



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0070449
(43) 공개일자 2022년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7010243
(22) 출원일자(국제) 2020년08월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/048843
(87) 국제공개번호 WO 2021/042072
국제공개일자 2021년03월04일
(30) 우선권주장
62/894,849 2019년09월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
엑수마 바이오테크, 코포레이션
미국, 플로리다 33401, 웨스트 팜 비치, 스위트
625, 625 엔. 플레글러 드라이브
(72) 발명자
프로스트 그레고리 이안
미국, 플로리다 33401, 웨스트 팜 비치, 스위트
625, 625 엔. 플레글러 드라이브
오누퍼 제임스 조셉
미국, 플로리다 33401, 웨스트 팜 비치, 스위트
625, 625 엔. 플레글러 드라이브
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

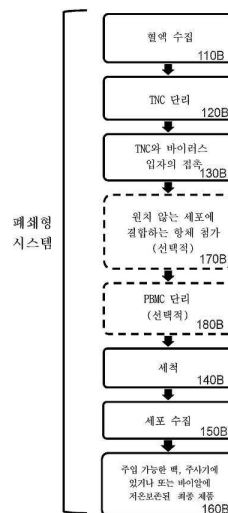
전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 림프구의 변형 및 전달을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 개시내용은 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 방법은 PBMC가 아닌 전혈 또는 이의 성분을 사용하여 생성된 반응 혼합물 및 생성된 세포 제형을 포함하고, 추가적으로 T 세포 및 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 갖는 재조합 레트로바이러스 입자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구는 대상체에게 피하로 재도입된다. 일부 실시형태에서, CAR에 대한 결합에 반응하여 세포 생존 및 증식을 조절하는 능력을 T 세포에 제공하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

A61K 39/0011 (2021.08)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
A61K 2039/5158 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2740/16043 (2013.01)

(72) 발명자

헤리자드 파자드

미국, 플로리다 33401, 웨스트 팜 비치, 스위트
 625, 625 엔. 플래글러 드라이브

비간트 프레데릭

미국, 플로리다 33401, 웨스트 팜 비치, 스위트
 625, 625 엔. 플래글러 드라이브

쿤두 아니르반

미국, 플로리다 33401, 웨스트 팜 비치, 스위트
 625, 625 엔. 플래글러 드라이브

(30) 우선권주장

62/894,852 2019년09월01일 미국(US)
 62/894,853 2019년09월01일 미국(US)
 62/894,926 2019년09월02일 미국(US)
 PCT/US2019/049259 2019년09월02일 미국(US)
 62/943,207 2019년12월03일 미국(US)
 62/985,741 2020년03월05일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

세포 제형을 대상체에게 투여하기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자(replication incompetent recombinant retroviral particle)의 용도로서, 상기 키트의 사용은,

a) T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소를 포함하는 반응 혼합물에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계로서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는,

i) 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드로서, 상기 결합 폴리펩타이드는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 상기 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스 입자 막과 T 세포 및/또는 NK 세포막의 융합을 매개할 수 있는, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드; 및

ii) 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 상기 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는, 상기 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드

를 포함하고, 상기 접촉은 상기 T 세포 및/또는 NK 세포와 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하며, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 변경시키는, 상기 접촉시키는 단계; 및

b) 상기 세포 제형을 상기 대상체에게 피하로 투여하는 단계로서, 상기 세포 제형은 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하고,

i) 상기 반응 혼합물은 부피를 기준으로 적어도 25%의 미분획 전혈을 포함하고,

ii) 상기 반응 혼합물은 호중구를 포함하며, 그리고/또는

iii) 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 호중구와 함께 전달 용액으로 피하로 투여되는, 상기 투여하는 단계

를 포함하는, 용도.

청구항 2

변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형으로서, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는, 전달 용액에 현탁되고, 그리고

a) 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되거나(여기서, 상기 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결됨), 또는

b) 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나, 또는

이들 둘 다이되,

상기 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고, 상기 세포 제형은 2mL 내지 10mL의 부피를 가지며, 호중구를 더 포함하고, 상기 세포 제형은 주사기 안에 포함되는, 세포 제형.

청구항 3

변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 투여하기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도로서,

상기 키트의 사용은 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형을 상기 대상체에게 피하로 투여하는 단계를 포함하되, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 a) 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되거나(여기서, 상기 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결됨), 또는 b) 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나(여기서, 상기 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화함) 또는 이들 둘 다이고, 호중구, B 세포, 단핵구, 호염기구 및 호산구 중 적어도 하나가 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포와 함께 상기 세포 제형으로 피하로 투여되는, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형을 상기 대상체에게 피하로 투여하는 단계를 포함하는, 용도.

청구항 4

세포 제형을 제조하는 방법으로서,

a) T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소를 포함하는 반응 혼합물에서 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계로서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는,

i) 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드, 상기 결합 폴리펩타이드는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 상기 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스 입자 막과 T 세포 및/또는 NK 세포막의 융합을 매개할 수 있는, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드; 및

ii) 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 상기 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는, 상기 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드

를 포함하되, 상기 접촉은 상기 T 세포 및/또는 NK 세포와 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하고, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 변경시키며, 상기 반응 혼합물은 호중구를 포함하는, 상기 접촉시키는 단계;

b) 전달 용액에 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 수집하여 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 현탁액을 포함하는 세포 제형을 형성하는 단계; 및

c) 0.5ml 내지 10ml의 상기 세포 제형을 주사기로 옮기는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 5

대상체에게 피하 또는 근육내 전달하기 위한 키트의 제조에서의 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포 집단의 용도로서,

상기 키트의 사용은 0.2ml 내지 10ml의 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형을 상기 대상체에게 피하로 전달하는 단계를 포함하되, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되고, 상기 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, 상기 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드 및 사이토카인 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는, 용도.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 전사 단위는 사이토카인 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 선택적으로 야누스 카이네이스/신호 변환인자 및 전사의 활성인자(Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription: JAK/STAT) 경로 또는 종양 괴사 인자 수용체(tumor necrosis factor receptor: TNF-R)-관련 인자(tumor necrosis associated factor: TRAF) 경로를 활성화하는 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는, 용도, 방법 또는 세포 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 구성적으로 활성이며, 박스1 및 박스2 JAK-결합 모티프 및 타이로신 잔기를 포함하는 STAT-결합 모티프를 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 세포의 리간드 결합 도메인 또는 소분자 결합 도메인을 포함하지 않는, 용도 또는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 호중구는 상기 투여된 세포의 적어도 10%가 호중구가 되도록 상기 세포 제형에 존재하는, 용도.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 하이알루로니다이스의 존재 하에 피하로 투여되는, 용도.

