR-T세포보다 더 우수한 장기 증폭을 나타낸다(도 12). 이러한 결과는, 키메라TLR이 효과적인 공동 자극 신호를 제공할 수 있고, CAR신호 전달의 배경 하에서 T세포 생존을 향상시키고 T세포 증식을 증가시키는 것을 입증한다.

[0349] **구현예 5: CLL1-공동CD33 CAR-T 체내 마우스 모델의 평가**

[0350] 도 13에 도시된 방안에 따라, U937-Luc 이종이식 마우스 모델에서 무장한 TLR CAR-T세포의 항종양 활성을 체내에서 평가하였다. 제0일에, 반딧불 루시퍼라제 리포터 유전자 발현을 갖는 2 × 10^6개 U937-Luc세포를 NOD/SCID IL-2Rɣcnull(NSG) 마우스에 피하 이식하였다. 종양 접종 후 매주 또는 격주로 생물발광 이미징(BLI)을 수행하여, 모델의 진행을 모니터링하였다. BLI 광자 수와 동물 체중을 기반으로 동물을 무작위로 그룹화하였다. 무작위 그룹화 후, 정맥내에 단일 투여량의 CAR-T세포 또는 UnT세포를 주입하였다. BLI 이미징을 매주 수행하여 종양 성장을 기록하였다. 생물발광 이미징(BLI)에 따르면, CLL1 BM CAR T 및 CLL1/CD33 이중 CAR T세포에 비해, TLR로 무장한 CAR T세포가 주입된 마우스에서 종양 부하가 감소한 것으로 나타났다(도 14). 일관되게, CLL1 BM CAR 및 CLL1/CD33 이중 CAR T세포에 비해, TLR로 무장한 CAR T세포로 처리된 마우스에서, CAR T세포가 말초 혈액 단핵구(PBMC)에서의 백분율은 유의하게 높다(도 14). 따라서, CLL1-공동CD33 CAR-T는 체내에서 U937-GL세포를 죽이는 면에서 CLL1 BM 또는 CLL1/CD33 이중 CAR T세포보다 더 효과적이다.

[0351] **구현예 6: CLL1-공동CD33 CAR- γδ T의 평가**

[0352] γδT(γδT) 림프구는 주로 흉선에서 발육하고, V(D)J 재조합을 통해 γδ T세포 수용체를 생성하며, 암세포에 대한 세포독성을 포함하여 신속한 기능을 위해 준비된다. γδ T세포의 다른 잠재적 이점은, αβ T세포와 달리, MHC에 한정되지 않으므로, CAR 전이유전자를 발현하는 조작된 동종이계 기증자로부터 유래된 γδ T세포가 이론적으로 기성 범용 제품으로 사용될 수 있고, 이러한 적용은 면역 기능이 매우 저하된 환자에게만 한정된다. 따라서, 발명자는 또한 TLR로 무장한 CAR(예를 들어, CLL1-공동CD33 및 CLL1-공동CD33-2)로 변형된 γδ T의 효능을 평가하였다.

[0353] 구현예 5에 기재된 바와 같이, U937-Luc 이종이식 마우스 모델에서 CLL1-공동CD33 CAR γδ T세포의 체내 효능을 평가한다. 도 15에 도시된 바와 같이, 모든 마우스에서, CLL1-공동CD33 CAR γδ T로 처리된 마우스는 지속적인 U937종양 제거를 나타낸다. 그러나, CLL1 BM CAR 및 CLL1/CD33 이중 CAR γδ T군은 모두 종양 재발을 경험한다. 일관되게, CLL1 BM CAR 및 CLL1/CD33 이중 CAR γδ T세포에 비해, CLL1-공동CD33 또는 CLL1-공동CD33-2 CAR γδ T세포로 처리된 마우스에서, 말초 혈액 단핵구(PBMC)에서의 CAR γδ T세포의 백분율은 유의하게 높다(도 14).

[0354] **구현예 7: 외인성으로 도입된 GPC3 및 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체를 발현하는 CAR γδ T세포의 제조**

[0355] 이 구현예는 외인성으로 도입된 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체를 발현하는 예시적인 무장한 CAR γδ T세포의 구축을 나타낸다. 특히, 이 구현예는 GPC3를 발현하는 CAR γδ T세포의 구축을 나타낸다.

[0356] ***7.1. 키메라 항원 수용체(CAR)의 구축***

[0357] 항GPC3로 무장한 NKG2D TLR4 키메라 수용체(SEQ ID NO: 57)를 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항GPC3 scFv(SEQ ID NO: 55), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB분자(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. NKG2D TLR4 키메라 수용체의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 NKG2D TLR4 키메라 수용체는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), NKG2D ECD(SEQ ID NO: 51), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0358] 항GPC3로 무장한 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체(SEQ ID NO: 58)를 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항GPC3 scFv(SEQ ID NO: 55), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB분자(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학

적 합성을 수행하고, 상기 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), NKG2D ECD(SEQ ID NO: 51), CD8α 힌지 (SEQ ID NO: 7), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다. 이 작제물은 도 16a에 도시된다.

[0359] CAR 백본 및 NKG2D TLR4/ NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체를 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 2세대 렌티바이러스 벡터)에 클로닝하고, 체외 전사를 위해 구성적 hEF1α 프로모터에 다운스트림 및 작동 가능하게 연결된다. Blood (2006) 108 (12): 3890-3897에 예시된 바를 참조하고, 일시적인 레트로바이러스 상청액을 생성한다.

[0360] 또한 비교 분석을 위해 항GPC3 CAR(GPC3 CAR)을 코딩하는 작제물을 상기와 같이 제조하였다(SEQ ID NO: 56).

[0361] *7.2. 바이러스 제조*

[0362] 구현예 1에 기재된 바와 같이 렌티바이러스를 제조하였다.

[0363] *7.3. γδ T세포의 형질도입*

[0364] PBMC에 5 μM의 졸레드로네이트 및 1000 IU/mL의 IL-2를 첨가하여 γδ T세포를 제조하고, 9일 동안 배양하며, 1000 IU/mL의 IL-2가 보충된 배지를 정기적으로 교체하였다. 대안적으로, PBMC 또는 제대혈(UCB)로부터 γδ T세포를 분리하고, 항γδ TCR 항체 및 항CD3(OKT3)로 자극한 후, 1:2의 비율로 K562 기반 인공 항원 제시 세포(aAPC)와 적어도 10일 동안 공동 인큐베이션하였다. 밀도 원심분리(lymphoprep)를 통해 백혈구 성분 채집술 재료로부터 PBMC를 분리하여 동결 보존하였다. PBMC를 부활시키고 IL-2(1000 IU/ml) 및 5% 인간 AB 혈청이 보충된 세포 배지 AIM-V에서 졸레드론산(5 μM)으로 활성화하여 가습 챔버(37℃, 5% CO_2)에 보관하였다. 활성화 48시간 후, MOI 5이고 5 pg/ml 폴리브렌의 존재 하에 구현예 1의 시스템을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 세포를 형질도입하였다. 제2일에 이러한 형질도입 과정을 반복한 후, 형질도입 후 제2일에 IL-2(1000 IU/ml)를 함유한 새로운 배지를 보충하였다. 추가 증폭을 위해 배지의 pH에 따라 배지를 주기적으로 교체하는 가습 챔버에서 IL-2(1000 IU/ml)가 보충된 AIM-V에서 세포를 배양하였다. 형질도입 10일 후에 세포를 수확하고, 세포의 총 수, 순도 및 형질도입 효율을 결정하였다. 향후 적용 또는 냉동보존 전에, 음성 TCRγ/δ^{+} T세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 세포를 추가로 농축하였다.

[0365] **구현예 8: NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR γδ T세포의 체외 세포독성 측정**

[0366] 이 구현예는 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR γδ T세포의 체외 항종양 활성을 나타낸다.

[0367] *8.1 장기 공동 배양 분석*

[0368] CAR γδ T세포의 장기 사멸 효능을 평가하기 위하여, 발명자는 체내의 동적 사멸 과정을 시뮬레이션하는 장기 공동 배양 분석을 수행하였다. 외인성 사이토카인(IL-2)이 존재하지 않는 경우, 형질도입되거나 형질도입되지 않은 T세포(1 × 10^5개/웰)를 종양 세포주(Huh7세포, 1 × 10^5개/웰)와 1:1의 E:T 비율로 24웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 공동 배양 2일 또는 3일 후, 이들 세포 중 일부를 수확하여 CD3에 대해 염색을 수행하였다. 일련의 공동 배양 분석에 있어서, 동일한 E:T 비율로 신선한 Huh7세포를 사용하여 남은 T세포를 다시 공격하였다. 종양 세포가 자랄 때까지 공동 배양을 수행하였다. 각각의 시점에서의 T세포 증식률은 해당 시점의 T세포 수를 이전 시점에서의 T세포 수로 나누어 계산하였다.

[0369] FACS에 의해 검출된 장기 공동 배양 분석의 대표적인 결과는 도 19에 도시된다. 동일한 실험에서 계산된 T세포 증식은 도 20에 도시된다. 데이터는 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR γδ T세포가 항GPC3 CAR γδ T세포보다 더 우수한 세포독성 및 체외 증식을 갖는 것을 입증한다.

[0370] *8.2 HTRF 검출에 의한 IFN-γ 분비*

[0371] 이펙터 T세포 활성화 및 증식의 다른 척도는 IFN-γ와 같은 이펙터 사이토카인의 생성이다. 1라운드 내지 3라운드 체외 세포독성 측정으로부터의 상청액을 수집하여, CAR 유도된 사이토카인 방출을 평가하였다. 제조업체의 매뉴얼에 따라 IFN-γ의 HTRF 분석(Cisbio, 카탈로그 번호 62HIFNGPEH)을 수행하였다.

[0372] 상응하는 사이토카인 방출 결과는 도 21에 도시된다. 두 가지 항GPC3 γδ CAR T세포는 모두 Huh7세포에 대해 효과적인 사멸 활성을 나타내고, Huh7세포에 응답하여 IFN-γ를 방출하였다. NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 CAR T세포는 순수 CAR T세포보다 더 높은 수준의 IFN-γ 분비를 나타낸다.

[0373] **구현예 9: 외인성으로 도입된 CD19 및 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체를 발현하는 CAR αβ T세포의 제조**

[0374] 이 구현예는 외인성 도입된 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체를 발현하는 예시적인 무장한 CAR αβ T세포의 구축을 나타낸다. 특히, 이 구현예는 CD19를 발현하는 CAR αβ T세포의 구축을 나타낸다.

[0375] *9.1. 키메라 항원 수용체(CAR)의 구축*

[0376] 항CD19로 무장한 NKG2D TLR4 키메라 수용체(SEQ ID NO: 59)를 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD19 scFv(SEQ ID NO: 6), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB분자(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 NKG2D TLR4 키메라 수용체의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 NKG2D TLR4 키메라 수용체는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), NKG2D ECD(SEQ ID NO: 51), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0377] 항CD19로 무장한 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체(SEQ ID NO: 60)를 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항CD19 scFv(SEQ ID NO: 6), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB분자(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), NKG2D ECD(SEQ ID NO: 51), CD8α 힌지 (SEQ ID NO: 7), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다. 이 작제물은 도 16a에 도시된다.

[0378] CAR 백본 및 NKG2D TLR4/ NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체를 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 2세대 렌티바이러스 벡터)에 클로닝하고, 체외 전사를 위해 구성적 hEF1α 프로모터에 다운스트림 및 작동 가능하게 연결된다. Blood (2006) 108 (12): 3890-3897에 예시된 바를 참조하고, 일시적인 레트로바이러스 상청액을 생성한다.

[0379] 또한 비교 분석을 위해 항CD19 CAR(CD19 BM CAR)을 코딩하는 작제물을 상기와 같이 제조하였다(SEQ ID NO: 2).

[0380] *9.2. T세포의 바이러스 제조 및 형질도입*

[0381] 구현예 1에 기재된 바와 같이 렌티바이러스를 제조하였다. 구현예 1에 설명된 방법에 따라 T세포 림프구를 수집하고 렌티바이러스로 형질도입하였다.

[0382] **구현예 10: NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항CD19 CAR αβ T세포의 체외 세포독성 측정**

[0383] 이 구현예는 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항CD19 CAR αβ T세포의 체외 항종양 활성을 나타낸다.

[0384] *장기 공동 배양 분석*

[0385] CAR αβ T세포의 장기 사멸 효능을 평가하기 위하여, 발명자는 장기 공동 배양 분석을 수행하였다. 외인성 사이토카인(IL-2)이 존재하지 않는 경우, 형질도입되거나 형질도입되지 않은 T세포(1×10^5개/웰)를 종양 세포주(Raji세포, 1×10^5개/웰)와 1:1의 E:T 비율로 24웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 공동 배양 2일 또는 3일 후, 이들 세포 중 일부를 수확하여 CD3에 대해 염색을 수행하였다.

[0386] 일련의 공동 배양 분석에 있어서, 동일한 E:T 비율로 신선한 Raji세포를 사용하여 남은 T세포를 다시 공격하였다. 종양 세포가 자랄 때까지 공동 배양을 수행하였다. 각각의 시점에서의 T세포 증식률은 해당 시점의 T세포 수를 이전 시점에서의 T세포 수로 나누어 계산하였다.

[0387] FACS에 의해 검출된 장기 공동 배양 분석의 대표적인 결과는 도 22에 도시된다. 동일한 실험에서 계산된 T세포 증식은 도 23에 도시된다. 데이터는 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체 무장이 항CD19 CAR αβ T세포의 세포독성 및 증식을 향상시키는 것을 나타낸다.

[0388] **구현예 11: NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR γδ T세포의 체내 효능 평가**

[0389] 이 구현예는 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR γδ T세포의 체내 항종양 활성을 나타낸다.

[0390] Huh7 이종이식 모델에서 예시적인 항GPC3 CAR-γδ T세포의 체내 항종양 활성을 평가하였다. 간략하게, 제0일에, 3백만(3×10^6)개 Huh7세포를 NOD/SCID IL-2RγC null(NSG) 마우스에 피하 이식하였다. 종양 접종 10일 후, 마우스를 다음과 같이 처리하였다. 1×10^6개의 무장한 CAR-γδ T 또는 모의 T세포 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 정맥 주사하였다. 캘리퍼를 사용하여 매주 2회 종양 크기를 측정하고, 공식 V = 1/2(길이 × 폭^2)을 사용하여 종양 부피를 계산하였다. 대조군 마우스의 평균 종양 부하가 2,000 mm^3에 도달했을 때 마우스를 안락사시켰다.

[0391] Huh7 이종이식 모델에서, 항GPC3 CAR γδT세포 또는 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 CAR γδ T세포의 항종양 효과의 결과는 도 24에 도시된다. 무장하지 않은 CAR-γδ T세포와 NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 CAR-γδ T세포는 함께 종양 성장을 억제하였다. 구체적으로, 무장하지 않은 CAR-γδ T세포로 처리한 마우스는 종양이 없어졌지만, 서서히 거부 반응을 보인 반면, NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 CAR-γδ T세포로 처리한 마우스는 종양이 없어졌고 실험 관찰이 종료될 때까지 건강하고 종양이 없는 상태를 유지하였다.

[0392] **구현예 12: 직렬, 단일 항BCMA sdAb 또는 항GPRC5D scFv을 갖는, 외인적으로 도입된 Toll 유사 수용체4(TLR4) 세포내 도메인을 발현하는 CAR-T세포의 제조**

[0393] 이 구현예는 외인성 도입된 Toll 유사 수용체(TLR) 도메인을 발현하는 예시적인 무장한 CAR-T세포의 구축을 나타낸다. 특히, 이 구현예는 직렬, 단일 sdAb 또는 항GPRC5D scFv를 갖는 항BCMA CAR-T세포의 구축을 나타낸다.

[0394] ***12.1. 키메라 항원 수용체(CAR)의 구축***

[0395] 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 61)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 직렬 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 44), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 직렬 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 44), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0396] 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 62)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 68), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 69), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0397] 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD8 CAR(SEQ ID NO: 63)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 68), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 69), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0398] 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR(SEQ ID NO: 64)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 68), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3

ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 69), CD28 힌지 도메인(SEQ ID NO: 15), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0399] 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR(SEQ ID NO: 65)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 직렬 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 44), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항GPRC5D scFv(SEQ ID NO: 70), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0400] 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR(SEQ ID NO: 72)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 직렬 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 44), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항GPRC5D scFv(SEQ ID NO: 70), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0401] 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD28 CAR(SEQ ID NO: 73)을 구축하기 위하여, CAR 백본 폴리펩티드를 코딩하는 CAR 백본 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 CAR 백본 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 직렬 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 44), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9)의 세포내 부분 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함한다. 또한 유도성 공동 자극 분자의 서열에 대해 코돈 최적화 및 화학적 합성을 수행하고, 상기 유도성 공동 자극 분자는 N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 항GPRC5D scFv(SEQ ID NO: 70), CD28 힌지 도메인(SEQ ID NO: 15), TLR4 막횡단(TM) 영역(SEQ ID NO: 12) 및 TLR4의 세포내 부분(SEQ ID NO: 13)을 포함하며, P2A 절단 부위(SEQ ID NO: 24)를 통해 CAR 백본 서열에 연결된다.

[0402] CAR 백본 및 공동 자극 분자를 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 2세대 렌티바이러스 벡터)에 클로닝하고, 체외 전사를 위해 구성적 hEF1α 프로모터에 다운스트림 및 작동 가능하게 연결된다. *Blood* (2006) 108 (12): 3890-3897에 예시된 바를 참조하고, 일시적인 레트로바이러스 상청액을 생성하였다.

[0403] 각각, 직렬 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 66) 및 단일 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 67)을 구축하고, N-말단으로부터 C-말단까지 신호 펩티드(SEQ ID NO: 5), 직렬 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 44) 또는 제1 단일 항BCMA sdAb(SEQ ID NO: 68), CD8α 힌지 도메인(SEQ ID NO: 7), CD8α 막횡단(TM) 도메인(SEQ ID NO: 8), 4-1BB공동 자극 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 9) 및 CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인(SEQ ID NO: 10)을 포함하며, 상기와 같이 제조하여 비교 분석에 사용하였다.

[0404] ***12.2. CAR-T세포의 구축***

[0405] **바이러스 제조**

[0406] 구현예 1에 기재된 바와 같이 렌티바이러스를 제조하였다.

[0407] **γδT세포의 활성화**

[0408] PBMC에 5 μM의 졸레드로네이트 및 1000 IU/mL의 IL-2를 첨가하여 γδ T세포를 제조하고, 14일 동안 배양하며, 1000 IU/mL의 IL-2가 보충된 배지를 정기적으로 교체하였다. 대안적으로, PBMC 또는 제대혈(UCB)로부터 γδ T세포를 분리하고, 항γδ TCR 항체 및 항CD3(OKT3)로 자극한 후, 1:2의 비율로 K562 기반 인공 항원 제시 세포

(aAPC)와 적어도 10일 동안 공동 인큐베이션하였다.