청구항 11

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 상기 세포 제형의 1ml 내지 5ml의 부피로 피하로 투여되는, 용도.

청구항 12

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 상기 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 말초 혈액-유래 생성물이 대상체로부터 채취되는 시간으로부터 14시간 이내에 상기 대상체에 다시 도입되는, 용도.

청구항 13

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 항응고제를 포함하고, 상기 T 세포 및/또는 NK 세포는 접촉될 때 상기 대상체로부터의 미분획 전혈에 존재하는, 용도 또는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제3항에 있어서, 1×10^6 개 내지 1×10^9 개의 변형된 T 세포 및/또는 변형된 NK 세포가 상기 대상체에 게 피하로 전달되는, 용도 또는 방법.

청구항 15

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 부피 기준으로 적어도 50%의 미분획 전혈을 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 16

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 폐쇄형 세포 처리 시스템에 있고, 상기 접촉은 상기 반응 혼합물이 상기 폐쇄형 세포 처리 시스템의 백혈구감소 필터 어셈블리에 있을 때 일어나며, 상기 반응 혼합물 내 혈액 세포는 총 유핵 세포(백혈구감소 필터 어셈블리: TNC)인, 용도 또는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소는 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상에 있고, 상기 접촉은 2°C 내지 15°C, 선택적으로 2°C 내지 6°C에서 1시간 미만 동안, 그리고 선택적으로 상기 TNC가 32°C 및 42°C에서 5분 내지 4시간 동안 인큐베이션된 후, 그리고 선택적으로 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 필터 상에서 수집되어 세포 제형을 형성한 후에 수행되는, 용도 또는 방법.

청구항 18

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 부피 기준으로 적어도 25%의 미분획 전혈 및 유효량의 항응고제를 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항응고제는 산 시트레이트 텍스트로스, EDTA 및 헤파린으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도 또는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 항응고제는 산 시트레이트 텍스트로스가 아닌, 용도 또는 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 항응고제는 유효량의 헤파린을 포함하는, 용도 또는 방법.

청구항 22

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 변형된 세포는 변형된 T 세포이고, 상기 활성화 요소는 T 세포 활성화 요소이며, 상기 T 세포 활성화 요소는 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 또는 유사분열촉진 유발성 테트라스패닌에 결합하는 폴리펩타이드 중 하나 이상인, 용도 또는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 T 세포 활성화 요소는 항-CD3 항체이고, 상기 항-CD3 항체는 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 막에 결합하는, 용도 또는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 막-결합 항-CD3 항체는 항-CD3 scFv 또는 항-CD3 scFvFc인, 용도 또는 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 항-CD3 항체는 GPI 앵커에 의해 막에 결합하고, 상기 항-CD3 항체는 퓨린 절단 부위에 돌연변이가 있거나 없는 MuLV 바이러스 외피 단백질과의 재조합 융합 단백질이거나 또는 상기 항-CD3 항체는 VSV 바이러스 외피 단백질과의 재조합 융합 단백질인, 용도 또는 방법.

청구항 26

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 2.5 내지 5의 MOI로 반응 혼합물에 존재하는, 용도 또는 방법.

청구항 27

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 세포 또는 세포들은 상기 방법 동안 원심집중을 거치지 않는, 용도 또는 방법.

청구항 28

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 상기 접촉 동안 혈액 배에 있는, 용도 또는 방법.

청구항 29

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 혈액 세포는 상기 접촉 전, 상기 혈액 세포가 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉하고 있을 때, 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 동안 및/또는 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 후 폐쇄형 세포 처리 시스템의 백혈구감소 필터 어셈블리와 접촉하고 있는, 용도 또는 방법.

청구항 30

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 반응 혼합물은 상기 접촉 후 폐쇄형 세포 처리 시스템의 백혈구감소 필터 어셈블리와 접촉하고 있는, 용도 또는 방법.

청구항 31

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 미분획 전혈은 제대혈이 아닌, 용도 또는 방법.

청구항 32

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 접촉은 상기 반응 혼합물에 현탁액으로 남아 있는 레트로바이러스 입자가 세포로부터 분리되기 전 12시간 미만 동안 수행되는, 용도 또는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR은 MRB-CAR인, 용도, 방법 또는 세포 제형.

청구항 34

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 제1 전사 단위에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 구성적으로 활성이고, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제2 전사 단위를 더 포함하며, 상기 제1 전사 단위 및 제2 전사 단위는 반대 방향으로 배열되고, 그리고

상기 제2 전사 단위는 림프증식성 요소를 암호화하는, 용도 또는 방법.

청구항 35

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이고, 상기 변형된 세포는 변형된 T 세포인, 용도 또는 방법.

청구항 36

제2항에 있어서, 상기 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 상기 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되고, 상기 폴리뉴클레오타이드는 비-바이러스 벡터인, 세포 제형.

청구항 37

제2항에 있어서,

- a) 상기 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25% 또는 선택적으로 적어도 50%는 상기 CAR 또는 전위효소 중 하나 이상을 발현하지 않고;
- b) 상기 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25% 또는 선택적으로 적어도 50%가 재조합 바이러스 역전사효소 또는 재조합 바이러스 인테그레이스를 포함하고;
- c) 상기 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25% 또는 선택적으로 적어도 50%가 계놈에 안정적으로 통합된 폴리뉴클레오타이드를 갖지 않고;
- d) 상기 세포 제형 내 T 세포 및/또는 NK 세포의 1% 내지 20% 또는 선택적으로 5% 내지 15%가 유전적으로 변형되고; 그리고/또는
- e) 상기 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 변형된 NK 세포의 적어도 25% 또는 선택적으로 적어도 50%가 생존 가능한, 세포 제형.

청구항 38

제2항에 있어서, 상기 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 5%가 유전적으로 변형된, 세포 제형.

청구항 39

NK 세포 및/또는 T 세포를 변형시키기 위한 키트로서,

T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성화인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제1 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 또는 복수의 용기(여기서, 상기 제1 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화함); 및 다음으로부터 선택되는 하나 이상의 부속 성분:

- a) 피하 또는 근육내 투여에 적합화된 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기;
- b) T 세포 및/또는 NK 세포의 피하 또는 근육내 전달에 적합화된 하나 이상의 멸균 주사기; 및
- c) 하나 또는 복수의 백혈구제거 여과 어셈블리

를 포함하는, 키트.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 용기 내의 폴리뉴클레오타이드는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 내에 위치하는, 키트.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성화인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 하나 이상의 전사 단위는 제1 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는, 키트.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드를 포함하되, 상기 결합 폴리펩타이드는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 상기 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스 입자 막과 T 세포 및/또는 NK 세포막의 융합을 매개할 수 있는, 키트.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면은 활성화 요소를 더 포함하고, 상기 활성화 요소는 활성화 T 세포 및/또는 NK 세포를 활성화할 수 있는, 키트.

청구항 44

제41항에 있어서, 상기 복제 불능 레트로바이러스 입자를 포함하는 하나 이상의 용기는 실질적으로-순수한 GMP 등급의 복제 불능 레트로바이러스 입자를 포함하는, 키트.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 복제 불능 레트로바이러스 입자를 포함하는 각 용기는 0.1ml 내지 10ml의 부피 및 1×10^6 내지 5×10^9 개의 레트로바이러스 입자 형질도입 단위를 포함하는, 키트.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 키트는 피하 투여에 적합화된 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함하는, 키트.

청구항 47

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 키트는 하나 또는 복수의 백혈구제거 여과 어셈블리를 포함하는, 키트.

청구항 48

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 키트는 T 세포 및/또는 NK 세포의 피하 전달에 적합화된 하나 이상의 멸균 주사기를 포함하는, 키트.

청구항 49

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 키트는

- a) 피하 투여에 적합화된 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기; 및
- b) T 세포 및/또는 NK 세포의 피하 전달에 적합화된 하나 이상의 멸균 주사기를 포함하는, 키트.

청구항 50

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 제1 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 JAK/ STAT 경로 TRAF 경로 활성화하는 사이토카인 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 전사 단위를 더 포함하는, 키트.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 구성적으로 활성화되며, 박스 1 및 박스 2 JAK-결합 모티프 및 타이로신 잔기를 포함하는 STAT-결합 모티프를 포함하는, 키트.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 사이토카인을 포함하지 않는, 키트.

청구항 53

단리된 폴리뉴클레오타이드로서, T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제2 전사 단위를 포함하되, 상기 제1 전사 단위 및 상기 제2 전사 단위는 서로 다르게 배열되고,

상기 제1 전사 단위는 림프증식성 요소를 암호화하고, 그리고

상기 제2 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하고, 상기 CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막 관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 54

복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자로서, 제53항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 절연체가 상기 발산성 전사 단위 사이에 위치하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 56

용기로서, 제53항의 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 제54항의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 실질적으로-순수한 제형으로 포함하는, 용기.

청구항 57

제56항의 용기 및 다음 부속 성분 중 하나 이상을 포함하는 키트:

- a) 정맥내, 피하 및/또는 근육내 투여에 적합화된, 이와 양립할 수 있고/있거나 이에 효과적인 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기;
- b) 하이알루로니다이스의 하나 이상의 용기;
- c) 하나 이상의 혈액 백;
- d) 하나 이상의 멸균 주사기;
- e) 하나 또는 복수의 백혈구제거 여과 어셈블리;

- f) T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입에 적합화된 용액 또는 배지를 포함하는 하나 이상의 용기;
- g) T 세포 및/또는 NK 세포를 행구는데 적합화된 용액 또는 배지를 포함하는 하나 이상의 용기;
- h) 제1 CAR과 동일한 표적 암세포에서 발견되는 상이한 항원 상의 상이한 표적 에피토프에 대해 지시된 제2 CAR을 암호화하는 실질적으로-순수한 핵산을 포함하는 하나 이상의 용기;
- i) 제1 CAR에 대한 동족 항원을 포함하는 하나 이상의 용기; 또는
- j) 이의 사용을 위한, 변형 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위해 다른 키트 성분과 물리적으로 또는 디지털 방식으로 결합된 설명서.

청구항 58

유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포로서, T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 제53항의 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 제54항의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 따라 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시킴으로써 제조된, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포.

청구항 59

대상체의 T 세포 또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도로서,

상기 키트의 사용은 상기 T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 제54항의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 접촉은 상기 T 세포 또는 NK 세포와 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시켜 상기 T 세포 또는 NK 세포를 변형시키는, 용도.

청구항 60

T 세포 또는 NK 세포를 변형시키는 방법으로서, 상기 T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 제54항의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 접촉은 상기 T 세포 또는 NK 세포와 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시켜 상기 T 세포 또는 NK 세포를 변형시키는, 방법.

청구항 61

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 EF-1a 프로모터, PGK 프로모터, CMV 프로모터, MSCV-U3 프로모터, SV40hCD43 프로모터, VAV 프로모터, TCR베타 프로모터 또는 UBC 프로모터를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 62

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 유도성 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 NFAT-반응성 프로모터는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개의 NFAT-결합 부위를 포함하고, 상기 NFAT-결합 부위는 NFAT에 결합하는 능력을 보유하는 기능적 서열 변이체를 포함하며, 상기 NFAT-반응성 프로모터는 유도 신호의 부재하에도 전사 수준이 낮은 상류 NFAT-결합 부위를 갖는 최소 구성적 프로모터를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 64

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 림프증식성 요소의 전사는 유도 신호의 부재하에 CAR의 전사 수준의 1/2, 1/4, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/250, 1/500 또는 1/1,000 미만인, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 65

제54항에 있어서, 상기 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 활성화 폴리펩타이드, 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드를 더 포함하되, 상기 활성화 폴리펩타이드는 활성화 T 세포 및/또는 NK 세포를 활성화

화할 수 있고, 상기 결합 폴리펩타이드는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있으며, 상기 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스 입자 막과 T 세포 및/또는 NK 세포막의 융합을 매개할 수 있는, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 66