[0409] 밀도 원심분리(lymphoprep)를 통해 백혈구 성분 채집술 재료로부터 PBMC를 분리하여 동결 보존하였다. PBMC를 부활시키고 IL-2(1000 IU/ml) 및 5% 인간 AB 혈청이 보충된 세포 배지 AIM-V에서 졸레드론산(5 μM)으로 활성화하여 가습 챔버(37℃, 5% CO_2)에 보관하였다. 활성화 48시간 후, MOI가 2이고 5 pg/ml의 폴리브렌의 존재 하에, 이 구현예의 시스템을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 세포를 형질도입하였다. 추가 증폭을 위해 배지의 pH에 따라 배지를 주기적으로 교체하는 가습 챔버에서 IL-2(1000 IU/ml)가 보충된 AIM-V에서 세포를 배양하였다. 형질도입 10일 후에 세포를 수확하고, 세포의 총 수, 순도 및 형질도입 효율을 결정하였다. 향후 적용 또는 냉동보존 전에, 음성 TCRγ/δ$^+$ T세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 세포를 추가로 농축하였다.

[0410] **T세포의 바이러스 형질도입**

[0411] 성분채집을 통해 건강한 기증자로부터 백혈구를 수집하였다. FICOLL-PAQUE™ PLUS 배지를 사용하여 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 분리하고, Pan T세포 분리 키트(Miltenyi)를 사용하여 PMBC로부터 인간 T세포를 정제하였다. 다음 정제된 T세포를 인간 T세포 활성화/확장 키트(Miltenyi)를 사용하여 48시간 동안 사전 활성화하였다. 사전 활성화 후, 1:2의 비드 대 세포 비율로 항CD3/CD28 MACSiBead™ 입자를 첨가하여 T세포를 증폭시켰다.

[0412] 사전 활성화된 T세포를 8 μg/mL 폴리브렌의 존재 하에 렌티바이러스로 형질도입하였다. 세포를 6웰 조직 배양 플레이트에서 4 × 10^6개 T세포/웰로 배양하고, 37° C에서 대략 48시간 동안 배양하였다. 형질도입된 세포를 원심분리하고, 상청액을 제거하며, 펠릿화된 세포를 배양을 위해 0.5 × 10^6개 세포/mL를 300 IU/ml IL-2가 보충된 신선한 배지에 재현탁시켰다. 2일 내지 3일마다 세포 농도를 0.5 × 10^6개 세포/mL로 조절하였다.

[0413] 토끼 항sdAb와 CAR을 함께 배양한 세포를 통해 T세포에서의 CAR 발현을 검출하여, 세포 표면 sdAb를 검출하였다.

[0414] **구현예 13: 체외 세포독성**

[0415] 이 구현예는 항BCMA-공동 항BCMA CAR-T세포의 체외 항종양 활성을 나타낸다.

[0416] ***13.1 락테이트 탈수소 효소(LDH) 세포독성***

[0417] 체외에서 조작된 T세포(예를 들어, 항BCMA CAR-γδT 및 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포)의 항종양 활성을 신속하게 평가하기 위하여, 세포독성의 락테이트 탈수소 효소(LDH) 측정을 수행하였다. 형질도입 후 제7일에, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 61) 및 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 62)로 형질도입된 γδT세포를 수확하고, 각각 표적 세포(BCMA를 발현하는 NCI-H929 또는 RPMI-8226 종양 세포)와 0.25:1, 0.125:1, 0.0625:1, 0.03125:1 및 0:1의 E/T 비율(이펙터: CAR-T/표적 비율)로 20시간 동안 공동 인큐베이션하였다. 직렬 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 66) 및 단일 항BCMA CAR(SEQ ID NO: 67) 형질도입된 γδT세포를 모두 양성 대조군으로 사용하고, 동일한 배치로부터의 형질도입되지 않은 γδT세포(“Un-γδT”)를 음성 대조군으로 사용하였다. 제조업체의 매뉴얼(Roche)에 따라 측정을 수행하였다.

[0418] 체외 세포독성은 이하의 공식으로 계산된다([LDH]$_{E+T}$: E/T 공동 인큐베이션에서 방출된 LDH, [LDH]$_E$: 이펙터에서만 방출된 LDH, [LDH]$_{max}$: Triton X-100로 처리된 표적 세포에서 방출된 LDH, [LDH]$_{min}$: 미처리 표적 세포에서 방출된 LDH).

[0419] $$\text{세포독성 \%} = \frac{[LDH]_{E+T} - [LDH]_E - [LDH]_{min}}{[LDH]_{max} - [LDH]_{min}} \times 100\%$$

[0420] 테스트된 모든 CAR 작제물은 모두 인간 γδT세포에 효율적으로 형질도입되고, CAR 발현율은 25% 내지 80% 사이이다. 동일한 배치의 실험에서, 형질도입되지 않은 T세포에 비해, 형질도입된 세포의 세포 성장 및 생존력은 영향을 받지 않았다. 도 26에 도시된 바와 같이, 테스트된 NCI-H929 및 RPMI-8226종양 세포 모두에 대해 대조군 직렬 또는 단일 CAR-γδT 및 직렬 또는 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CAR-γδT세포는 체외에서 투여량 의존적 방식으로 표적 세포 용해를 유도하였다. 또한, 직렬 및 단일 설계에 있어서, 항BCMA-공동 항BCMA-CAR-γδT세포는 항BCMA CAR-γδT보다 표적 세포에 대해 더 강한 세포독성을 나타낸다.

[0421] *13.2 균질한 시간 분해 형광(HTRF)에 의한 사이토카인 분비*

[0422] 이펙터 γδT세포 활성화의 다른 척도는 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF와 같은 이펙터 사이토카인의 생성이다. 체외 세포독성 분석으로부터 상청액을 수집하여 CAR 유도된 사이토카인 방출을 평가하고, 제조업체의 매뉴얼에 따라 IFN-γ, TNF-α和GM-CSF의 균질한 시간 분해 형광(HTRF) 분석(Cisbio)을 수행하였다.

[0423] CAR-γδT세포(예를 들어, 단일/직렬 항BCMA CAR-γδT 및 단일/직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포 및 형질도입되지 않은 γδT세포)를 NCI-H929 또는 RPMI-8226표적 세포와 공동 배양하였다. γδT세포 활성화의 척도로서, 20시간 후 배양 상청액을 수집하여 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF의 방출을 평가하였다. 도 27에 도시된 바와 같이, 표적 종양 세포와 공동 배양된 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포 및 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포는 단일 및 직렬 sdAb에 의해 설계된 항BCMA-CAR-γδT세포와 유사하게 유의한 양의 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF를 분비하였다. 이는 항BCMA-공동CAR의 첨가가 CAR 매개 항종양 세포독성에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 가장 가능하게는, TLR4신호 전달은 표적 결합 후 CAR-γδT세포의 지속성을 향상시키는데 도움이 된다. 이 가설을 테스트하기 위하여, 이러한 세포는 하기와 같은 장기 공동 배양 분석을 거쳤다.

[0424] *13.3 장기 공동 배양 분석*

[0425] 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT항BCMA-공동 항GPRC5D CAR-γδT세포의 장기 사멸 효능을 평가하기 위하여, 장기 공동 배양 분석을 수행하여 체내의 동적 사멸 과정을 시뮬레이션하였다. 외인성 사이토카인(예를 들어, IL-2)이 존재하지 않는 경우, 형질도입되거나(예를 들어, 직렬 항BCMA CAR-γδT, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포, 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포, 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD8 CAR-γδT세포, 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR-γδT세포 및 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR-γδT세포) 형질도입되지 않은(예를 들어, Un-γδT) T세포(1×10^5개/웰)를 NCI-H929표적 세포(4×10^5개/웰)와 1:3의 E:T 비율로 24웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 2일 또는 3일 동안 공동 배양한 후, 이러한 세포 중 일부를 수확하여 CD3에 대해 염색하였다. CD3 및 CAR 신호를 통해 CAR-γδT세포를 감정하였다. 일련의 공동 배양 분석에 있어서, 동일한 E:T 비율로 신선한 NCI-H929표적 세포를 사용하여 남은 γδT세포를 다시 공격하였다. 종양 세포가 웰 부피보다 커질 때까지 공동 배양을 수행하였다. 각각의 시점에서의 γδT세포 증식률은 해당 시점의 γδT세포를 γδT세포의 초기 수로 나누어 계산하였다.

[0426] 반복적인 종양 자극 분석에서 다양한 CAR-T세포의 사멸 효능은 도 28에 도시된다. 직렬 항BCMA CAR-γδT세포는 4라운드의 종양 자극 후 소진되는 반면(예를 들어, CD3%로 측정된 추가 표적 종양 세포를 죽일 수 없음), 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포, 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포, 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD8 CAR-γδT세포, 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR-γδT세포, 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR-γδT세포 및 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR-γδT세포는 8라운드까지 표적 종양 세포를 지속적으로 죽였다. 또한, 발명자는 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR-γδT세포가 체외에서 증식하고 직렬 항BCMA CAR-γδT세포보다 더 우수한 장기 지속성을 나타냄을 발견하였다. 또한, 8라운드 반복 자극 후, 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR-γδT세포, 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR-γδT세포 및 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR-γδT세포는 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포보다 훨씬 더 나은 증식을 나타낸다(도 28).

[0427] 종합해보면, 이러한 결과는, TLR4신호 전달 활성화가 CAR-T세포로 하여금 고갈에 대한 저항성을 갖도록 하고, 체외에서 표적 종양 세포를 죽이는 능력을 향상시켜, 이러한 치료제 발전에 대한 주요 장애물을 해결하는 것을 나타낸다. 구체적으로, 발명자는 직렬 또는 단일 항BCMA sdAb에 의해 유발된 TLR4신호 전달이 CAR-γδT세포의 항종양 세포독성 및 지속성을 향상시키는 면에서 동등하게 효과적이라는 것을 입증하였다. 또한, 항GPRC5D scFv 또는 상이한 힌지 설계(예컨대 CD28에 한정되지 않음)를 사용하여 세포독성 및 지속성을 추가로 개선할 수 있다.

[0428] **구현예 14: 동종이계 환경에서의 체외 지속성**

[0429] 이 구현예는 동종이계 환경에서 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-T세포의 체외 지속성을 나타낸다.

[0430] *14.1 3방향 혼합 림프구 반응(MLR) 분석*

[0431] 동종이계 세포 치료의 "기성품"으로서의 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포의 잠재력을 테스트하기 위하여, 발명자는 동일한 시스템에서 CAR-γδT, HCI-H929종양 세포 및 동종이계 PBMC(자가 PBMC를 대조군으로 사용)의 공동 배양을 사용하여 3방향 MLR 분석을 수행하여 체외 동종이계 환경을 시뮬레이션하였다. 구체적으로, 이러한 세포를 γδT:PBMC:종양 = 1:60:1의 비율로 공동 배양하고, 초기 γδT세포 수는 웰당 4 ×

10^5개 세포이다. 공동 배양 후 제3일, 제6일 및제 9일에, γδT세포의 수를 기록하여, 동종이계 PBMC 존재 하에서의 증식을 결정하였다. 다른 한편으로, 제9일에, αβT 및 NK세포 수를 기록하여, 동종이계 특성을 갖는 이러한 주요 이펙터 세포가 γδT세포에 의해 자극되었는지 여부를 결정하였다. 도 29에 도시된 바와 같이, 동종이계 PBMC의 존재 하에, 직렬 항BCMA CAR-γδT세포에 비해, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT는 더 높은 증식 수준을 나타낸다. 다른 한편으로, 대조군 직렬 항BCMA CAR-γδT세포에 비해, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포의 동종이계 αβT 및 NK세포가 이 시스템에서 훨씬 적게 증식하는 것은 매우 분명하다.

[0432] 따라서, 발명자는 리간드 유도된 TLR4신호 전달을 갖는 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포가 "기성품" 동종이계 세포 치료제에 대한 실행 가능한 후보임을 입증하였고, 이는 동종이계 세포가 존재하는 경우에도 우수한 지속성을 나타내는 것을 입증한다.

[0433] **구현예 15: 체내 효능 및 안전성**

[0434] 이 구현예는 예시적인 직렬 항BCMA CAR-T세포 및 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-T세포가 동종이계 환경에서의 체내 효능 및 안전성을 나타낸다.

[0435] ***15.1 RPMI-8226이종이식 모델에서의 체내 효능 및 안전성***

[0436] RPMI-8226이종이식 모델에서 예시적인 직렬 항BCMA CAR-T의 항종양 활성을 체내 평가하였다. 간략하게, 제0일에, 반딧불 루시퍼라제 리포터 유전자를 안정적으로 발현하는 백만(1×10^6)개의 RPMI-8226세포를 NOD/SCID IL-2Rγcnull(NSG) 마우스에 피하/정맥내 이식하였다. 종양 접종 14일 후, 마우스를 다음과 같이 처리하였다. 1×10^6개 무장한 CAR- γδT 또는 모의 T세포 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 정맥 주사하였다. 매주 생물발광 이미징(BLI)을 통해 종양의 진행을 모니터링하였다. 또한, 혈액에서 채취한 혈장의 FACS 분석에 의해 T세포 증식을 모니터링하였다.

[0437] 독성 평가에 있어서, 임상 징후를 매일 관찰하는 한편, 동물의 체중 및 종양-Luc세포에 의해 유발되는 형광 강도를 매주 측정하였다. 혈액(0.2 mL)을 매주 채취하여 마우스의 인간화 사이토카인 절편(IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF)을 검출하였다.

[0438] 낮은 종양 부하와 마우스당 1M CAR-γδT세포 투여량에 대한 첫 번째 실험에서, 발명자는 직렬 항BCMA CAR-γδT 및 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포가 모두 종양 성장을 억제할 수 있는 것을 발견하였다. 그러나, 유의하게, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT는 직렬 항BCMA CAR-γδT세포보다 더 우수한 항종양 활성을 나타내고, 이는 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포로 처리된 마우스만이 종양이 없는 상태로 유지된 반면, 다른 실험군은 실험이 종료될 무렵 재발하였기 때문이다(도 30). 또한, 마우스 혈액의 FACS 분석으로부터 얻은 약동학적 결과는 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT군의 말초 혈액에서 CAR-γδT세포의 증폭이 직렬 항BCMA CAR-γδT군보다 훨씬 더 높은 것을 나타내고, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT세포의 더 우수한 체내 효능을 추가로 입증하였다(도 30).

[0439] 높은 초기 종양 부하 및 마우스당 0.3M CAR-γδT세포 투여량에 대한 다른 실험에서, 발명자는 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR-γδT세포가 여전히 다발성 골수종 종양 세포를 분화할 수 있음을 발견하였고, 이로써 BCMA 및 GPRC5D의 이중 표적화의 타당성과 상이한 힌지 설계(예컨대 CD8에 한정되지 않음)의 잠재적 유용성을 확립하였다(도 30).

[0440] 또한, 모든 테스트군 사이에 유의미한 체중 변화는 발견되지 않았다. 또한, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT로 처리된 마우스 말초 혈액 내의 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF수준은 직렬 항BCMA CAR-γδT로 처리된 마우스와 유사하다. 이러한 발견은 체외 공동 배양 분석에서 얻은 관찰 효과에 해당된다(도 31a 및 b). 이러한 결과는, 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR-γδT 요법이 체내에서 안전하다는 것을 입증한다.

[0441] 결론적으로, 발명자는 체내 다발성 골수종 모델에서 항BCMA 유발 TLR4신호 전달을 갖는 항BCMA CAR-γδ T세포가 안전하고, 단독적인 2세대 항BCMA CAR-γδ T보다 더 효과적인 것을 확정하였다.

[0442] 서열목록

[0443] SEQ ID NO: 1. CD19-공동CD20-CAR

[0444] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS

ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMA
LPVTALLLPLALLLHAARPDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRV
EAEDVGVYYCVQATQFPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDT
RYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHPSYGSGSPNFDYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
GLDFACDTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEG
FHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVG
TGCNWQEATSI

[0445] SEQ ID NO: 2. CD19 BM CAR

[0446] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0447] SEQ ID NO: 3. CLL1-공동CD33 CAR

[0448] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQAGGALSLSCAASGYTVRIDYMGWYRQTPGKGREPVATIASNGGTAYADSVEGRFTISQDNAKNSVYLQ
MNTLKPGDTAMYYCAAGTWPTLTYFGQGTQVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR
SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGG
GSVQAGGSLRLSCAASGYTYSINCMGWFRQAPGKEREGVAVISTGGGRTDYRDSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAGKTTYPGYGCGLGR
SAYNYWGQGTQVTVSSLSVSECHRTALVSGMCCALFLLILLTGVLCHRFHGLWYMKMMWAWLQAKRKPRKAPSRNICYDAFVSYSERDAYWVENLMVQELEN
FNPPFKLCLHKRDFIPGKWIIDNIIDSIEKSHKTVFVLSENFVKSEWCKYELDFSHFRLFDENNDAAILILLEPIEKKAIPQRFCKLRKIMNTKTYLEWPMD
EAQREGFWVNLRAAIKSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRFNIMGWYRQAPG
NQRELVASIDDGGDRSYADSVEGRFTISRENGKKIMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGLGTYLNGRVSMATNYWGQGTQVTVSSLSCNITLLIVTIVATMLVLA
VTVTSLCSYLDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYSGHDSFWVKNELLPNLEKEGMQICLHERNFVPGKSIVENIITCIEKSYKSIFV
LSPNFVQSEWCHYELYFAHHNLFHEGSNSLILILLEPIPQYSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKRGLFWANLRAAINIKLTEQAKK

[0449] SEQ ID NO: 4. CLL1 BM CAR

[0450] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQAGGALSLSCAASGYTVRIDYMGWYRQTPGKGREPVATIASNGGTAYADSVEGRFTISQDNAKNSVYLQ
MNTLKPGDTAMYYCAAGTWPTLTYFGQGTQVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR
SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0451] SEQ ID NO: 5. 신호 펩티드(예를 들어, 리더 서열)

[0452] MALPVTALLLPLALLLHAARP

[0453] SEQ ID NO: 6. CD19 scFv

[0454] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT
KLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKM
NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

[0455] SEQ ID NO: 7. CD8α 힌지

[0456] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

[0457] SEQ ID NO: 8. CD8α TM

[0458] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0459] SEQ ID NO: 9. 4-1BB(CD137) 공동 자극 신호 전달 도메인

[0460] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0461] SEQ ID NO: 10. CD3ζ 1차 세포내 신호 전달 도메인

[0462] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR

[0463] SEQ ID NO: 11. CD20 scFv

[0464] DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQATQFPLT FGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIT TAYLQWSSLKASDTAMYYCARHPSYGSGSPNFDYWGQGTLVTVSS

[0465] SEQ ID NO: 12. TLR4 TM

[0466] TIIGVSVLSVLVVSVVAVLVY

[0467] SEQ ID NO: 13. TLR4 1차 세포내 신호 전달 도메인

[0468] KFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDF

[0469] SEQ ID NO: 14. CLL1 sdAb

[0470] QVQLVESGGGSVQAGGALSLSCAASGYTVRIDYMGWYRQTPGKGREPVATIASNGGTAYADSVEGRFTISQDNAKNSVYLQMNTLKPGDTAMYYCAAGTWPT LTYFGQGTQVTVSS

[0471] SEQ ID NO: 15. CD28α 힌지

[0472] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

[0473] SEQ ID NO: 16. CD28α TM

[0474] FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0475] SEQ ID NO: 17. CD28 1차 세포내 신호 전달 도메인