제53항의 또는 제54항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 야누스 카이네이스/신호 변환인자 및 전사의 활성인자 (JAK/ STAT) 경로 또는 종양 괴사 인자 수용체 (TNF-R)-관련 인자 (TRAF) 경로를 활성화하는 사이토카인 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 구성적으로 활성이며, 박스 1 및 박스 2 JAK-결합 모티프 및 타이로신 잔기를 포함하는 STAT-결합 모티프를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 림프증식성 요소는 사이토카인을 포함하지 않는, 폴리뉴클레오타이드 또는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 9월 2일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2019/049259의 일부 계속이며; 2019년 9월 1일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/894,849호; 2019년 9월 1일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/894,852호; 2019년 9월 1일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/894,853호; 2019년 9월 2일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/894,926호; 2019년 12월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/943,207호; 2020년 3월 5일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/985,741호의 우선권을 주장하고; 국제 출원 PCT/US2019/049259는 2018년 9월 17일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2018/051392의 일부 계속이며; 2018년 9월 2일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/726,293호; 2018년 9월 2일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/726,294호; 2018년 9월 6일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/728,056호; 2018년 9월 17일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/732,528호; 2019년 3월 20일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/821,434호; 및 2019년 9월 1일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/894,853호의 우선권을 주장하고; 그리고 국제 출원 PCT/US2018/051392는 2018년 3월 3일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2018/020818의 일부 계속이며; 2017년 9월 18일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/560,176호; 2017년 9월 27일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/564,253호; 2017년 9월 28일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/564,991호; 및 2018년 9월 6일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/728,056호의 우선권을 주장하고; 국제 출원 PCT/US2018/020818은 2017년 3월 19일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2017/023112의 일부 계속; 2017년 7월 8일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2017/041277의 일부 계속; 2017년 3월 19일자로 출원된 미국 출원 제15/462,855호의 일부 계속; 및 2017년 7월 8일자로 출원된 미국 출원 제15/644,778호의 일부 계속이며; 2017년 3월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/467,039호; 2017년 9월 18일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/560,176호; 2017년 9월 27일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/564,253호; 및 2017년 9월 28일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/564,991호의 우선권을 주장하고; 국제 출원 PCT/US2017/023112는 2016년 3월 19일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/390,093호; 2016년 7월 8일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/360,041호; 및 2017년 3월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/467,039호의 우선권을 주장하고; 국제 출원 PCT/US2017/041277은 2017년 3월 19일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2017/023112; 2017년 3월 19일자로 출원된 미국 출원 제15/462,855호; 2016년 7월 8일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/360,041호; 및 2017년 3월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/467,039호의 우선권을 주장하고; 미국 출원 제15/462,855호는 2016년 3월 19일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/390,093호; 2016년 7월 8일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/360,041호; 및 2017년 3월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/467,039호의 우선권을 주장하고; 그리고 미국 출원 제15/644,778은 2017년 3월 19일자로 출원된 국제 출원 PCT/US2017/023112의 일부 계속; 및 2017년 3월 19일자로 출원된 미국 출원 제15/462,855호의 일부 계속이며; 2016년 7월 8일자로 출원된 미국 특허 가출원 제

62/360,041호 및 2017년 3월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/467,039호의 우선권을 주장한다. 이들 출원은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 본 출원과 동시에 제출된 전자 서열 목록의 자료를 참조에 의해 원용한다. 전자 서열 목록의 자료는 2020년 8월 31일에 생성된 "F1_003_W0_01_서열_Listing"이라는 제목의 텍스트(txt) 파일로 제출되고, 파일 크기는 444KB이며 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본 개시내용은 면역학 분야, 또는 보다 구체적으로 T 림프구 또는 다른 면역 세포의 유전적 변형 및 이러한 세포의 증식을 제어하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 대상체(예를 들어, 환자)로부터 단리된 림프구는 시험관내에서 활성화되고, 통합된 유전자 프로그램을 기반으로 다른 세포 및 환경과의 재지정된 교전(재지시된 관여)을 가능하게 하는 합성 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 이러한 합성 단백질의 예는 조작된 T 세포 수용체(T cell receptor: TCR) 및 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR)를 포함한다. 현재 사용되는 하나의 CAR은 세포의 인식 도메인(예를 들어, 항원-결합 도메인), 막관통 도메인 및 복제 불능 재조합 레트로바이러스에 의해 암호화된 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인의 융합이다.

[0008] 재조합 레트로바이러스는 비-분열 세포를 감염시키는 효능을 보여주었지만, 휴지기 CD4 및 CD8 림프구는 이러한 벡터에 의한 유전자 형질도입에 대해 불응성(refractory)이다. 이러한 어려움을 극복하기 위해, 이러한 세포는 전형적으로 CAR 유전자 벡터로 유전적 변형이 일어나기 전에 자극 시약을 사용하여 시험관내에서 활성화된다. 자극 및 형질도입 후, 유전적으로 변형된 세포는 시험관내에서 증식되고, 후속적으로 림프구가 제거된(lymphodepleted) 환자에게 재도입된다. 생체내에서 항원 결합 시, CAR의 세포내 신호전달 부분은 면역 세포에서 활성화-관련 반응 및 표적 세포 사멸을 유도하기 위한 세포용해 분자의 방출을 개시할 수 있다.

[0009] 이러한 현재의 방법은 환자에게 재주입하기 전에 신체 외부에서 T 세포를 증식시키는 광범위한 조작 및 제조뿐만 아니라 T 세포 생착을 촉진하기 위해 사이토카인을 유리시키고 경쟁 수용체를 고갈시키는 림프구 제거 화학요법을 필요로 한다. 이러한 CAR 요법은 체내에 일단 도입되면 생체내 전파 속도를 제어할 수 없으며 종양 외부에서도 발현되는 표적에 대해 안전하게 지시될 수 없다. 그 결과, 오늘날 CAR 요법은 전형적으로 1×10^5 내지 1×10^8 개 세포/kg의 용량을 사용하여 12일에서 28일까지 생체외에서 증식된 세포로부터 주입되고, 표적, 예를 들어, 종양 제거 표적 포함 독성(off tumor on target toxicity)이 일반적으로 허용되는 종양 표적으로 지시된다. 이러한 상대적으로 긴 생체외 증식 시간은 대량 생산의 문제 외에도 세포 생존 능력 및 멸균성의 문제뿐만 아니라 샘플 식별 문제를 일으킨다. 따라서, 보다 안전하고, 보다 효과적인 대량 생산 가능한 T 세포 또는 NK 세포 요법에 대한 상당한 요구가 있다. 이러한 방법에 필요한 복잡성과 시간을 추가로 줄이는 것이 매우 바람직할 것이며, 특히 이러한 방법으로, 예를 들어, 주입 센터(infusion center) 내에서 대상체의 혈액이 채취될 수 있는 경우, 그 후 같은 날 대상체에게 재도입된다. 또한, 보다 간단하고 신속한 방법만으로 또는 보다 적은 수의 전문 기구를 필요로 하는 방법으로 현재 고도로 전문화된 의료 센터에서만 정기적으로 수행되는 이러한 세포 요법의 절차를 대중화할 수 있다.