[0476] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0477] SEQ ID NO: 18. CD33 C2도메인sdAb

[0478] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNVFRFNIMGWYRQAPGNQRELVASIDDGGDRSYADSVEGRFTISRENGKKIMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGLGTY LNGRVSMATNYWGQGTQVTVSS

[0479] SEQ ID NO: 19. TLR1 TM

[0480] LLIVTIVATMLVLAVTVTSLC

[0481] SEQ ID NO: 20. TLR1 1차 세포내 신호 전달 도메인

[0482] SYLDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYSGHDSFWVKNELLPNLEK

[0483] EGMQICLHERNFVPGKSIVENIITCIEKSYKSIFVLSPNFVQSEWCHYELYFAHHNLFHE

[0484] GSNSLILILLEPIPQYSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKRGLFWANLRAAINIKLT

[0485] EQAKK

[0486] SEQ ID NO: 21. CD33 V도메인sdAb

[0487] EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSINCMGWFRQAPGKEREGVAVISTGGGRTDYRDSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAGKTTY PGYGCGLGRSAYNYWGQGTQVTVSS

[0488] SEQ ID NO: 22. TLR2 TM

[0489] ALVSGMCCALFLLILLTGVLC

[0490] SEQ ID NO: 23. TLR2 1차 세포내 신호 전달 도메인

[0491] HRFHGLWYMKMMWAWLQAKRKPRKAPSRNICYDAFVSYSERDAYWVENLMVQELENFNPP

[0492] SEQ ID NO: 24. P2A

[0493] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0494] SEQ ID NO: 25. GS링커 1

[0495] GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

[0496] SEQ ID NO: 26. GS링커 2

[0497] GGGGS

[0498] SEQ ID NO: 27. GS링커 3

[0499] $(GS)_n$

[0500] SEQ ID NO: 28. GS링커 4

[0501] $(GSGGS)_n$

[0502] SEQ ID NO: 29. GS링커 5

[0503] $(GGGS)_n$

[0504] SEQ ID NO: 30. TLR1

[0505] MTSIFHFAIIFMLILQIRIQLSEESEFLVDRSKNGLIHVPKDLSQKTTILNISQNYISELWTSDILSLSKLRILIISHNRIQYLDISVFKFNQELEYLDLSH
NKLVKISCHPTVNLKHLDLSFNAFDALPICKEFGNMSQLKFLGLSTTHLEKSSVLPIAHLNISKVLLVLGETYGEKEDPEGLQDFNTESLHIVFPTNKEFHF
ILDVSVKTVANLELSNIKCVLEDNKCSYFLSILAKLQTNPKLSNLTLNNIETTWNSFIRILQLVWHTTVWYFSISNVKLQGQLDFRDFDYSGTSLKALSIHQ
VVSDVFGFPQSYIYEIFSNMNIKNFTVSGTRMVHMLCPSKISPFLHLDFSNNLLTDTVFENCGHLTELETLILQMNQLKELSKIAEMTTQMKSLQQLDISQN
SVSYDEKKGDCSWTKSLLSLNMSSNILTDTIFRCLPPRIKVLDLHSNKIKSIPKQVVKLEALQELNVAFNSLTDLPGCGSFSSLSVLIIDHNSVSHPSADFF
QSCQKMRSIKAGDNPFQCTCELGEFVKNIDQVSSEVLEGWPDSYKCDYPESYRGTLLKDFHMSELSCNITLLIVTIVATMLVLAVTVTSLCSYLDLPWYLRM
VCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYSGHDSFWVKNELLPNLEKEGMQICLHERNFVPGKSIVENIITCIEKSYKSIFVLSPNFVQSEWCHYELYFA
HHNLFHEGSNSLILILLEPIPQYSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKRGLFWANLRAAINIKLTEQAKK

[0506] SEQ ID NO: 31. TLR2

[0507] MPHTLWMVWVLGVIISLSKEESSNQASLSCDRNGICKGSSGSLNSIPSGLTEAVKSLDLSNNRITYISNSDLQRCVNLQALVLTSNGINTIEEDSFSSLGSL
EHLDLSYNYLSNLSSSWFKPLSSLTFLNLLGNPYKTLGETSLFSHLTKLQILRVGNMDTFTKIQRKDFAGLTFLEELEIDASDLQSYEPKSLKSIQNVSHLI
LHMKQHILLLEIFVDVTSSVECLELRDTDLDTFHFSELSTGETNSLIKKFTFRNVKITDESLFQVMKLLNQISGLLELEFDDCTLNGVGNFRASDNDRVIDP
GKVETLTIRRLHIPRFYLFYDLSTLYSLTERVKRITVENSKVFLVPCLLSQHLKSLEYLDLSENLMVEEYLKNSACEDAWPSLQTLILRQNHLASLEKTGET
LLTLKNLTNIDISKNSFHSMPETCQWPEKMKYLNLSSTRIHSVTGCIPKTLEILDVSNNNLNLFSLNLPQLKELYISRNKLMTLPDASLLPMLLVLKISRNA
ITTFSKEQLDSFHTLKTLEAGGNNFICSCEFLSFTQEQQALAKVLIDWPANYLCDSPSHVRGQQVQDVRLSVSECHRTALVSGMCCALFLLILLTGVLCHRF
HGLWYMKMMWAWLQAKRKPRKAPSRNICYDAFVSYSERDAYWVENLMVQELENFNPPFKLCLHKRDFIPGKWIIDNIIDSIEKSHKTVFVLSENFVKSEWCK
YELDFSHFRLFDENNDAAILILLEPIEKKAIPQRFCKLRKIMNTKTYLEWPMDEAQREGFWVNLRAAIKS

[0508] SEQ ID NO: 32. TLR3

[0509] MRQTLPCIYFWGGLLPFGMLCASSTTKCTVSHEVADCSHLKLTQVPDDLPTNITVLNLTHNQLRRLPAANFTRYSQLTSLDVGFNTISKLEPELCQKLPMLK
VLNLQHNELSQLSDKTFAFCTNLTELHLMSNSIQKIKNNPFVKQKNLITLDLSHNGLSSTKLGTQVQLENLQELLLSNNKIQALKSEELDIFANSSLKKLEL
SSNQIKEFSPGCFHAIGRLFGLFLNNVQLGPSLTEKLCLELANTSIRNLSLSNSQLSTTSNTTFLGLKWTNLTMLDLSYNNLNVVGNDSFAWLPQLEYFFLE
YNNIQHLFSHSLHGLFNVRYLNLKRSFTKQSISLASLPKIDDFSFQWLKCLEHLNMEDNDIPGIKSNMFTGLINLKYLSLSNSFTSLRTLTNETFVSLAHSP
LHILNLTKNKISKIESDAFSWLGHLEVLDLGLNEIGQELTGQEWRGLENIFEIYLSYNKYLQLTRNSFALVPSLQRLMLRRVALKNVDSSPSPFQPLRNLTI
LDLSNNNIANINDDMLEGLEKLEILDLQHNNLARLWKHANPGGPIYFLKGLSHLHILNLESNGFDEIPVEVFKDLFELKIIDLGLNNLNTLPASVFNNQVSL
KSLNLQKNLITSVEKKVFGPAFRNLTELDMRFNPFDCTCESIAWFVNWINETHTNIPELSSHYLCNTPPHYHGFPVRLFDTSSCKDSAPFELFFMINTSILL
IFIFIVLLIHFEGWRISFYWNVSVHRVLGFKEIDRQTEQFEYAAYIIHAYKDKDWVWEHFSSMEKEDQSLKFCLEERDFEAGVFELEAIVNSIKRSRKIIFV
ITHHLLKDPLCKRFKVHHAVQQAIEQNLDSIILVFLEEIPDYKLNHALCLRRGMFKSHCILNWPVQKERIGAFRHKLQVALGSKNSVH

[0510] SEQ ID NO: 33. TLR4

[0511] MMSASRLAGTLIPAMAFLSCVRPESWEPCVEVVPNITYQCMELNFYKIPDNLPFSTKNLDLSFNPLRHLGSYSFFSFPELQVLDLSRCEIQTIEDGAYQSLS

HLSTLILTGNPIQSLALGAFSGLSSLQKLVAVETNLASLENFPIGHLKTLKELNVAHNLIQSFKLPEYFSNLTNLEHLDLSSNKIQSIYCTDLRVLHQMPLL
NLSLDLSLNPMNFIQPGAFKEIRLHKLTLRNNFDSLNVMKTCIQGLAGLEVHRLVLGEFRNEGNLEKFDKSALEGLCNLTIEEFRLAYLDYYLDDIIDLFNC
LTNVSSFSLVSVTIERVKDFSYNFGWQHLELVNCKFGQFPTLKLKSLKRLTFTSNKGGNAFSEVDLPSLEFLDLSRNGLSFKGCCSQSDFGTTSLKYLDLSF
NGVITMSSNFLGLEQLEHLDFQHSNLKQMSEFSVFLSLRNLIYLDISHTHTRVAFNGIFNGLSSLEVLKMAGNSFQENFLPDIFTELRNLTFLDLSQCQLEQ
LSPTAFNSLSSLQVLNMSHNNFFSLDTFPYKCLNSLQVLDYSLNHIMTSKKQELQHFPSSLAFLNLTQNDFACTCEHQSFLQWIKDQRQLLVEVERMECATP
SDKQGMPVLSLNITCQMNKTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIP
GVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALL
DGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0512] SEQ ID NO: 34. TLR5

[0513] MGDHLDLLLGVVLMAGPVFGIPSCSFDGRIAFYRFCNLTQVPQVLNTTERLLLSFNYIRTVTASSFPFLEQLQLLELGSQYTPLTIDKEAFRNLPNLRILDL
GSSKIYFLHPDAFQGLFHLFELRLYFCGLSDAVLKDGYFRNLKALTRLDLSKNQIRSLYLHPSFGKLNSLKSIDFSSNQIFLVCEHELEPLQGKTLSFFSLA
ANSLYSRVSVDWGKCMNPFRNMVLEILDVSGNGWTVDITGNFSNAISKSQAFSLILAHHIMGAGFGFHNIKDPDQNTFAGLARSSVRHLDLSHGFVFSLNSR
VFETLKDLKVLNLAYNKINKIADEAFYGLDNLQVLNLSYNLLGELYSSNFYGLPKVAYIDLQKNHIAIIQDQTFKFLEKLQTLDLRDNALTTIHFIPSIPDI
FLSGNKLVTLPKINLTANLIHLSENRLENLDILYFLLRVPHLQILILNQNRFSSCSGDQTPSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELCWDVFEGLSHLQVLYLN
HNYLNSLPPGVFSHLTALRGLSLNSNRLTVLSHNDLPANLEILDISRNQLLAPNPDVFVSLSVLDITHNKFICECELSTFINWLNHTNVTIAGPPADIYCVY
PDSFSGVSLFSLSTEGCDEEEVLKSLKFSLFIVCTVTLTLFLMTILTVTKFRGFCFICYKTAQRLVFKDHPQGTEPDMYKYDAYLCFSSKDFTWVQNALLKH
LDTQYSDQNRFNLCFEERDFVPGENRIANIQDAIWNSRKIVCLVSRHFLRDGWCLEAFSYAQGRCLSDLNSALIMVVVGSLSQYQLMKHQSIRGFVQKQQYL
RWPEDFQDVGWFLHKLSQQILKKEKEKKKDNNIPLQTVATIS

[0514] SEQ ID NO: 35. TLR6

[0515] MTKDKEPIVKSFHFVCLMIIIVGTRIQFSDGNEFAVDKSKRGLIHVPKDLPLKTKVLDMSQNYIAELQVSDMSFLSELTVLRLSHNRIQLLDLSVFKFNQDL
EYLDLSHNQLQKISCHPIVSFRHLDLSFNDFKALPICKEFGNLSQLNFLGLSAMKLQKLDLLPIAHLHLSYILLDLRNYYIKENETESLQILNAKTLHLVFH
PTSLFAIQVNISVNTLGCLQLTNIKLNDDNCQVFIKFLSELTRGSTLLNFTLNHIETTWKCLVRVFQFLWPKPVEYLNIYNLTIIESIREEDFTYSKTTLKA
LTIEHITNQVFLFSQTALYTVFSEMNIMMLTISDTPFIHMLCPHAPSTFKFLNFTQNVFTDSIFEKCSTLVKLETLILQKNGLKDLFKVGLMTKDMPSLEIL
DVSWNSLESGRHKENCTWVESIVVLNLSSNMLTDSVFRCLPPRIKVLDLHSNKIKSVPKQVVKLEALQELNVAFNSLTDLPGCGSFSSLSVLIIDHNSVSHP
SADFFQSCQKMRSIKAGDNPFQCTCELREFVKNIDQVSSEVLEGWPDSYKCDYPESYRGSPLKDFHMSELSCNITLLIVTIGATMLVLAVTVTSLCIYLDLP
WYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYSEHDSAWVKSELVPYLEKEDIQICLHERNFVPGKSIVENIINCIEKSYKSIFVLSPNFVQSEWCHY
ELYFAHHNLFHEGSNNLILILLEPIPQNSIPNKYHKLKALMTQRTYLQWPKEKSKRGLFWANIRAAFNMKLTLVTENNDVKS

[0516] SEQ ID NO: 36. TLR7

[0517] MVFPMWTLKRQILILFNIILISKLLGARWFPKTLPCDVTLDVPKNHVIVDCTDKHLTEIPGGIPTNTTNLTLTINHIPDISPASFHRLDHLVEIDFRCNCVP
IPLGSKNNMCIKRLQIKPRSFSGLTYLKSLYLDGNQLLEIPQGLPPSLQLLSLEANNIFSIRKENLTELANIEILYLGQNCYYRNPCYVSYSIEKDAFLNLT
KLKVLSLKDNNVTAVPTVLPSTLTELYLYNNMIAKIQEDDFNNLNQLQILDLSGNCPRCYNAPFPCAPCKNNSPLQIPVNAFDALTELKVLRLHSNSLQHVP
PRWFKNINKLQELDLSQNFLAKEIGDAKFLHFLPSLIQLDLSFNFELQVYRASMNLSQAFSSLKSLKILRIRGYVFKELKSFNLSPLHNLQNLEVLDLGTNF
IKIANLSMFKQFKRLKVIDLSVNKISPSGDSSEVGFCSNARTSVESYEPQVLEQLHYFRYDKYARSCRFKNKEASFMSVNESCYKYGQTLDLSKNSIFFVKS
SDFQHLSFLKCLNLSGNLISQTLNGSEFQPLAELRYLDFSNNRLDLLHSTAFEELHKLEVLDISSNSHYFQSEGITHMLNFTKNLKVLQKLMMNDNDISSST
SRTMESESLRTLEFRGNHLDVLWREGDNRYLQLFKNLLKLEELDISKNSLSFLPSGVFDGMPPNLKNLSLAKNGLKSFSWKKLQCLKNLETLDLSHNQLTTV
PERLSNCSRSLKNLILKNNQIRSLTKYFLQDAFQLRYLDLSSNKIQMIQKTSFPENVLNNLKMLLLHHNRFLCTCDAVWFVWWVNHTEVTIPYLATDVTCVG
PGAHKGQSVISLDLYTCELDLTNLILFSLSISVSLFLMVMMTASHLYFWDVWYIYHFCKAKIKGYQRLISPDCCYDAFIVYDTKDPAVTEWVLAELVAKLED
PREKHFNLCLEERDWLPGQPVLENLSQSIQLSKKTVFVMTDKYAKTENFKIAFYLSHQRLMDEKVDVIILIFLEKPFQKSKFLQLRKRLCGSSVLEWPTNPQ
AHPYFWQCLKNALATDNHVAYSQVFKETV

[0518] SEQ ID NO: 37. TLR8

[0519] VGKYVTELDLSDNFITHITNESFQGLQNLTKINLNHNPNVQHQNGNPGIQSNGLNITDGAFLNLKNLRELLLEDNQLPQIPSGLPESLTELSLIQNNIYNIT
KEGISRLINLKNLYLAWNCYFNKVCEKTNIEDGVFETLTNLELLSLSFNSLSHVPPKLPSSLRKLFLSNTQIKYISEEDFKGLINLTLLDLSGNCPRCFNAP
FPCVPCDGGASINIDRFAFQNLTQLRYLNLSSTSLRKINAAWFKNMPHLKVLDLEFNYLVGEIASGAFLTMLPRLEILDLSFNYIKGSYPQHINISRNFSKL
LSLRALHLRGYVFQELREDDFQPLMQLPNLSTINLGINFIKQIDFKLFQNFSNLEIIYLSENRISPLVKDTRQSYANSSSFQRHIRKRRSTDFEFDPHSNFY
HFTRPLIKPQCAAYGKALDLSLNSIFFIGPNQFENLPDIACLNLSANSNAQVLSGTEFSAIPHVKYLDLTNNRLDFDNASALTELSDLEVLDLSYNSHYFRI
AGVTHHLEFIQNFTNLKVLNLSHNNIYTLTDKYNLESKSLVELVFSGNRLDILWNDDDNRYISIFKGLKNLTRLDLSLNRLKHIPNEAFLNLPASLTELHIN
DNMLKFFNWTLLQQFPRLELLDLRGNKLLFLTDSLSDFTSSLRTLLLSHNRISHLPSGFLSEVSSLKHLDLSSNLLKTINKSALETKTTTKLSMLELHGNPF

ECTCDIGDFRRWMDEHLNVKIPRLVDVICASPGDQRGKSIVSLELTTCVSDVTAVILFFFTFFITTMVMLAALAHHLFYWDVWFIYNVCLAKVKGYRSLSTS
QTFYDAYISYDTKDASVTDWVINELRYHLEESRDKNVLLCLEERDWDPGLAIIDNLMQSINQSKKTVFVLTKKYAKSWNFKTAFYLALQRLMDENMDVIIFI
LLEPVLQHSQYLRLRQRICKSSILQWPDNPKAEGLFWQTLRNVVLTENDSRYNNMYVDSIKQY

[0520] SEQ ID NO: 38. TLR9

[0521] MGFCRSALHPLSLLVQAIMLAMTLALGTLPAFLPCELQPHGLVNCNWLFLKSVPHFSMAAPRGNVTSLSLSSNRIHHLHDSDFAHLPSLRHLNLKWNCPPVG
LSPMHFPCHMTIEPSTFLAVPTLEELNLSYNNIMTVPALPKSLISLSLSHTNILMLDSASLAGLHALRFLFMDGNCYYKNPCRQALEVAPGALLGLGNLTHL
SLKYNNLTVVPRNLPSSLEYLLLSYNRIVKLAPEDLANLTALRVLDVGGNCRRCDHAPNPCMECPRHFPQLHPDTFSHLSRLEGLVLKDSSLSWLNASWFRG
LGNLRVLDLSENFLYKCITKTKAFQGLTQLRKLNLSFNYQKRVSFAHLSLAPSFGSLVALKELDMHGIFFRSLDETTLRPLARLPMLQTLRLQMNFINQAQL
GIFRAFPGLRYVDLSDNRISGASELTATMGEADGGEKVWLQPGDLAPAPVDTPSSEDFRPNCSTLNFTLDLSRNNLVTVQPEMFAQLSHLQCLRLSHNCISQ
AVNGSQFLPLTGLQVLDLSHNKLDLYHEHSFTELPRLEALDLSYNSQPFGMQGVGHNFSFVAHLRTLRHLSLAHNNIHSQVSQQLCSTSLRALDFSGNALGH
MWAEGDLYLHFFQGLSGLIWLDLSQNRLHTLLPQTLRNLPKSLQVLRLRDNYLAFFKWWSLHFLPKLEVLDLAGNQLKALTNGSLPAGTRLRRLDVSCNSIS
FVAPGFFSKAKELRELNLSANALKTVDHSWFGPLASALQILDVSANPLHCACGAAFMDFLLEVQAAVPGLPSRVKCGSPGQLQGLSIFAQDLRLCLDEALSW
DCFALSLLAVALGLGVPMLHHLCGWDLWYCFHLCLAWLPWRGRQSGRDEDALPYDAFVVFDKTQSAVADWVYNELRGQLEECRGRWALRLCLEERDWLPGKT
LFENLWASVYGSRKTLFVLAHTDRVSGLLRASFLLAQQRLLEDRKDVVVLVILSPDGRRSRYVRLRQRLCRQSVLLWPHQPSGQRSFWAQLGMALTRDNHHF
YNRNFCQGPTAE

[0522] SEQ ID NO: 39. TLR10

[0523] MRLIRNIYIFCSIVMTAEGDAPELPEERELMTNCSNMSLRKVPADLTPATTTLDLSYNLLFQLQSSDFHSVSKLRVLILCHNRIQQLDLKTFEFNKELRYLD
LSNNRLKSVTWYLLAGLRYLDLSFNDFDTMPICEEAGNMSHLEILGLSGAKIQKSDFQKIAHLHLNTVFLGFRTLPHYEEGSLPILNTTKLHIVLPMDTNFW
VLLRDGIKTSKILEMTNIDGKSQFVSYEMQRNLSLENAKTSVLLLNKVDLLWDDLFLILQFVWHTSVEHFQIRNVTFGGKAYLDHNSFDYSNTVMRTIKLEH
VHFRVFYIQQDKIYLLLTKMDIENLTISNAQMPHMLFPNYPTKFQYLNFANNILTDELFKRTIQLPHLKTLILNGNKLETLSLVSCFANNTPLEHLDLSQNL
LQHKNDENCSWPETVVNMNLSYNKLSDSVFRCLPKSIQILDLNNNQIQTVPKETIHLMALRELNIAFNFLTDLPGCSHFSRLSVLNIEMNFILSPSLDFVQS
CQEVKTLNAGRNPFRCTCELKNFIQLETYSEVMMVGWSDSYTCEYPLNLRGTRLKDVHLHELSCNTALLIVTIVVIMLVLGLAVAFCCLHFDLPWYLRMLGQ
CTQTWHRVRKTTQEQLKRNVRFHAFISYSEHDSLWVKNELIPNLEKEDGSILICLYESYFDPGKSISENIVSFIEKSYKSIFVLSPNFVQNEWCHYEFYFAH
HNLFHENSDHIILILLEPIPFYCIPTRYHKLKALLEKKAYLEWPKDRRKCGLFWANLRAAINVNVLATREMYELQTFTELNEESRGSTISLMRTDCL

[0524] SEQ ID NO: 40. 예시적인 TLR 폴리펩티드 1(TLR4)

[0525] TIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKV
IVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQE
ATSI

[0526] SEQ ID NO: 41. 예시적인 TLR 폴리펩티드 2(TLR2)

[0527] LSVSECHRTALVSGMCCALFLLILLTGVLCHRFHGLWYMKMMWAWLQAKRKPRKAPSRNICYDAFVSYSERDAYWVENLMVQELENFNPPFKLCLHKRDFIP
GKWIIDNIIDSIEKSHKTVFVLSENFVKSEWCKYELDFSHFRLFDENNDAAILILLEPIEKKAIPQRFCKLRKIMNTKTYLEWPMDEAQREGFWVNLRAAIK
S

[0528] SEQ ID NO: 42. 예시적인 TLR 폴리펩티드 3(TLR1)

[0529] LSCNITLLIVTIVATMLVLAVTVTSLCSYLDLPWYLRMVCQWTQTRRRARNIPLEELQRNLQFHAFISYSGHDSFWVKNELLPNLEKEGMQICLHERNFVPG
KSIVENIITCIEKSYKSIFVLSPNFVQSEWCHYELYFAHHNLFHEGSNSLILILLEPIPQYSIPSSYHKLKSLMARRTYLEWPKEKSKRGLFWANLRAAINI
KLTEQAKK

[0530] SEQ ID NO: 43. CLL1/CD33 이중 CAR

[0531] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQAGGALSLSCAASGYTVRIDYMGWYRQTPGKGREPVATIASNGGTAYADSVEGRFTISQDNAKNSVYLQ
MNTLKPGDTAMYYCAAGTWPTLTYFGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSINCMGWFRQAPGKEREGVAVISTGGGRTDYRD
SVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAGKTTYPGYGCGLGRSAYNYWGQGTQVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT
RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0532] SEQ ID NO: 44. 직렬 항BCMA sdAb

[0533] AVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCASRGIE
VEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITYKDAVKGRFTISKDNAKNTLYL

QMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSS

[0534] SEQ ID NO: 45. GM-CSF 신호 펩티드

[0535] MWLQSLLLLGTVACSIS

[0536] SEQ ID NO: 46. IL-15 신호 펩티드

[0537] MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEA

[0538] SEQ ID NO: 47. FLAG태그

[0539] DYKDDDDK

[0540] SEQ ID NO: 48. HA태그

[0541] YPYDVPDYA

[0542] SEQ ID NO: 49. c-Myc태그

[0543] EQKLISEEDL

[0544] SEQ ID NO: 50. CD28 4-1BB 세포내 신호 전달 도메인

[0545] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0546] SEQ ID NO: 51. NKG2D 81-216

[0547] SLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV

[0548] SEQ ID NO: 52. NKG2D 89-216

[0549] IPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV

[0550] SEQ ID NO: 53. NKG2D 98-216

[0551] PCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV

[0552] SEQ ID NO: 54. NKG2D 1-216

[0553] MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV

[0554] SEQ ID NO: 55. GPC3 scFv

[0555] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSS

[0556] SEQ ID NO: 56. 항GPC3 4-1BB CAR

[0557] MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0558] SEQ ID NO: 57. NKG2D TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 4-1BB CAR

[0559] MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA

VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHW
MGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGE
NIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQK
VEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0560] SEQ ID NO: 58. NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항GPC3 4-1BB CAR

[0561] MALPVTALLLPLALLLHAARPDYKDDDDKDVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNANTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEW
MGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA
VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN
LGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGD
VEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHW
MGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFH
KSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTG
CNWQEATSI

[0562] SEQ ID NO: 59. NKG2D TLR4 키메라 수용체로 무장한 항CD19 4-1BB CAR

[0563] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMA
LPVTALLLPLALLLHAARPSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTN
GSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIY
SSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQ
VELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0564] SEQ ID NO: 60. NKG2D CD8 TLR4 키메라 수용체로 무장한 항CD19 4-1BB CAR

[0565] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE
DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNS
ALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMA
LPVTALLLPLALLLHAARPSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTN
GSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDTIIG
VSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVV
SQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0566] SEQ ID NO: 61. 직렬 항BCMA-공동 항BCMA CAR

[0567] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITY
KDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
ALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ
MNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITYK
DAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSSTSQMNKTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRG
ENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQ

KVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0568] SEQ ID NO: 62. 단일 항BCMA-공동 항BCMA CAR

[0569] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPQV
QLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITYKDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSV
AYWGQGTQVTVSSTSQMNKTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIP
GVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALL
DGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0570] SEQ ID NO: 63. 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD8 CAR

[0571] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPQV
QLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITYKDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSV
AYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENI
YDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVE
KTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0572] SEQ ID NO: 64. 단일 항BCMA-공동 항BCMA-CD28 CAR

[0573] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPQV
QLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITYKDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSV
AYWGQGTQVTVSSTSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVI
YSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQ
QVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0574] SEQ ID NO: 65. 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D CAR

[0575] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITY
KDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
ALPVTALLLPLALLLHAARPQSVVTQPPSMSAAPGQQVTISCSGGNSNIERNYVSWYLQLPGTAPKLVIFDNDRRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTG
DEADYYCGTWDSSLRGWVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIN
GRGSSTIYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARYISRGLGDSWGQGTLVTVTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGR
GENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVL
QKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0576] SEQ ID NO: 66. 직렬 항BCMA CAR

[0577] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITY
KDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0578] SEQ ID NO: 67. 단일 항BCMA CAR

[0579] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0580] SEQ ID NO: 68. 제1 단일 항BCMA sdAb

[0581] AVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCASRGIE
VEEFGAWGQGTQVTVSS

[0582] SEQ ID NO: 69. 제2 단일 항BCMA sdAb

[0583] QVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITYKDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDW
SVAYWGQGTQVTVSS

[0584] SEQ ID NO: 70. 항GPRC5D scFv

[0585] QSVVTQPPSMSAAPGQQVTISCSGGNSNIERNYVSWYLQLPGTAPKLVIFDNDRRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLRGWVFG
GGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSTINGRGSSTIYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARYISRGLGDSWGQGTLVTV

[0586] SEQ ID NO: 71. CLL1-공동CD33-2 CAR

[0587] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGSVQAGGALSLSCAASGYTVRIDYMGWYRQTPGKGREPVATIASNGGTAYADSVEGRFTISQDNAKNSVYLQ
MNTLKPGDTAMYYCAAGTWPTLTYFGQGTQVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLV
ESGGGSVQAGGSLRLSCAASGYTYSINCMGWFRQAPGKEREGVAVISTGGGRTDYRDSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAMYYCAGKTTYPGYGC
GLGRSAYNYWGQGTQVTVSSQMNKTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHY
RDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRL
RKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQEATSI

[0588] SEQ ID NO: 72. 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD8 CAR

[0589] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITY
KDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
ALPVTALLLPLALLLHAARPQSVVTQPPSMSAAPGQQVTISCSGGNSNIERNYVSWYLQLPGTAPKLVIFDNDRRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTG
DEADYYCGTWDSSLRGWVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIN
GRGSSTIYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARYISRGLGDSWGQGTLVTVTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
GLDFACDTTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHE
GFHKSRKVIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTV
GTGCNWQEATSI

[0590] SEQ ID NO: 73. 직렬 항BCMA-공동 항GPRC5D-CD28 CAR

[0591] MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLVQAGDSLRLTCTASGRAFSTYFMAWFRQAPGKEREFVAGIAWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL
QMNSLKSEDTAVYYCASRGIEVEEFGAWGQGTQVTVSSGGGGSQVQLEESGGGSVQAGGSLRLSCAYTYSTYSNYYMGWFREAPGKARTSVAIISSDTTITY
KDAVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDSAMYRCAAWTSDWSVAYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPM
ALPVTALLLPLALLLHAARPQSVVTQPPSMSAAPGQQVTISCSGGNSNIERNYVSWYLQLPGTAPKLVIFDNDRRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTG
DEADYYCGTWDSSLRGWVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMNWVRQAPGKGLEWVSTIN
GRGSSTIYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARYISRGLGDSWGQGTLVTVIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSK
PTIIGVSVLSVLVVSVVAVLVYKFYFHLMLLAGCIKYGRGENIYDAFVIYSSQDEDWVRNELVKNLEEGVPPFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRK
VIVVVSQHFIQSRWCIFEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLLRQQVELYRLLSRNTYLEWEDSVLGRHIFWRRLRKALLDGKSWNPEGTVGTGCNWQ

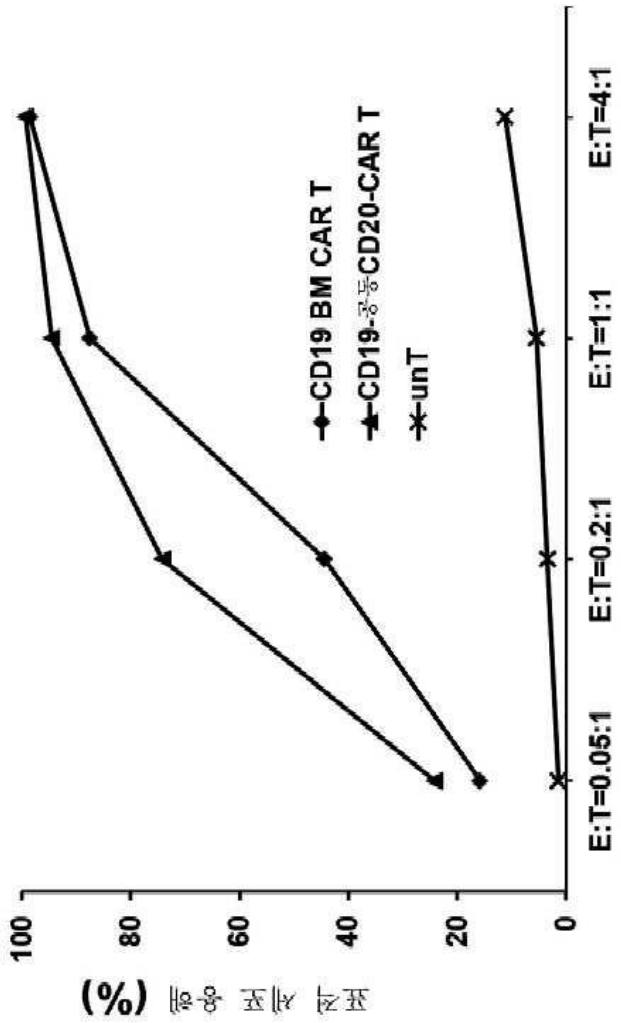
EATSI

도면

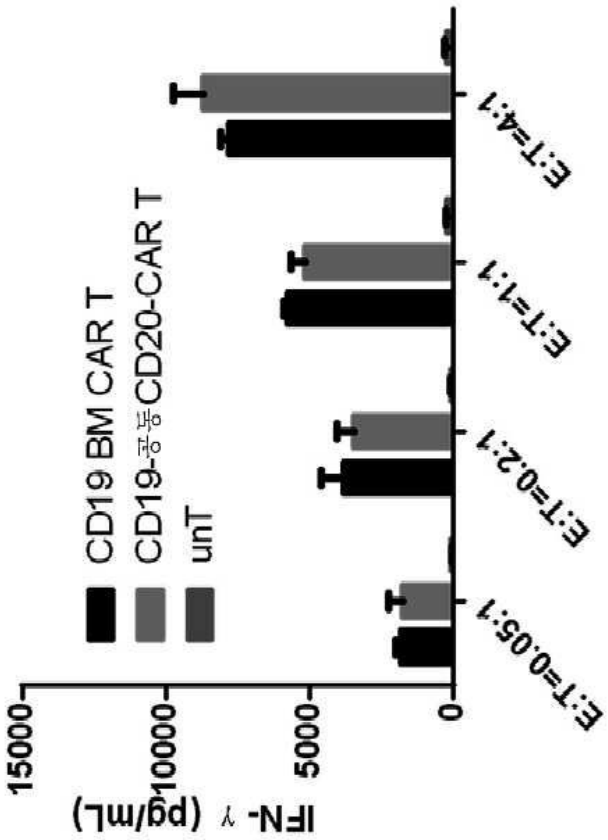
도면1


N
신호 펩티드
항 CD19 scFv
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 CD20 scFv
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C

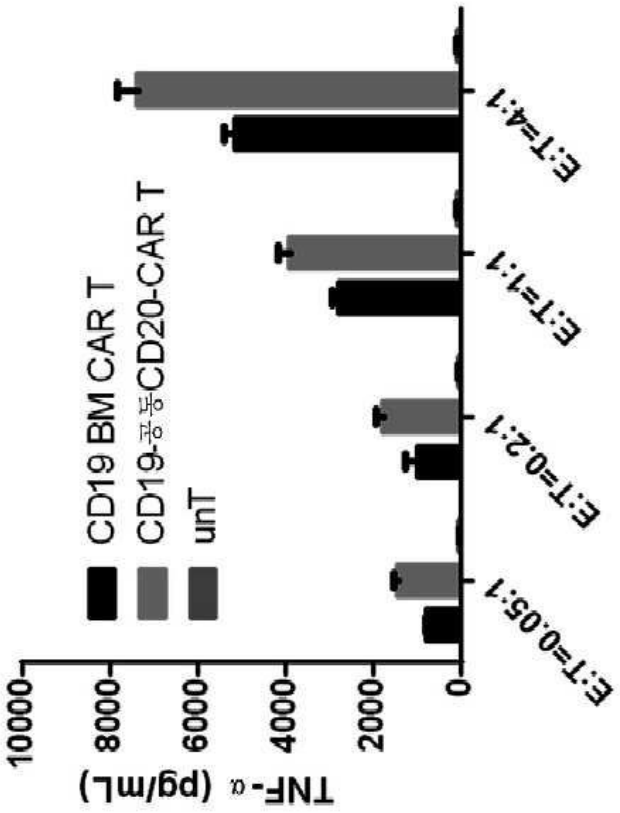
도면2


표적 세포 용해 (%)
100
80
60
40
20
0
CD19 BM CAR T
CD19-공동CD20-CAR T
unT
E:T=0.05:1
E:T=0.2:1
E:T=1:1
E:T=4:1

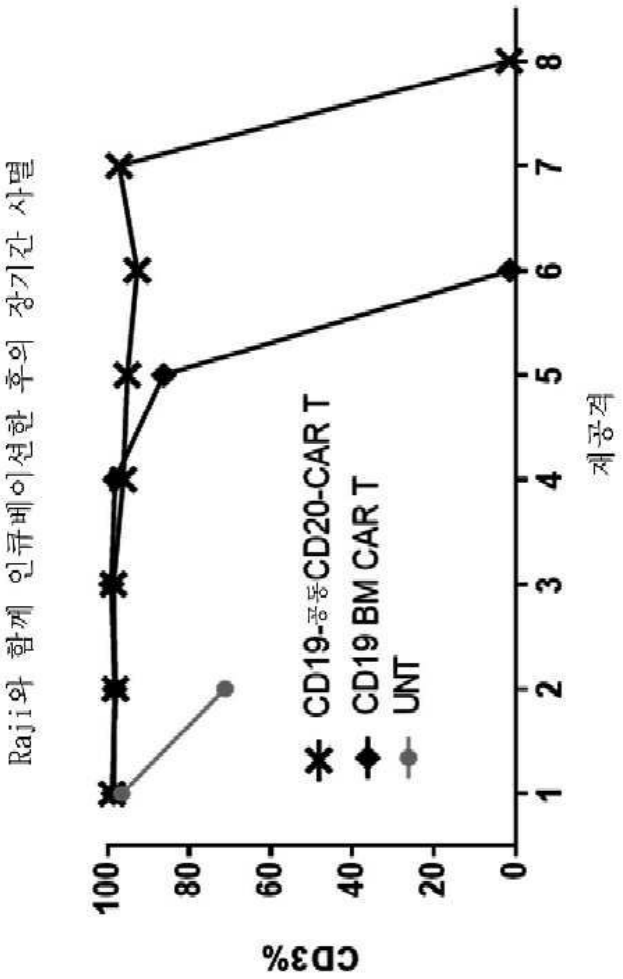
도면3


CD19 BM CAR T
CD19-공동CD20-CAR T
unT
IFN- γ (pg/mL)
15000
10000
5000
0
E:T=4:1
E:T=1:1
E:T=0.2:1
E:T=0.05:1