[0010] 림프구의 형질도입, 증식 및 생존을 유도하는 과정에 대한 본 발명자들의 이해는 면역학적 과정을 포함하는 다양한 잠재적인 상업적 용도를 중심으로 하기 때문에, 림프구 연구를 위한 개선된 방법 및 조성물이 필요하다. 예를 들어, 이는 림프구가 유전적으로 변형될 수 있는 방법 및 생존과 증식에 영향을 미치는 인자를 더 잘 특성화하고 이해하는데 사용될 수 있는 방법 및 조성물을 확인하는데 도움이 될 것이다. 또한, 림프구 증식 및 생존을 유도하는 조성물을 확인하는 것이 도움이 될 것이다. 이러한 조성물은 이러한 과정의 조절을 연구하는데 사용될 수 있다. 림프구를 연구하기 위한 방법 및 조성물 외에, 개선된 바이러스 패키징 세포주 및 이를 제조하고 사용하는 방법이 필요하다. 예를 들어, 이러한 세포주 및 방법은 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 바이러스의 상이한 성분을 분석하고, 재조합 레트로바이러스 입자의 생산을 위해 패키징 세포주를 사용하는 방법에 유용할 것이다.

[0011] 추가적으로, 혈액, 장기 및 조직, 및 우선적으로 그리고 구체적으로 종양 미세환경에서 림프구의 증식 및/또는 생존을 유도하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 대한 요구가 여전히 존재한다. 이전의 방법은 표적 항원에 결합

시, CAR-자극 유도성 프로모터의 제어하에 분비된 사이토카인의 발현을 유도하는 CAR을 구성적으로 발현하는 세포를 사용하였다. 이러한 분비된 사이토카인은 T 세포 및 NK 세포에 비특이적으로 결합하여 이를 자극함으로써 CAR T 세포 또는 NK 세포를 자극하는데 사용할 수 있는 사이토카인의 양을 감소시킨다. 사이토카인은 또한 CAR T 세포 또는 NK 세포를 자극하는데 사용할 수 있는 사이토카인을 추가로 감소시켜 확산될 수 있다. 이러한 선행 방법은 일반적으로 별도의 벡터에서 전사 단위의 다중 형질도입을 필요로 하며 긴 혈액 세포-처리 시간을 필요로 하므로, 암 환자는 혈액을 채취한 후 유전적으로 조작된 혈액 세포를 투여받기 위해 며칠, 몇 주, 심지어 몇 달을 기다려야 했다. 하나 이상의 전사 단위를 암호화하는 벡터를 사용하는 한 단계에서 CAR-T 세포 형질도입을 수행한 선행 방법은 낮은 바이러스 역가를 생성하고/하거나 하나 이상의 전사 단위의 낮은 발현을 초래하였으며, 이들 각각은 일반적인 치료 방법으로서 상업화하는 데에 대한 주요한 걸림돌이다. 따라서, 혈액, 장기 및 조직, 및 우선적으로 그리고 구체적으로 저해성 종양 미세환경에서 생존 및 증식하는 CAR-T 세포를 생성하기 위한 보다 효과적인 방법이 필요하다.

[0012] 일부 그룹은 바이러스 입자 또는 DNA 나노캐리어를 정맥내로 주입하여 생체내 세포를 형질도입 또는 형질감염시켜 생체의 세포 증식을 제거함으로써 세포 요법을 위한 생체의 처리를 단순화하고자 시도하였다(문헌[Agarwal et al. (2019) OncoImmunology. 8(12):e1671761-1- e1671761-7; Smith et al. (2017) Nature Nanotech. 12(8):813-820]). 그러나, 이러한 방법은 다량의 벡터를 필요로 하며, 방법은 생체내에 존재하는 응고 인자 및/또는 기타 효소에 의해 입자가 불활성화될 위험이 있다. 마지막으로, 이러한 방법은 비-표적 세포/기관의 높은 수준의 형질도입의 위험이 있다.

발명의 내용

[0013] 예시적인 실시형태 T 세포 및/또는 NK 세포에서 림프구를 유전적으로 변형시키는 과정을 단순화하고 가속화하는 방법, 용도, 조성물 및 키트가 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 제공되는 일부 양태 및 실시형태는 현장 진료(point-of-care) 세포 처리에 매우 적합하며 세포를 특수 처리 시설로 수송할 필요가 없다. 또한, 본 명세서에 제공된 방법, 용도, 조성물 및 키트는 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구를 형질도입 및/또는 변형시키고, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키는 방법의 효과 및 안전성과 관련된 문제점을 극복하는데 도움이 된다. 이러한 방법의 소정의 실시형태는 이러한 세포로 입양 세포 요법을 수행하는데 유용하다. 따라서, 일부 양태에서, 림프구, 특히 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키고/시키거나, 형질도입된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 활성을 조절하기 위한 방법, 조성물 및 키트가 본 명세서에 제공된다. 이러한 방법, 조성물 및 키트는 특히 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR) 및 예시적인 실시형태에서, 미세환경이 제한된 생물체제(microenvironment restricted biologic: "MRB") CAR을 발현하는 T 세포 및/또는 NK 세포와 관련하여 현재 기술에 비해 개선된 효능 및 안전성을 제공한다. 본 명세서에 제공된 방법에 의해 생성되고/되거나 이에 사용되는 형질도입 및/또는 변형되고, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 입자를 통해 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 게놈으로부터 전달되는 기능 및 기능의 조합을 포함하며, 이는 이러한 세포, 및 연구 방법, 상업적 생산 방법 및 입양 세포 요법과 같은 이러한 세포를 이용하는 방법에 대한 개선된 특징을 제공한다. 예를 들어, 이러한 세포는 생체외에서 더 짧은 시간에 생산될 수 있고, 더 잘 조절될 수 있는 개선된 성장 특성을 갖는다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 방법, 용도, 조성물 및 키트는 근육내 또는 추가의 예시적인 실시형태에서, 대상체에 대한 피하 전달을 포함하거나 또는 이에 적합화된다.

[0014] 일부 양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구를 형질도입 및/또는 변형시키고, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키기 위한 방법 및 예시적인 실시형태에서, 휴지기 T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 생체외 방법이 제공된다. 이러한 양태 중 일부는 이전 방법보다 훨씬 더 빠르게 수행될 수 있으며, 이는 보다 효율적인 연구, 보다 효과적인 상업적 생산 및 환자 치료의 개선된 방법을 가능하게 할 수 있다. 본 명세서에 제공된 방법, 용도, 조성물 및 키트는 상업적 생산, 형질도입 및/또는 변형된 입양 세포 요법 및 예시적인 실시형태에서, TCR 또는 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포에서 연구 도구로서 사용될 수 있다.

[0015] T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구의 형질도입과 관련된 본 명세서에 제공된 방법, 용도 및 조성물과 관련하여, 농축된 PBMC, TNC의 형질도입 반응 또는 생체의 세포 처리, 예를 들어, CAR-T 요법을 수행하기 위한 단순화되고 빠른 방법인, 예컨대, 전혈에서의 사전 세포 농축이 없는 형질도입 반응을 포함하는 방법 및 관련 용도 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 이러한 방법은 덜 전문화된 계측 및 훈련을 필요로 한다. 또한, 이러한 방법은 생체내 형질도입 방법에 비해 비-표적화된 세포 형질도입의 위험을 줄인다. 또한, 시험관내, 생체외 및 생

체내 림프구, 특히 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식을 유도하기 위한 강력한 방법, 용도 및 조성물을 제공하기 위해 본 명세서에 제공된 임의의 다른 양태와 선택적으로 조합될 수 있는 소정의 표적 저해성 RNA, 활성화 요소, 폴리펩타이드 림프증식성 요소, 슈도타이핑(pseudotyping) 요소 및 인공 항원 제시 세포를 포함하는 바로 위의 방법의 실시형태를 포함하는 방법, 용도 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구는 림프구가 풍부한 환경에서 생장할 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자 또는 대상체는 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 및 또는 NK 세포를 재주입하기 전 림프구가 제거되지 않는다.

[0016] 일부 양태 및 실시형태에서, 보다 제어 가능한 방식으로 생존하고 증식하는 능력을 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포에 제공하는데 특히 매우 적합한 유전자 작제물이 본 명세서에 제공된다. 림프증식성 요소에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터 또는 분비된 사이토카인에 작동 가능하게 연결된 유도성 프로모터와 대조적으로, 이러한 양태 및 실시형태는 표적에 대한 CAR-결합에 의해 유도될 때, 예를 들어, 종양 미세환경에 존재하는 것들과 같은 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식을 유도할 수 있는 막-결합 림프증식성 요소에 작동 가능하게 연결된 유도성 프로모터를 제공한다.

[0017] 본 개시내용의 양태 및 실시형태에 관한 추가 세부사항이 이 특허 출원 전반에 걸쳐 제공된다. 부분들 및 부분 헤더는 읽기 쉽도록 하기 위한 것이며, 부분에 걸쳐 있는 방법, 조성물 및 키트 또는 기능적 요소와 같은 개시내용의 조합을 제한하기 위한 것이 아니다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a 내지 도 1d는 비제한적인 예시적인 세포 처리 작업 흐름의 흐름도이다. 도 1a는 PBMC에서 T 세포 및 NK 세포를 레트로바이러스 입자와 접촉시키기 전 PBMC 분리 시스템을 사용하는 과정의 흐름도이다. 원치 않는 세포를 고갈시키는 선택적 단계는 PBMC 분리 전에 시작될 수 있다. 도 1b는 총 유헥 세포에서 T 세포 및 NK 세포를 레트로바이러스 입자와 접촉시키기 전에 총 유헥 세포(total nucleated cell: TNC) 분리를 수행하는 과정의 흐름도이다. 본 명세서에서 논의되는 바와 같이, 예시적인 실시형태에서, TNC 분리는 백혈구감소 필터 어셈블리(leukoreduction filter assembly)를 사용하여 수행된다. 원치 않는 세포를 고갈시키기 위한 선택적 단계는 TNC 분리 후 및 선택적 PBMC 분리 전에 시작될 수 있다. 도 1c는 전혈에서 T 세포 및 NK 세포가 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 혈구 분별(blood cell fractionation) 또는 농축이 수행되지 않고, PBMC 분리가 접촉 및 선택적 인큐베이션 후에 수행되는 과정의 흐름도이다. 원치 않는 세포를 고갈시키기 위한 선택적 단계는 PBMC 분리 전에 시작될 수 있다. 도 1d는 전혈에서 T 세포 및 NK 세포가 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 혈구 분별 또는 농축이 수행되지 않고, 접촉 및 선택적 인큐베이션 후 예시적인 실시형태에서, 여과를 사용하여, 예를 들어, 백혈구감소 필터 어셈블리를 사용하여 TNC 분리/농축이 수행되는 과정의 흐름도이다. 원치 않는 세포를 고갈시키기 위한 선택적 단계에 이어 여과 과정이 TNC 분리/농축 단계 전에 수행될 수 있다. 도 1E는 총 유헥 세포에서 T 세포 및 NK 세포를 레트로바이러스 입자와 "냉간 접촉(Cold Contacting)"시키기 전에 TNC 분리를 수행하는 과정의 흐름도이다. 원치 않는 세포를 고갈시키기 위한 선택적 단계는 TNC 분리 전에 시작될 수 있다. 또 다른 선택적 단계는 림프구 응집체를 포획하고/하거나 원치 않는 세포를 제거하기 위해 거친 여과와 선택적으로 조합되는 2차 인큐베이션이다. 도 1F는 총 유헥 세포에서 T 세포 및 NK 세포를 레트로바이러스 입자와 "냉간 접촉"시키기 전에 TNC 분리를 수행하는 과정의 흐름도이다. 원치 않는 세포를 고갈시키기 위한 선택적 단계는 TNC 분리 전에 시작될 수 있다. 또 다른 선택적 단계는 2차 인큐베이션이다. 임의의 1회 이상의 세척 단계는 선택적이다. 이러한 각각의 세포 처리 작업 흐름은 rPOC 세포 요법에 사용될 수 있다.