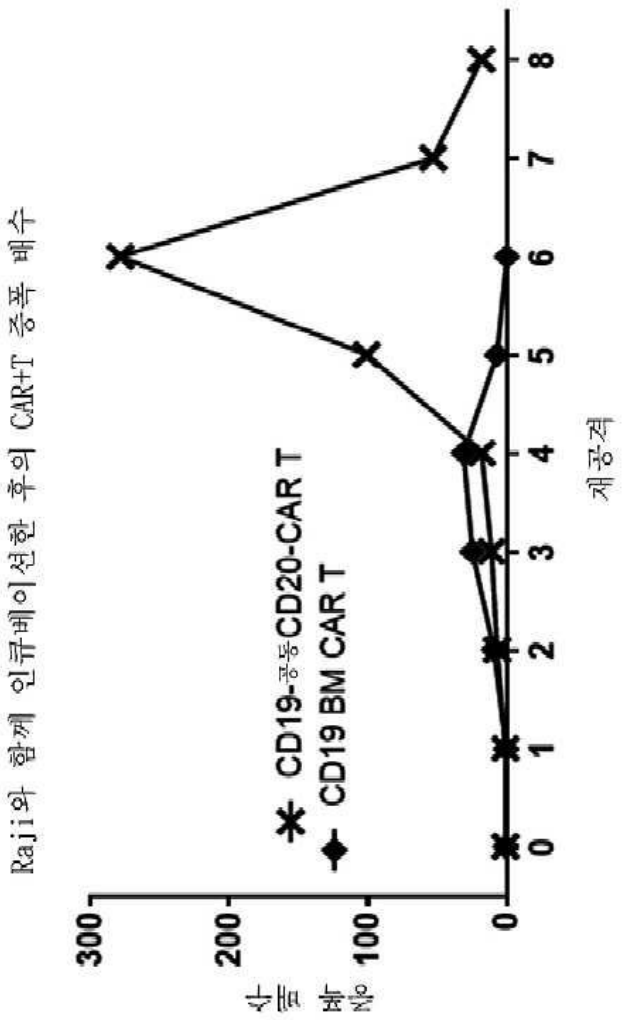
도면4


CD19 BM CAR T
CD19-공동CD20-CAR T
unT
TNF-α (pg/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
E:T=4:1
E:T=1:1
E:T=0.2:1
E:T=0.05:1

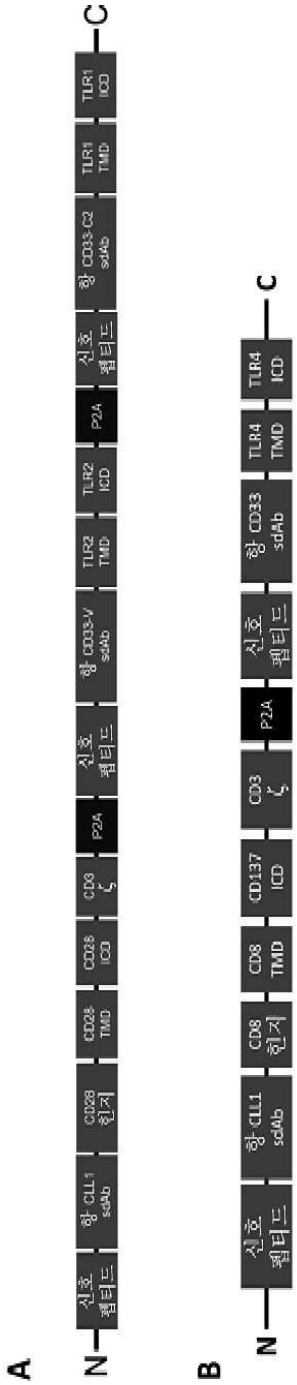
도면5


Raji와 함께 인큐베이션한 후의 장기간 사멸
CD3%
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
제공격
CD19-공동CD20-CAR T
CD19 BM CAR T
UNT

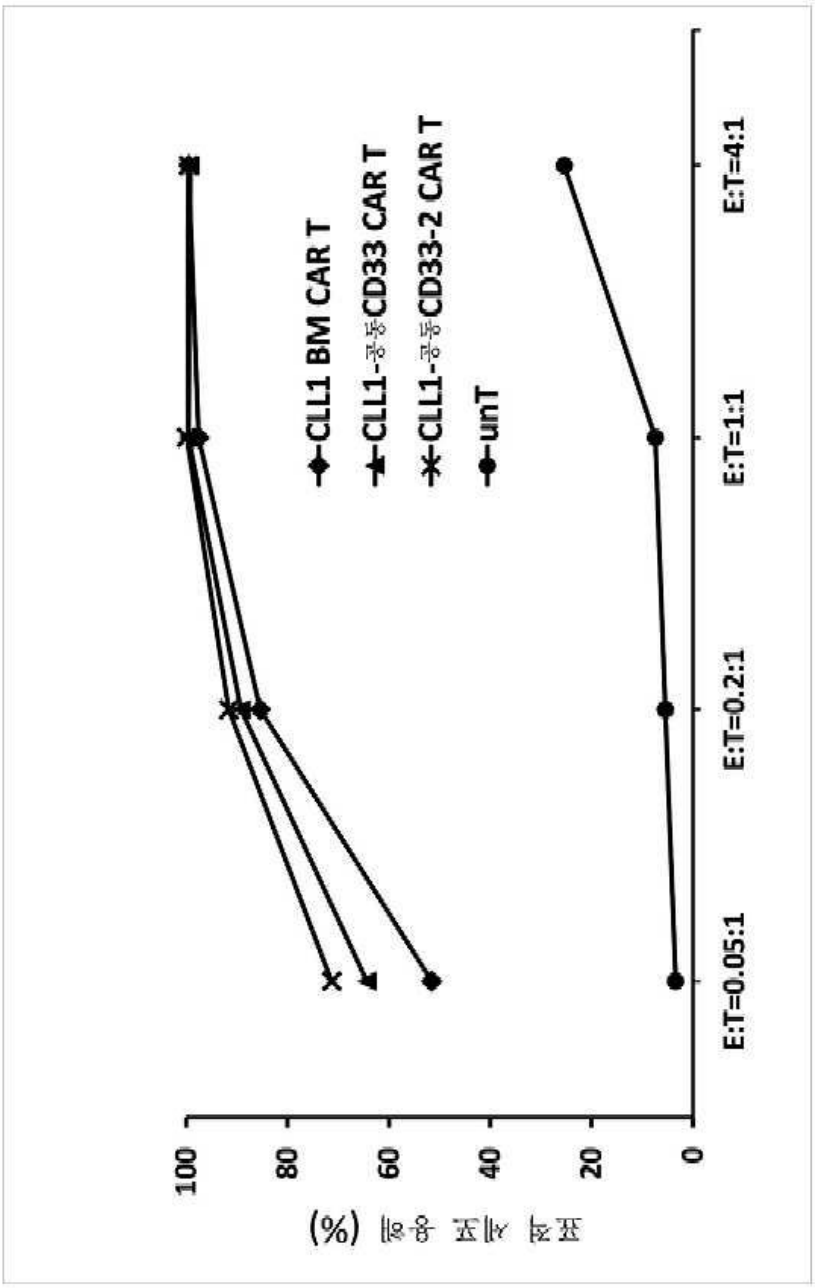
도면6


Raji와 함께 인큐베이션한 후의 CAR+T 증폭 배수
CD19-공동CD20-CAR T
CD19 BM CAR T
상대 복제수
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
재공격

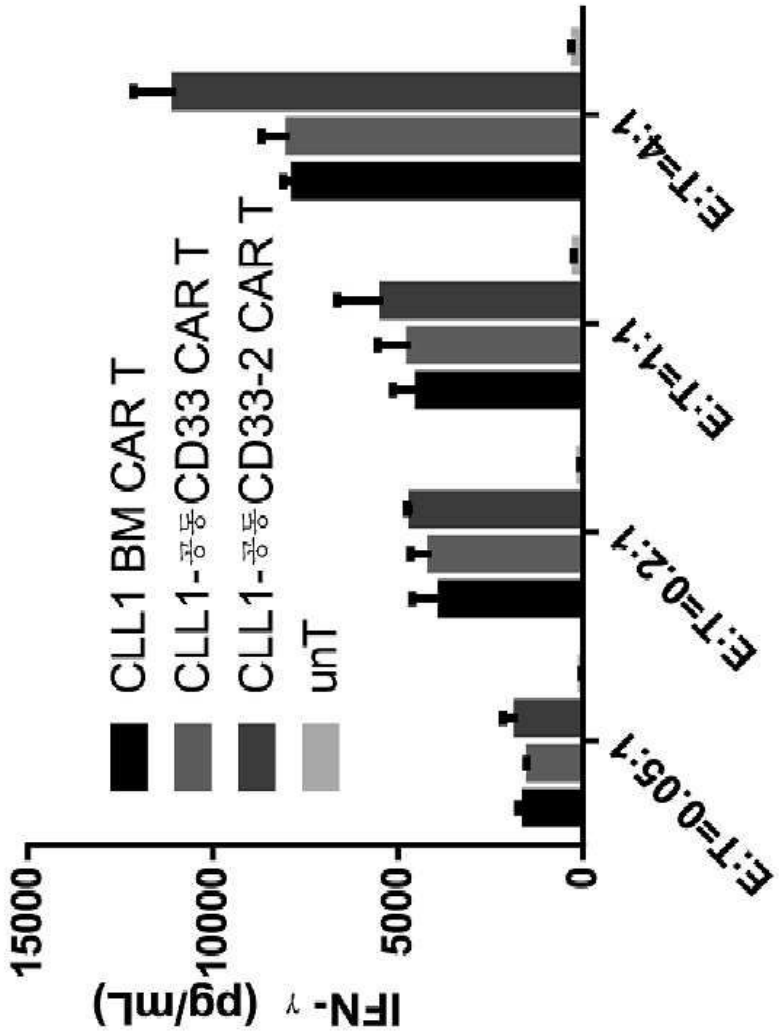
도면7


A
N
신호 펩타드
항 CLL1 scAb
CD28 힌지
CD28 TMD
CD28 ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩타드
항 CD33-V scAb
TLR2 TMD
TLR2 ICD
P2A
신호 펩타드
항 CD33-C2 scAb
TLR1 TMD
TLR1 ICD
C
B
N
신호 펩타드
항 CLL1 scAb
CD8 힌지
CD8 TMD
CD137 ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩타드
항 CD33 scAb
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C

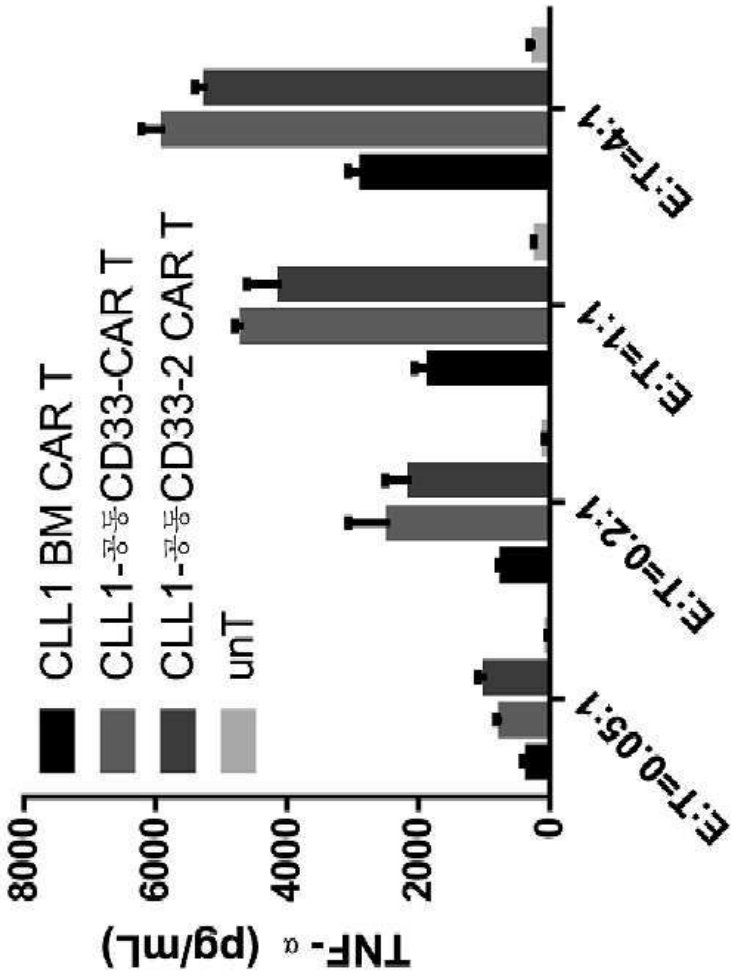
도면8


표적 세포 용해 (%)
100
80
60
40
20
0
E:T=0.05:1
E:T=0.2:1
E:T=1:1
E:T=4:1
CLL1 BM CAR T
CLL1-공동CD33 CAR T
CLL1-공동CD33-2 CAR T
unT

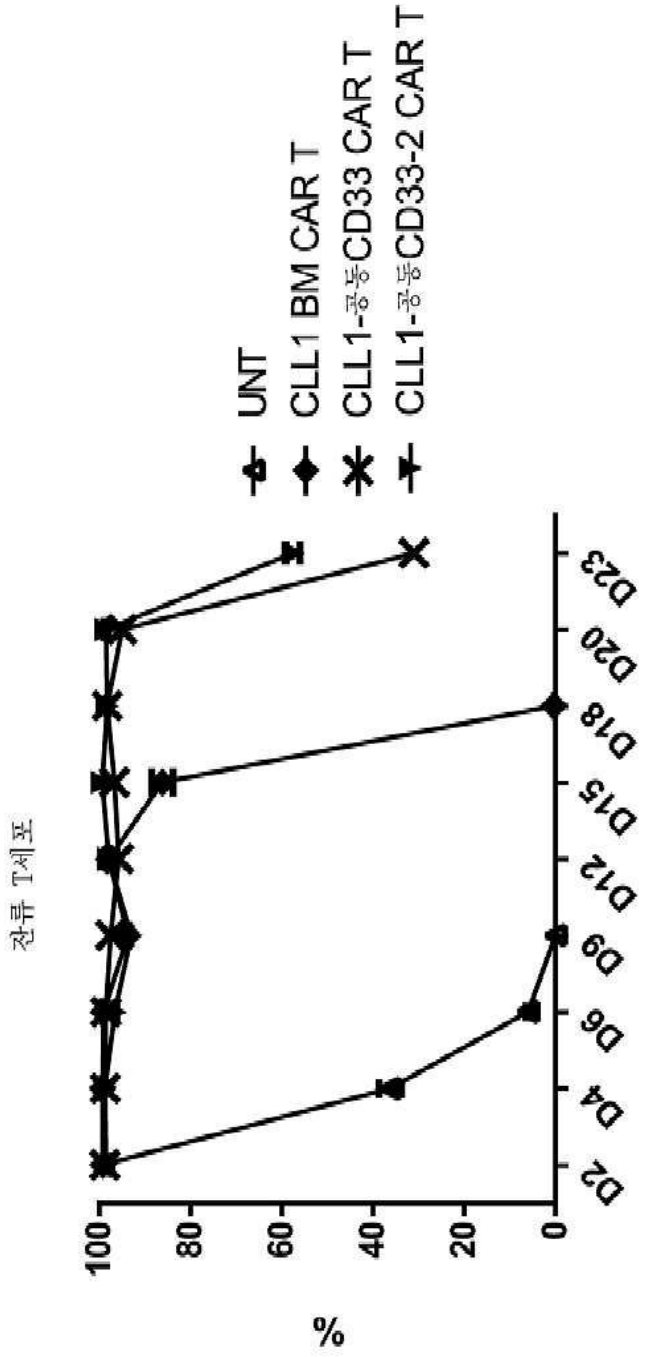
도면9


CLL1 BM CAR T
CLL1-공동CD33 CAR T
CLL1-공동CD33-2 CAR T
unT
IFN-γ (pg/mL)
15000
10000
5000
0
E:T=4:1
E:T=1:1
E:T=0.2:1
E:T=0.05:1

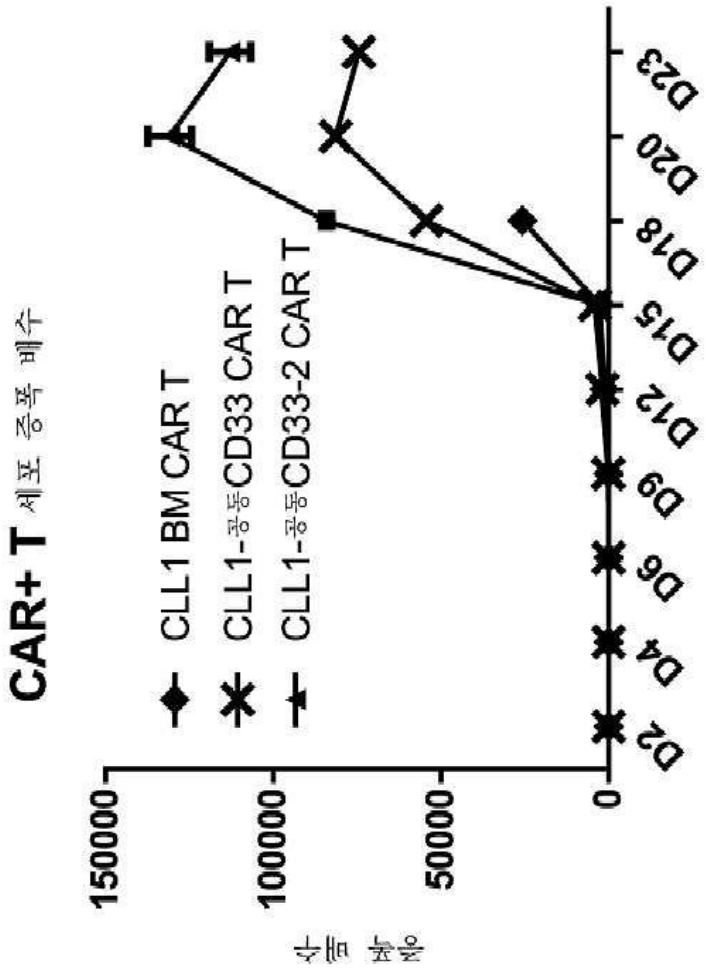
도면10


CLL1 BM CAR T
CLL1-공동CD33-CAR T
CLL1-공동CD33-2 CAR T
unT
TNF-α (pg/mL)
8000
6000
4000
2000
0
E:T=4:1
E:T=1:1
E:T=0.2:1
E:T=0.05:1

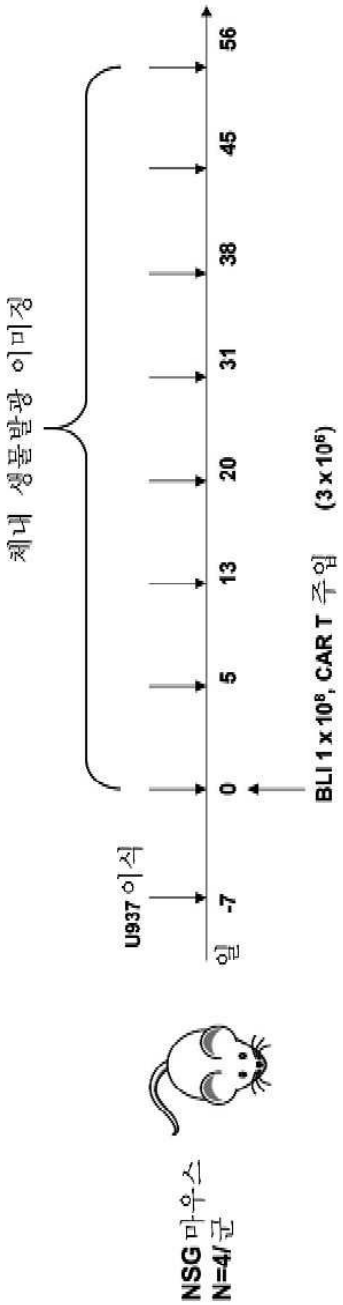
도면11


UNT
CLL1 BM CAR T
CLL1-공동CD33 CAR T
CLL1-공동CD33-2 CAR T
잔류 T세포
%
100
80
60
40
20
0
D2
D4
D6
D9
D12
D15
D18
D20
D23

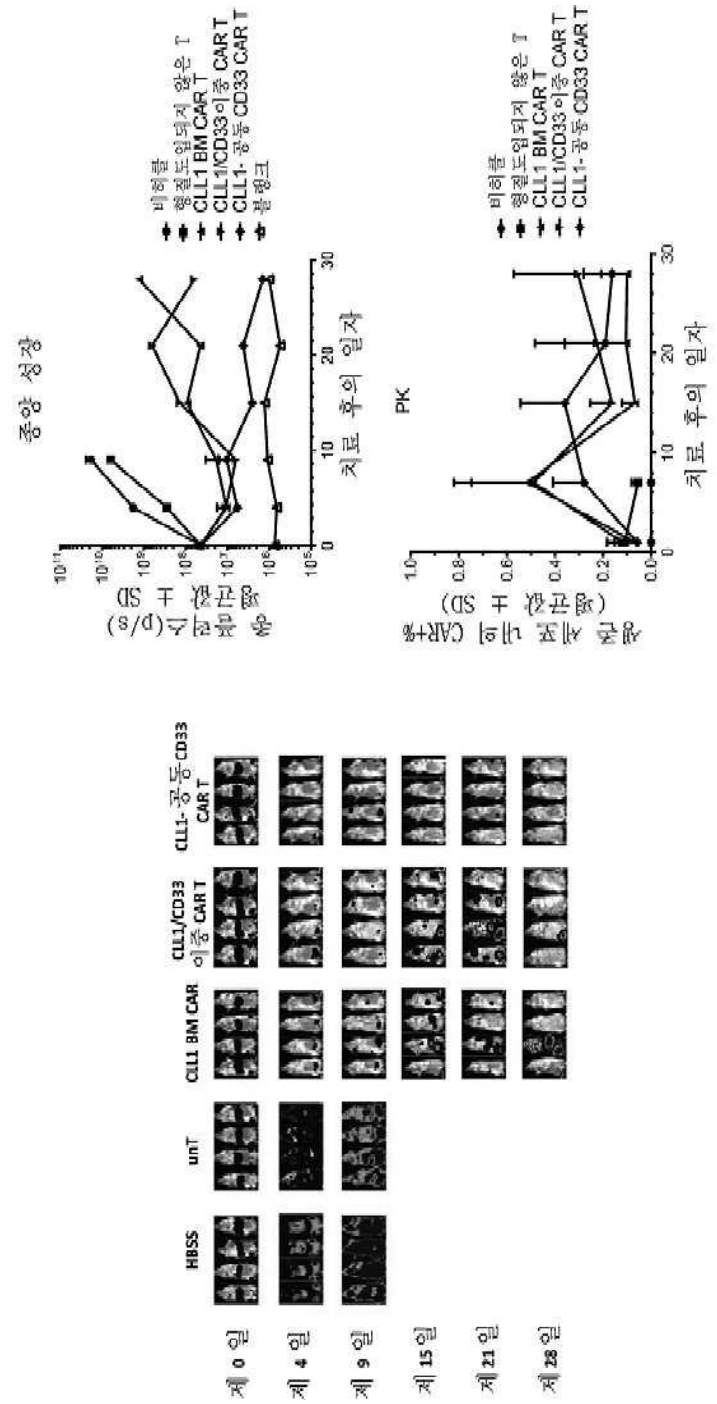
도면12


CAR+ T 세포 증폭 배수
CLL1 BM CAR T
CLL1-공동CD33 CAR T
CLL1-공동CD33-2 CAR T
150000
100000
50000
0
증폭 배수
D2
D4
D6
D9
D12
D15
D18
D20
D23

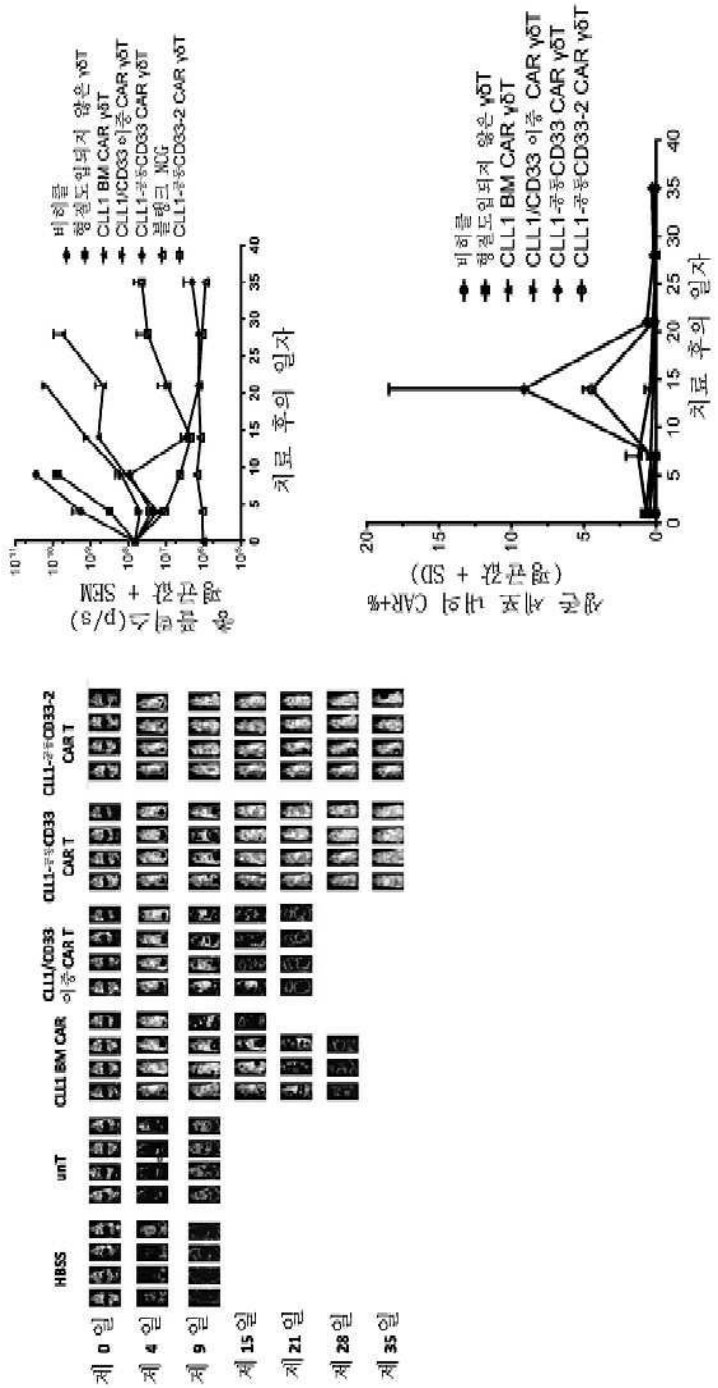
도면13


NSG 마우스
N=4/군
U937 이식
일 -7
0
5
13
20
31
38
45
56
BLI 1 x 10^6, CAR T 주입 (3 x 10^6)
체내 생물발광 이미징

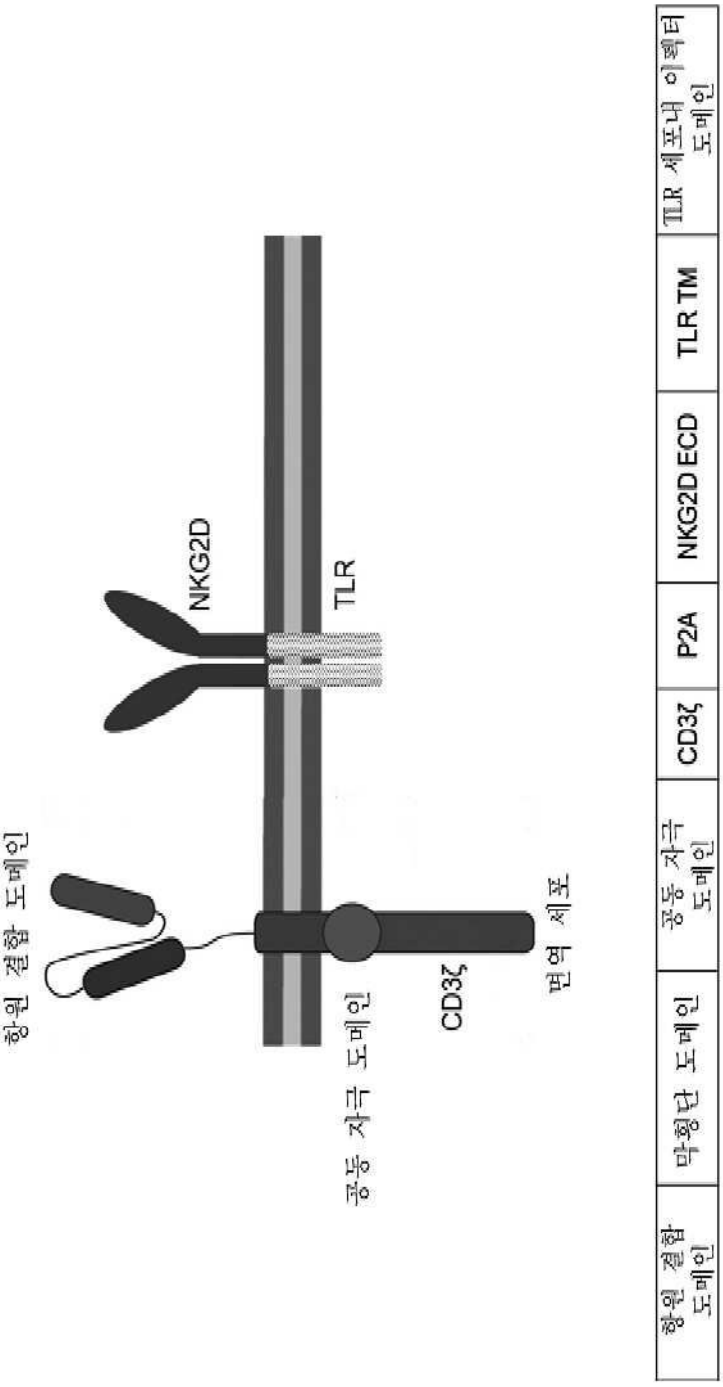
도면14


종양 성장
생물 발광 (p/s)
평균값 ± SD
치료 후의 일자
비히클
형질도입되지 않은 T
CLL1 BM CAR T
CLL1/CD33 이중 CAR T
CLL1-공동 CD33 CAR T
불렝크
PK
생착 세포 내의 CAR+%
(평균값 ± SD)
치료 후의 일자
비히클
형질도입되지 않은 T
CLL1 BM CAR T
CLL1/CD33 이중 CAR T
CLL1-공동 CD33 CAR T
HBSS
unT
CLL1 BM CAR
CLL1/CD33 이중 CAR T
CLL1-공동 CD33 CAR T
제 0 일
제 4 일
제 9 일
제 15 일
제 21 일
제 28 일

도면15

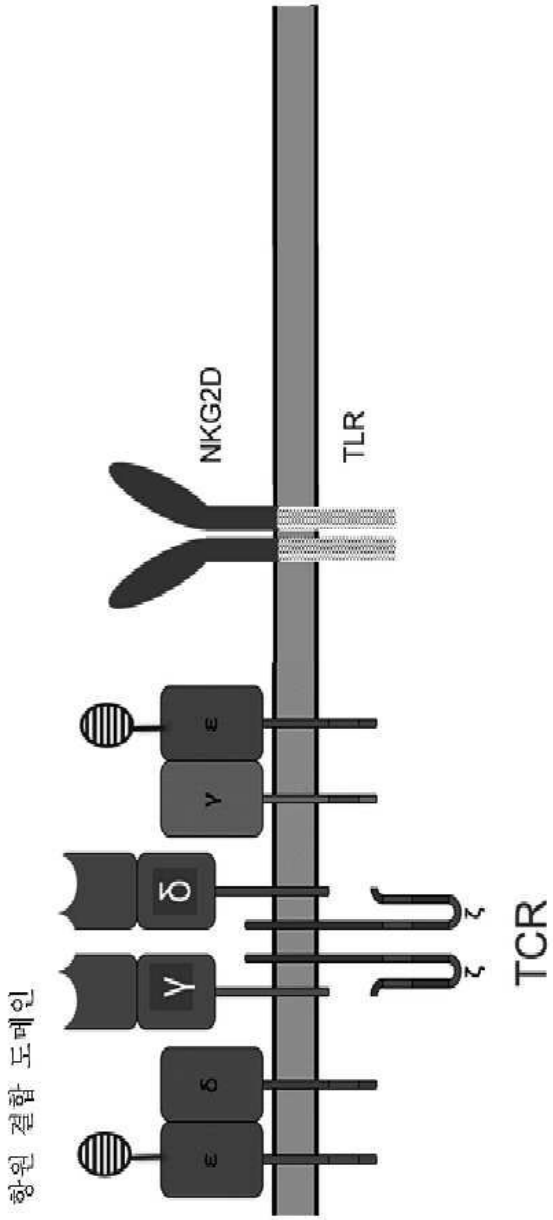

HBSS
unT
CLL1 BM CAR
CLL1/CD33 이중 CAR T
CLL1-공동CD33 CAR T
CLL1-공동CD33-2 CAR T
제 0 일
제 4 일
제 9 일
제 15 일
제 21 일
제 28 일
제 35 일
생존 세포 내의 CAR+% (평균값 + SD)
치료 후의 일자
비히클
형질도입되지 않은 γδT
CLL1 BM CAR γδT
CLL1/CD33 이중 CAR γδT
CLL1-공동CD33 CAR γδT
CLL1-공동CD33-2 CAR γδT
종 광휘도(p/s) 평균값 + SEM
치료 후의 일자
비히클
형질도입되지 않은 γδT
CLL1 BM CAR γδT
CLL1/CD33 이중 CAR γδT
CLL1-공동CD33 CAR γδT
블랭크 NCG
CLL1-공동CD33-2 CAR γδT

도면16a



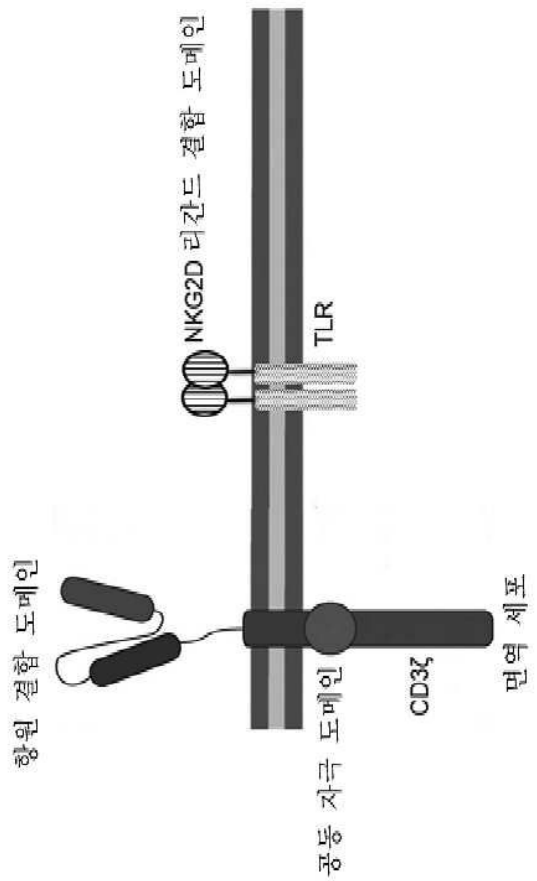
항원 결합 도메인	막횡단 도메인	공동 자극 도메인	CD3ζ	P2A	NKG2D ECD	TLR TM	TLR 세포내 이펙터 도메인

도면16b



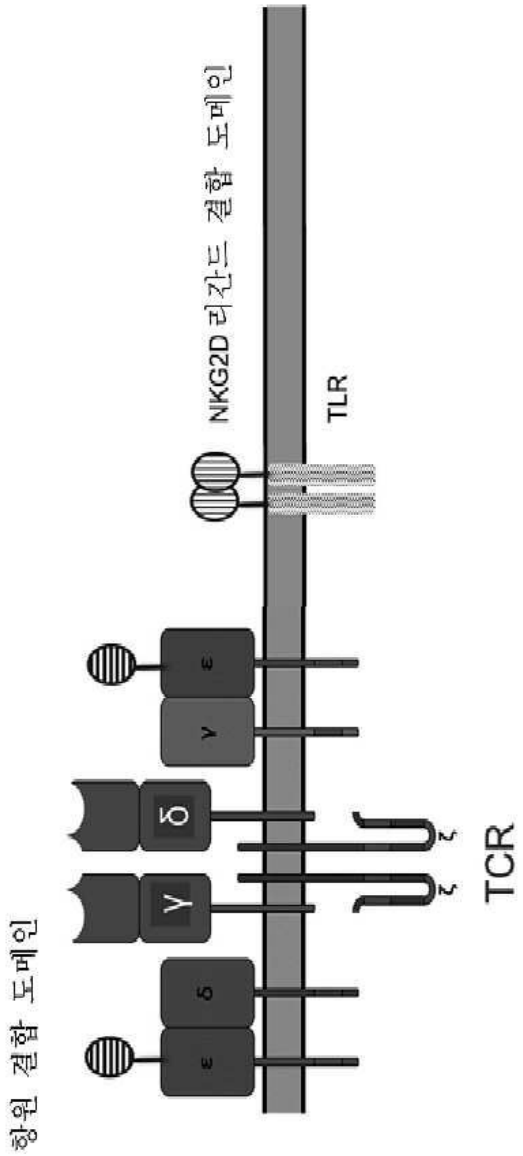
항원 결합 도메인	CD3ε	P2A	NKG2D ECD	TLR TM	TLR 세포내 이펙터 도메인