도 2는 관련된 혈액 처리 백, 튜브, 밸브 및 백혈구감소 필터 세트를 포함하는 필터 인클로저(210)를 갖는 비제한적인 예시적인 백혈구감소 필터 어셈블리(200)의 다이어그램이다.

도 3a 및 도 3b는 상이한 슈도타이핑 요소를 사용한 실험적 결과의 히스토그램을 보여준다. 도 3a는 형질도입 후 제6일에 웰당 살아있는 세포의 총 수의 히스토그램을 보여준다. 도 3b는 eTAG 발현에 의해 측정된 바와 같이 형질도입된 CD3+ 세포의 백분율의 히스토그램을 보여준다.

도 4a 및 도 4b는 반응 혼합물이 형성되기 전에 PBMC 농축 없이 전혈, 렌티바이러스 입자 및 항응고제 EDTA 또는 헤파린을 포함하는 형질도입 반응 혼합물을 사용한 실험적 결과의 히스토그램을 보여준다. 과정은 4시간 동안 전혈을 표시된 렌티바이러스 입자 F1-3-23G 또는 F1-3-23GU와 접촉시킨 다음 밀도 구배 원심분리-기반 PBMC 농축 절차 함으로써 수행되었다. 도 4a는 살아있는 림프구 집단의 μ 당 절대 세포 수의 히스토그램을 보여준다. 도 4b는 형질도입 후 제6일에 살아있는 림프구 집단에서 CD3+eTag+ 세포의 백분율(%)의 히스토그램을 보여준다.

도 5는 F1-3-23GU로 4시간 동안 전혈의 형질도입하고 이어서 예시적인 백혈구감소 필터 어셈블리를 사용하여

TNC 여과에 의해 총 유핵 세포를 단리한 후 제7일에 살아있는 림프구 집단에서 CD3 및 eTag의 발현의 등고선 FACS 플롯을 보여준다.

도 6은 정맥내 CAR-T 투여 후 제7일, 제14일 및 제21일에 개별 마우스에서 말초 혈액의 60 μ l당 CD3+eTAG+ CAR-T 세포의 수를 보여준다. 투여된 세포는 형질도입되지 않았거나 또는 표시된 MOI의 F1-3-247GU로 형질도입되었다.

도 7은 피하 CAR-T 투여 후 제8일, 제14일 및 제21일에 개별 마우스에서 말초 혈액의 60 μ l당 CD3+eTAG+ CAR-T 세포의 수를 보여준다. 투여된 세포는 형질도입되지 않았거나 또는 표시된 MOI의 F1-3-247GU로 형질도입되었다.

도 8은 형질도입되지 않았거나(UNT) 또는 표시된 MOI의 F1-3-247GU에 대한 4시간 노출에 의해 형질도입된 (TRNSD) PBMC가 제0일에 정맥내로 투여된 B-NDG 마우스에서 라지(Raji) 종양의 평균 종양 부피의 그래프를 보여준다. 각 그룹의 마우스에는 표시된 바와 같이 100만개 또는 500만개의 PBMC가 투여되었다.

도 9는 형질도입되지 않았거나(UNT) 또는 표시된 MOI의 F1-3-247GU에 대한 4시간 노출에 의해 형질도입된 (TRNSD) PBMC가 제0일에 피하로 투여된 B-NDG 마우스에서 라지 종양의 평균 종양 부피의 그래프를 보여준다. 각 그룹의 마우스에는 표시된 바와 같이 100만개 또는 500만개의 PBMC가 투여되었다.

도 10은 실시예에서 사용된 소정의 게놈 플라스미드의 개략도를 보여준다.

도 11a는 정방향(F1-0-03) 또는 역방향(F1-0-03RS) 배향에서 EF1-a, PGK, SV40hCD43 또는 MSCVU3 프로모터의 조절하에 또는 역방향(F1-0-03RS- Δ EF1a) 배향에서 프로모터 없이 발산성 전사 단위(divergent transcriptional unit)를 갖는 재조합 렌티바이러스 바이러스 입자의 역가의 그래프를 보여준다.

도 11b는 FACS에 의해 결정된 바와 같이 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity: MFI)로 표시되는 일시적으로 형질감염된 Lenti-X™ 293T에서의 GFP 발현 수준의 그래프를 보여준다. GFP 발현은 정방향(F1-0-03) 또는 역방향(F1-0-03RS) 배향에서 EF1-a, PGK, SV40hCD43 또는 MSCVU3 프로모터의 제어하에 있다.

도 12a는 발산성 전사 단위를 갖는 예시적인 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터의 개략도를 보여준다. eTag된(eTagged) 림프증식성 요소(eTag:LE)에 이어 NFAT-반응성 최소 IL-2 프로모터(6x NFAT)의 전사 제어하에 폴리아데닐화된 서열(폴리아)을 포함하는 첫 번째 전사 단위는 역배향으로 암호화된다. 선택적으로, 절연체 요소(Ins)는 첫 번째 및 두 번째 전사 단위를 분리한다. 두 번째 전사 단위는 구성적 프로모터(Promoter)의 전사 제어하에 CAR(CAR)을 암호화하고, 정배향으로 암호화된다. 점선으로 표시된 삼각형은 하나 이상의 miRNA가 벡터에 선택적으로 삽입될 수 있는 임의의 하나 이상의 위치에서의 3개의 가능한 위치를 나타낸다. 점선으로 표시된 삼각형은 하나 이상의 miRNA가 선택적으로 벡터에 삽입될 수 있는 EF1-a와 같은 프로모터 내의 엑손에서의 1개의 가능한 위치를 나타낸다. "SA" 및 "SD"는 스플라이스 공여 부위 및 스플라이스 수여 부위에 해당한다.

도 12b는 실시예 7에서 테스트된 각 렌티바이러스 게놈 벡터의 정제, 특징 및 전체 크기를 보여준다.