도면17a



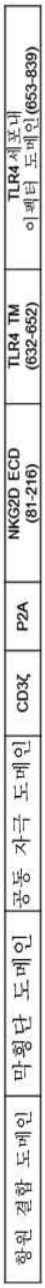
항원 결합 도메인	막횡단 도메인	공동 자극 도메인	CD3ζ	P2A	NKG2D 리간드 결합 도메인	TLR TM	TLR 세포내 이펙터 도메인

도면17b



항원 결합 도메인	CD3ε	P2A	NKG2D 리간드 결합 도메인	TLR TM	TLR 세포내 이펙터 도메인

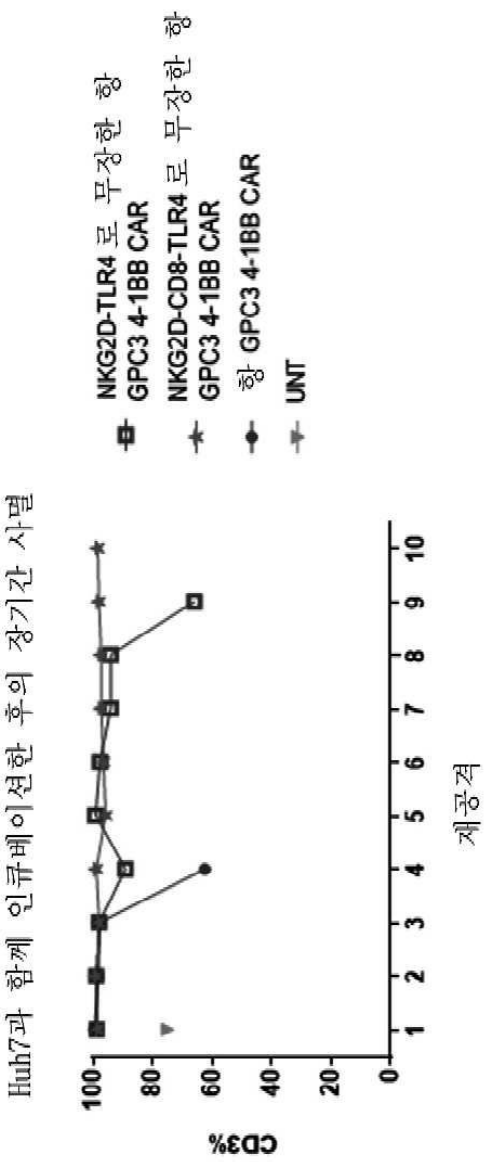
도면18a


항원 결합 도메인
막횡단 도메인
공동 자극 도메인
CD3ζ
P2A
NKG2D ECD (81-216)
TLR4 TM (632-652)
TLR4 세포내 이펙터 도메인 (653-839)

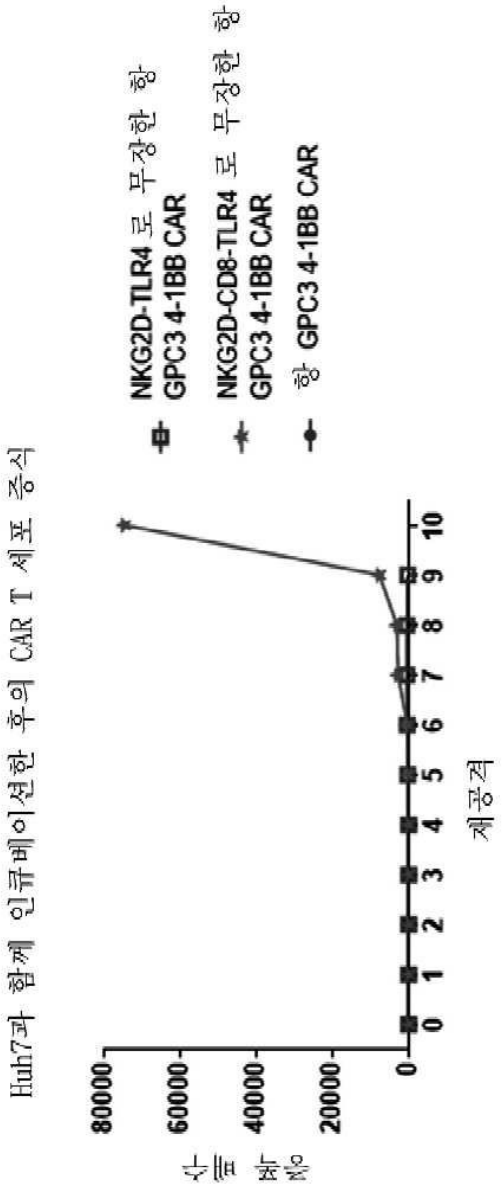
도면18b


항원 결합 도메인
CD3ε
P2A
NKG2D ECD (81-216)
TLR4 TM (632-652)
TLR4 세포내 이펙터 도메인 (653-839)

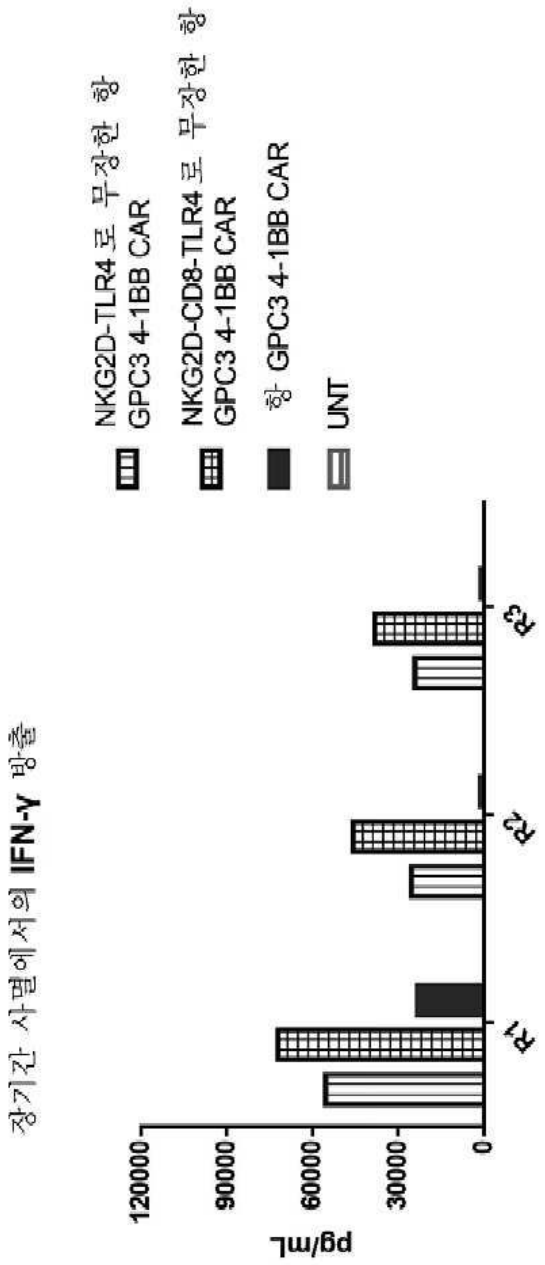
도면19


Huh7과 함께 인큐베이션한 후의 장기간 사멸
NKG2D-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR
NKG2D-CD8-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR
항 GPC3 4-1BB CAR
UNT
CD3%
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
재공격

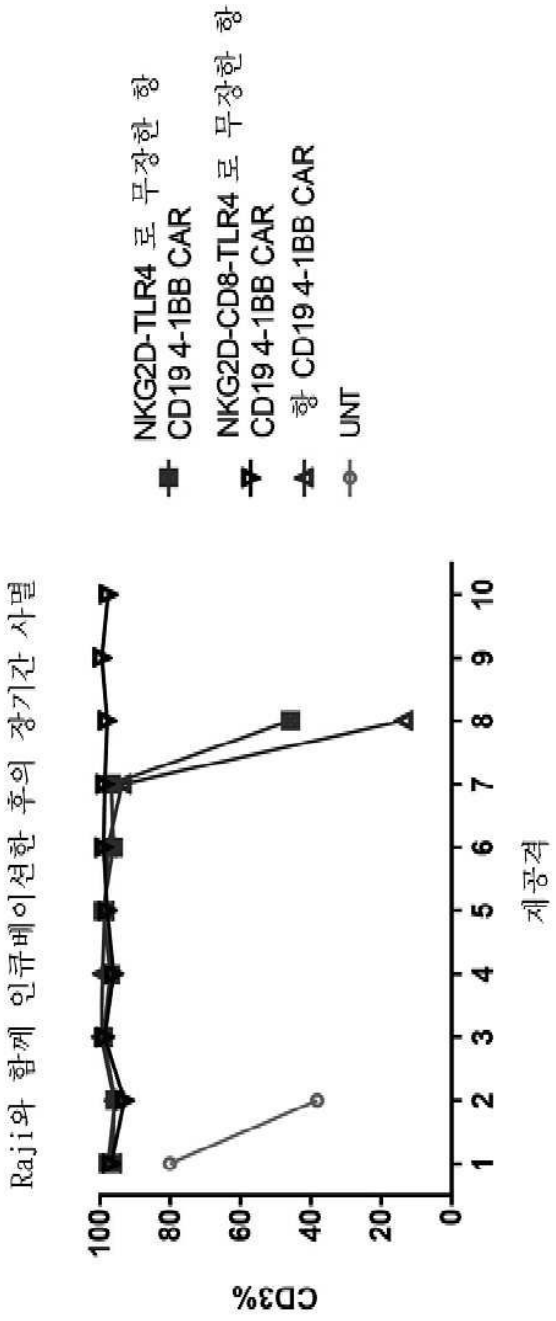
도면20


Huh7과 함께 인큐베이션한 후의 CAR T 세포 증식
NKG2D-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR
NKG2D-CD8-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR
항 GPC3 4-1BB CAR
80000
60000
40000
20000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
제공격

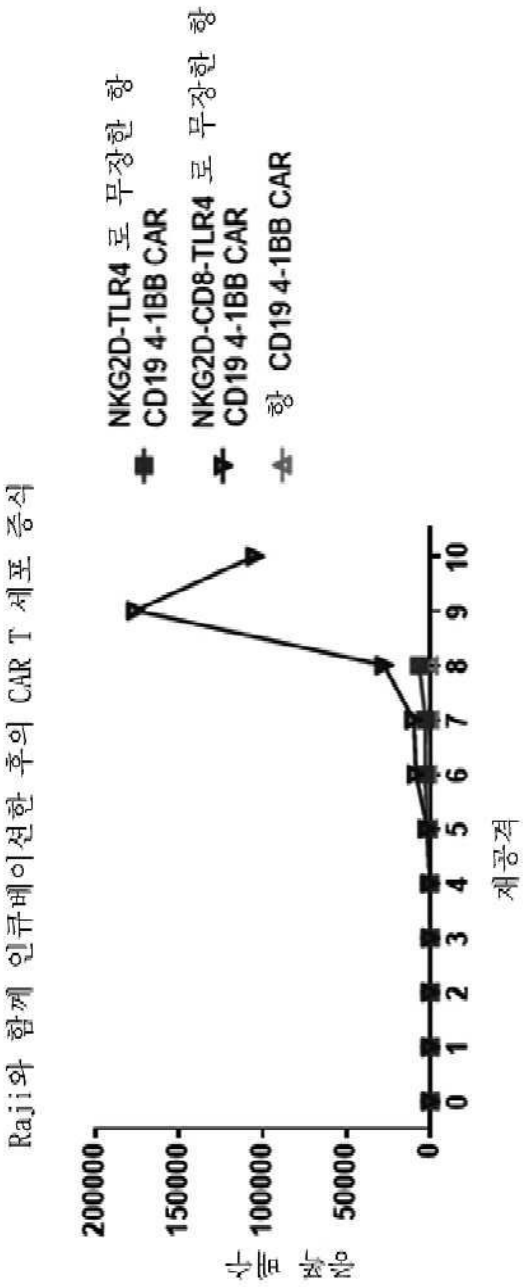
도면21


장기간 사멸에서의 IFN-γ 방출
pg/mL
120000
90000
60000
30000
0
R1
R2
R3
NKG2D-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR
NKG2D-CD8-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR
항 GPC3 4-1BB CAR
UNT

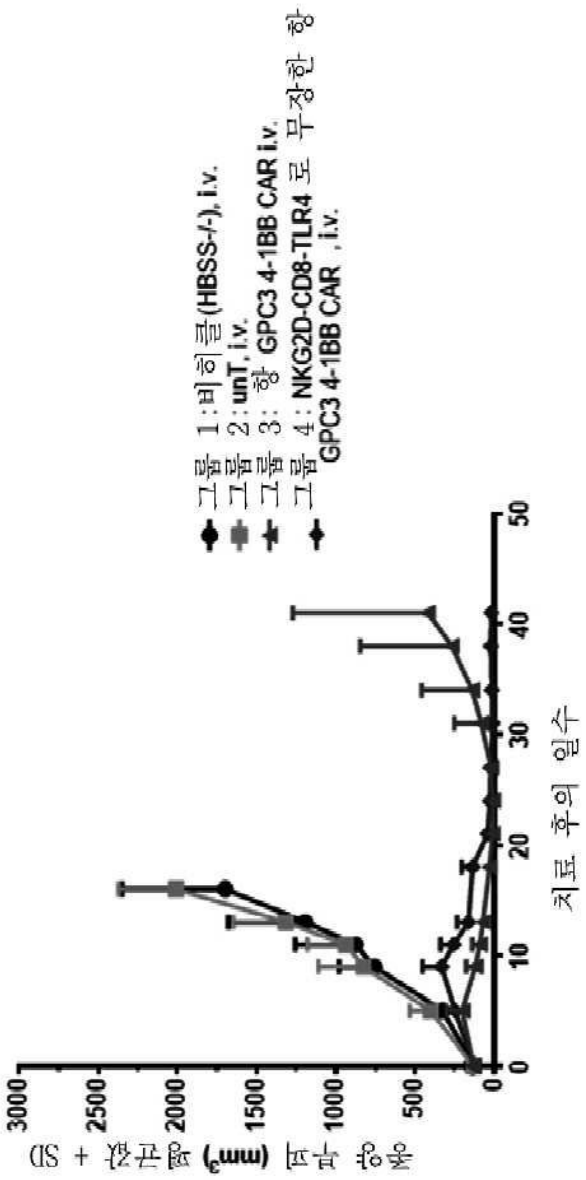
도면22


NKG2D-TLR4 로 무장한 항 CD19 4-1BB CAR
NKG2D-CD8-TLR4 로 무장한 항 CD19 4-1BB CAR
항 CD19 4-1BB CAR
UNT
Raji와 함께 인큐베이션한 후의 장기간 사멸
CD3%
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
제공격

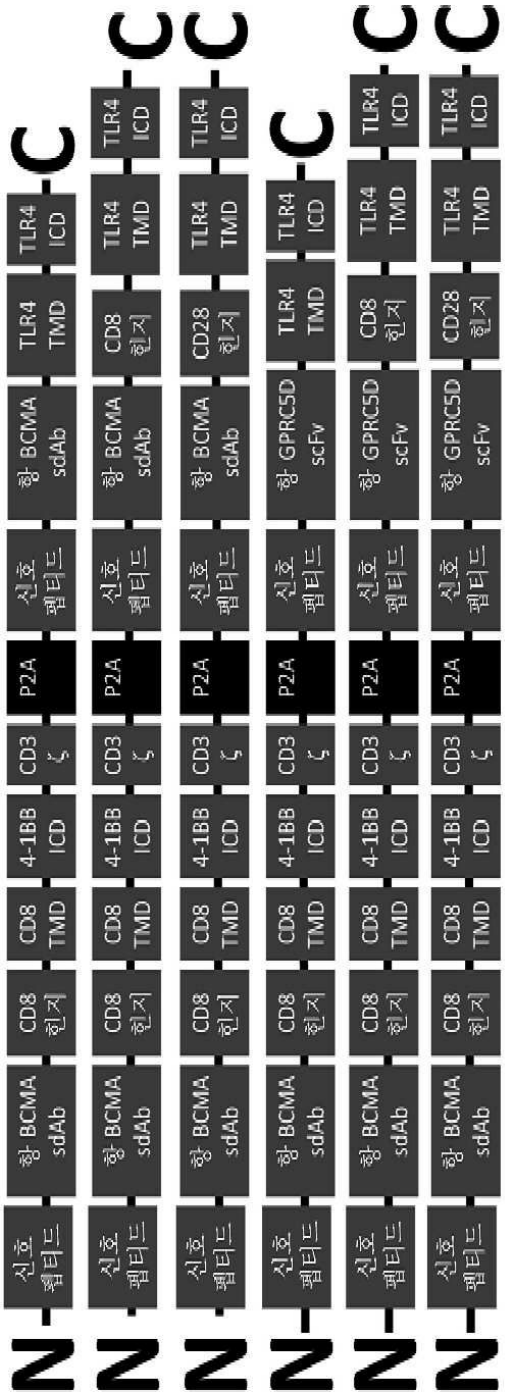
도면23


Raji와 함께 인큐베이션한 후의 CAR T 세포 증식
NKG2D-TLR4 로 무장한 항 CD19 4-1BB CAR
NKG2D-CD8-TLR4 로 무장한 항 CD19 4-1BB CAR
항 CD19 4-1BB CAR
생존 세포
200000
150000
100000
50000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
재공격

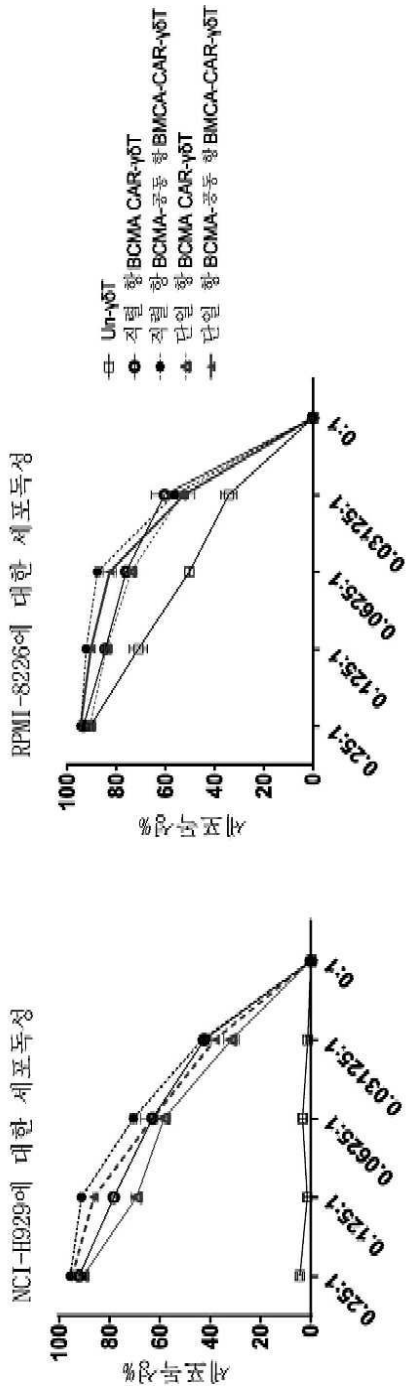
도면24


그룹 1:비히클(HBSS-/-), i.v.
그룹 2: unT, i.v.
그룹 3: 항 GPC3 4-1BB CAR i.v.
그룹 4: NKG2D-CD8-TLR4 로 무장한 항 GPC3 4-1BB CAR , i.v.
종양 부피 평균값 + SD (mm³)
치료 후의 일수
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
10
20
30
40
50

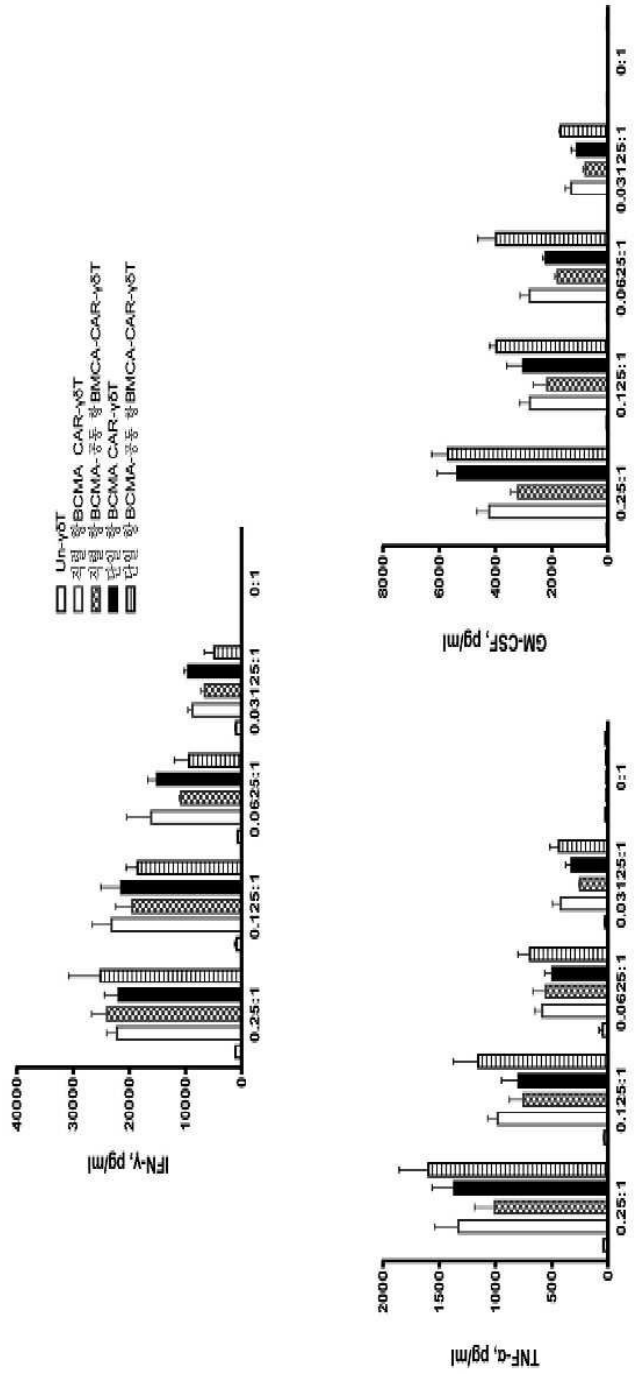
도면25


N
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C
N
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C
N
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD28 힌지
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C
N
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 GPRC5D scFv
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C
N
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 GPRC5D scFv
CD8 힌지
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C
N
신호 펩티드
항 BCMA sdAb
CD8 힌지
CD8 TMD
4-1BB ICD
CD3 ζ
P2A
신호 펩티드
항 GPRC5D scFv
CD28 힌지
TLR4 TMD
TLR4 ICD
C

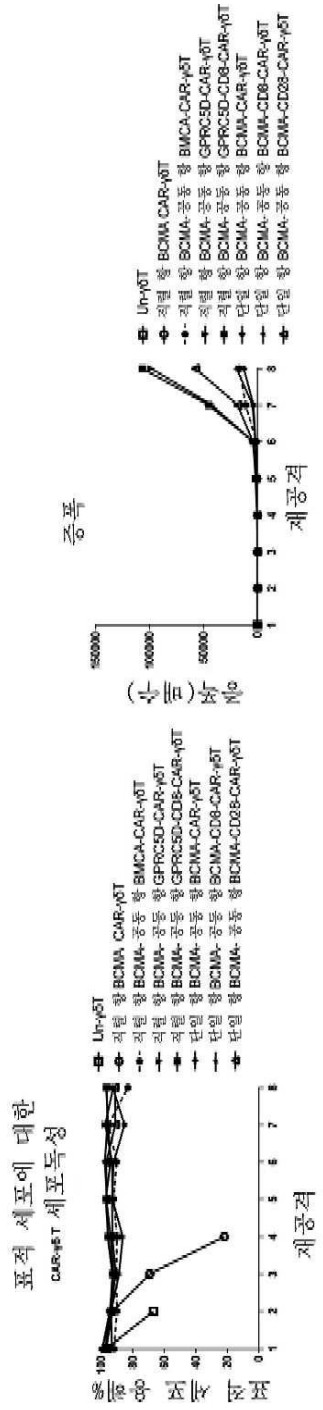
도면26


RPMI-8226에 대한 세포독성
NCI-H929에 대한 세포독성
세포독성%
0
20
40
60
80
100
0:1
0.25:1
0.125:1
0.0625:1
0.03125:1
Un-γδT
직렬 항BCMA CAR-γδT
직렬 항BCMA-공동 항BMCA-CAR-γδT
단일 항BCMA CAR-γδT
단일 항BCMA-공동 항BMCA-CAR-γδT

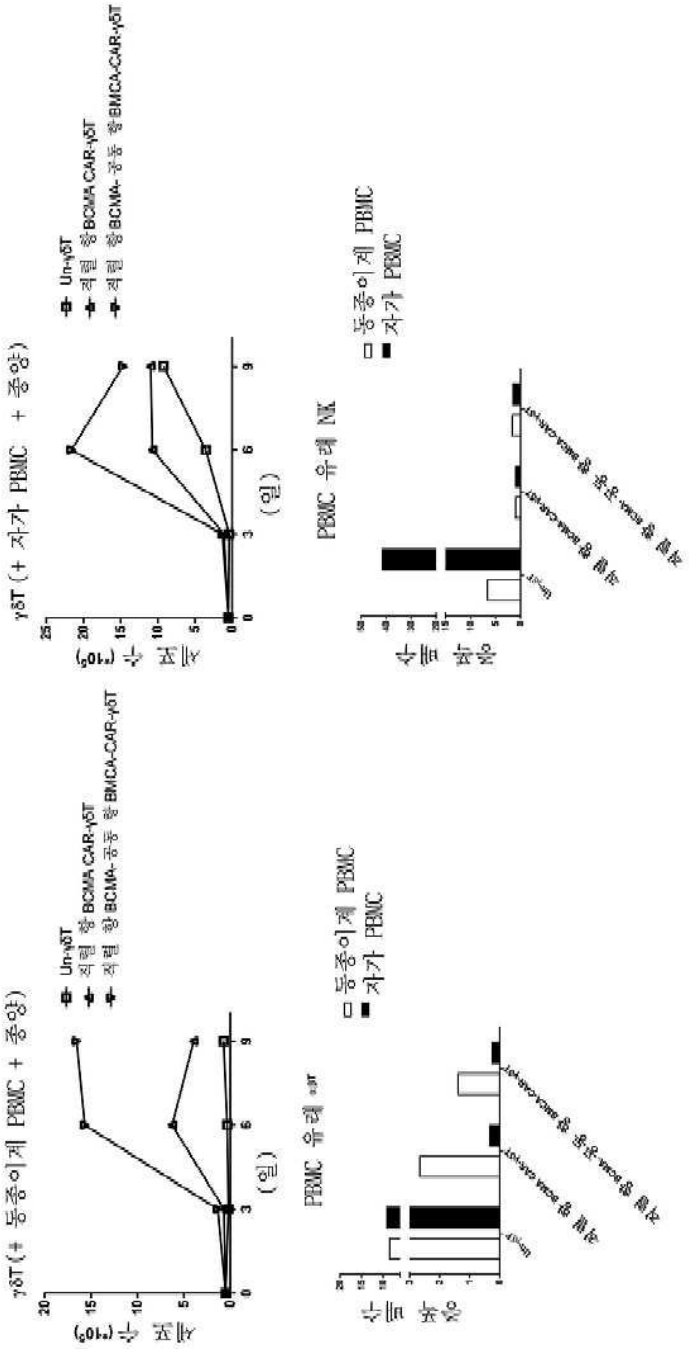
도면27


Un-γδT
직렬 항BCMA CAR-γδT
직렬 항BCMA-공동 항BMCA-CAR-γδT
단일 항BCMA CAR-γδT
단일 항BCMA-공동 항BMCA-CAR-γδT
IFN-γ, pg/ml
GM-CSF, pg/ml
TNF-α, pg/ml
0:1
0.25:1
0.125:1
0.0625:1
0.03125:1

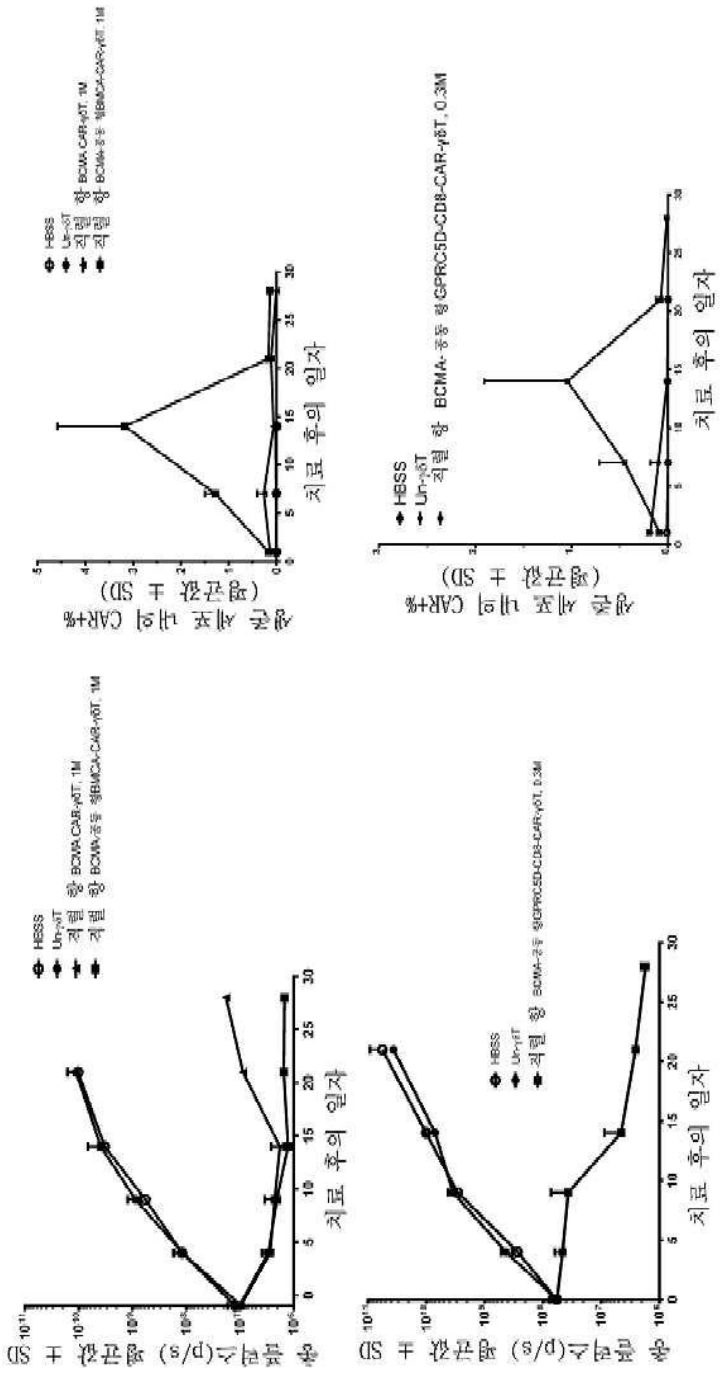
도면28


표적 세포에 대한
CAR-γδT 세포독성
Un-γδT
직렬 항 BCMA CAR-γδT
직렬 항 BCMA- 공동 항 BMCA-CAR-γδT
직렬 항 BCMA- 공동 항 GPRC5D-CAR-γδT
직렬 항 BCMA- 공동 항 GPRC5D-CD8-CAR-γδT
단일 항 BCMA- 공동 항 BCMA-CAR-γδT
단일 항 BCMA- 공동 항 BCMA-CD8-CAR-γδT
단일 항 BCMA- 공동 항 BCMA-CD28-CAR-γδT
재공격
증폭
재공격

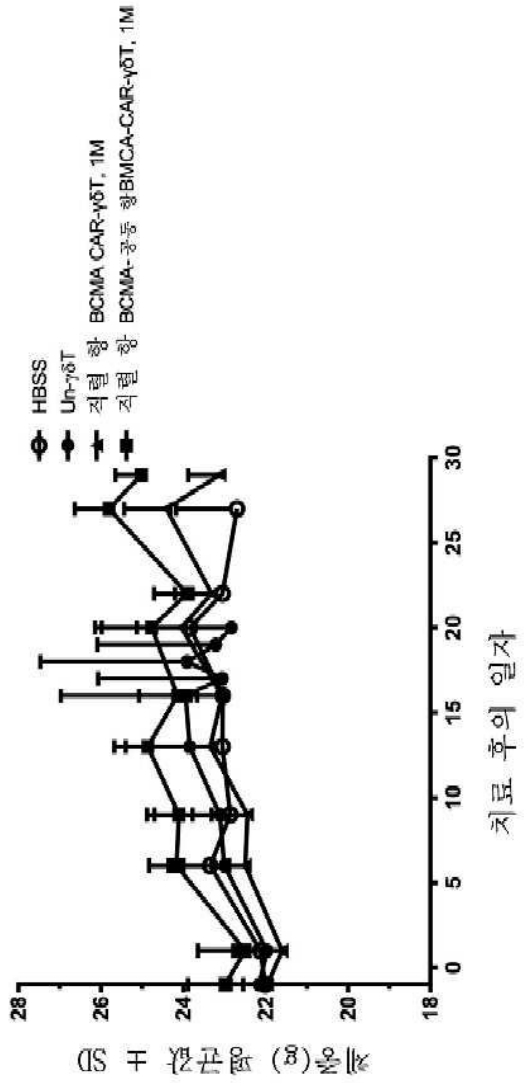
도면29


γδT (+ 동종이계 PBMC + 종양)
Un-γδT
적렬 항 BCMA CAR-γδT
적렬 항 BCMA-공동 항 BMCA-CAR-γδT
(일)
PBMC 유래 NK
동종이계 PBMC
자가 PBMC
Un-γδT
적렬 항 BCMA CAR-γδT
적렬 항 BCMA-공동 항 BMCA-CAR-γδT
(일)
PBMC 유래 NK
동종이계 PBMC
자가 PBMC

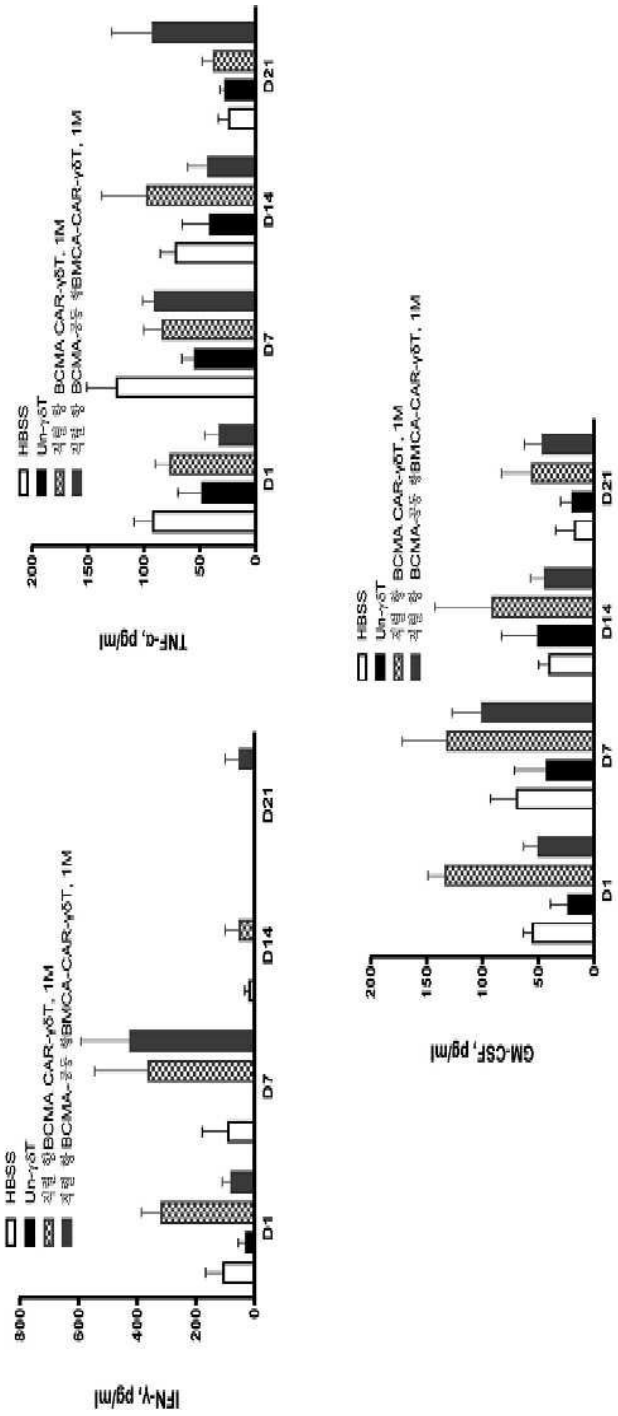
도면30


생존 세포 내의 CAR+% (평균값 ± SD)
치료 후의 일자
HBSS
UnTγδT
적혈 항 BCMA-CAR-γδT, 1M
적혈 항 BCMA-CAR-γδT, 1M
생존 세포 내의 CAR+% (평균값 ± SD)
치료 후의 일자
HBSS
UnTγδT
적혈 항 BCMA-CAR-γδT, 1M
적혈 항 BCMA-CAR-γδT, 1M
총 플럭스(p/s) 평균값 ± SD
치료 후의 일자
HBSS
UnTγδT
적혈 항 BCMA-CAR-γδT, 0.3M
총 플럭스(p/s) 평균값 ± SD
치료 후의 일자

도면31a


HBSS
Un-γδT
직렬 항 BCMA CAR-γδT, 1M
직렬 항 BCMA-공동 항BMCA-CAR-γδT, 1M
체중(g) 평균값 ± SD
치료 후의 일자
28
26
24
22
20
18
0
5
10
15
20
25
30

도면31b


IFN-γ, pg/ml
TNF-α, pg/ml
GM-CSF, pg/ml
HBSS
Un-γδT
직렬 항BCMA CAR-γδT, 1M
직렬 항 BCMA-공동 항BMCA-CAR-γδT, 1M
D1
D7
D14
D21

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.