도 13은 eTag를 발현하는 CD19 CAR+ 저캣(Jurkat) 세포의 백분율의 그래프를 보여준다. 저캣 세포는 표시된 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 작제물로 형질도입되었으며, eTag 발현은 20nM PMA 및 1 μ g/ml의 아이오노마이신으로 샘플을 자극(또는 비-자극된 상태로 유지)한지 24시간 후에 유세포 분석에 의해 측정되었다.

도 14는 CD19 CAR+ 저캣 세포의 표면에서 eTag 발현의 평균 형광 강도(MFI)의 그래프를 보여준다. 저캣 세포는 표시된 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 작제물로 형질도입되었으며, eTag 발현은 20nM PMA 및 1 μ g/ml 아이오노마이신으로 샘플을 자극(또는 비-자극된 상태로 유지)한지 24시간 후에 유세포 분석에 의해 측정되었다.

도 15는 CD19 CAR을 발현하는 저캣 세포의 백분율의 그래프를 보여준다. 저캣 세포는 표시된 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 작제물로 형질도입되었으며, CAR 발현은 20nM PMA 및 1 μ g/ml 아이오노마이신으로 샘플을 자극(또는 비-자극된 상태로 유지)한지 24시간 후 유세포 분석에 의해 측정되었다.

도 16은 저캣 세포의 표면에서 CD19 CAR 발현의 평균 형광 강도(MFI)의 그래프를 보여준다. 저캣 세포는 표시된 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 작제물로 형질도입되었으며, CAR 발현은 20nM PMA 및 1 μ g/ml 아이오노마이신으로 샘플을 자극(또는 비-자극된 상태로 유지)한지 24시간 후 유세포 분석에 의해 측정되었다.

도 17은 eTag를 발현하는 CD3+CAR+ PMBC이 백분율의 그래프를 보여준다. PMBC는 표시된 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 작제물로 형질도입되었으며, 제7일에 시작하여 격일로 CD19-발현 라지 세포를 공급하거나 또는 외인성 사이토카인의 부재하에 영양 공급이 중단된 상태로 두었다. CD3+CAR+ 세포는 표시된 바와 같이 매일 eTag의 발현에 대해 유세포 분석에 의해 측정되었다.

도 18a 내지 도 18d는 CD3+CAR+ PMBC의 배수 증식의 그래프를 보여준다. PBMC는 렌티바이러스 게놈 작제물 F1-3-635(도 18a), F1-3-637(도 18b), F1-3-23(도 18c) 또는 F1-3-247(도 18d)로 형질도입되었으며, 제7일에 시작하여 격일로 CD19-발현 라지 세포를 공급하거나 또는 외인성 사이토카인의 부재하에 영양 공급이 중단된 상태로 두었다. CD3+CAR+ 세포는 유세포 분석에 의해 검출되었다.

도 19는 CD3+CAR+ PMBC의 배수 증식의 그래프를 보여준다. PBMC는 렌티바이러스 게놈 작제물 F1-3-635, F1-3-637, F1-3-23 또는 F1-3-635로 형질도입되었으며, 7일 후 사이토카인의 부재하에 영양 공급이 중단된 상태에서 배양되었다.

도 20은 CD3+CAR+ PMBC의 생존 능력의 백분율의 그래프를 보여준다. PBMC는 렌티바이러스 게놈 작제물 F1-3-635, F1-3-637, F1-3-23 또는 F1-3-635로 형질도입되었으며, 7일 후 사이토카인의 부재하에 영양 공급이 중단된 상태에서 배양되었다.

도 21은 형질도입되지 않았거나(G1) 또는 4시간 동안 F1-3-637GU(G2) 또는 F1-4-713GU(G3) 렌티바이러스 입자에 전혈을 노출시킨 후 PBMC 농축 절차에 의해 형질도입된 PBMC가 제0일에 피하로 투여된 NSG-(KbDb)널(null)(IA)널 마우스에서 라지-루시퍼레이스 과중성 종양 부담(disseminated tumor burden)의 총 플럭스 [p/s]의 그래프를 보여준다. G4의 마우스는 G2 및 G3의 절반 용량의 PBMC로 처리되었다. F1-3-637GU 및 F1-4-713GU의 게놈 벡터는 자가-구동(self-driving) CAR을 각각 CD19 및 CD22로 암호화한다.

도 22는 도 21의 마우스의 8주 동안의 생존 확률의 그래프를 보여준다.

도 23은 rhIL-2가 보충된 CTS 배지에서 배양 6일 후 F1-3-637GU로 형질도입된 TNC의 총 세포 회수 및 세포 표면 마커 발현을 보여준다. rPOC 세포 과정의 접촉 단계는 도 1d(전혈) 또는 도 1b(필터에) 나타낸 바와 같이 수행되었다.

도 24는 세포를 처리하지 않거나(NA) 또는 16시간 동안 CHO-S, 라지 또는 PMA + 아이오노마이신으로 처리한 후, ELISA에 의해 측정된 바와 같이 도 23의 세포에 의한 IFN 감마 생산(pg/ml)의 그래프를 보여준다.

도 25는 4시간 동안 F1-3-637GU 렌티바이러스 입자에 전혈을 노출시킨 후 도 1d에 나타낸 바와 같은 TNC 농축 절차(G4) 또는 도 1c에 나타낸 바와 같은 PBMC 농축 절차(G5)에 의해 형질도입된 PBS(G1), TNC(G2), PBMC(G3) 또는 세포가 제0일에 피하로 투여된 NSG 마우스에서 라지-루시퍼레이스 과중성 종양 부담의 총 플럭스 [p/s]의 그래프를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 명세서에서 사용되는 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "CAR들"은, 예를 들어, T 세포, NK 세포, 대식세포 및 줄기 세포 상에 항원 특이성을 이식하는 조작된 수용체를 지칭한다. 본 발명의 CAR은 적어도 하나의 항원-특이적 표적화 영역(antigen-specific targeting region: ASTR), 막관통 도메인(transmembrane domain: TM) 및 세포내 활성화 도메인(intracellular activating domain: IAD)을 포함하며, 줄기(stalk) 및 하나 이상의 공동-자극 도메인(co-stimulatory domain: CSD)을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, CAR은 2개의 상이한 항원 또는 에피토프에 특이적인 이중특이성 CAR이다. ASTR이 표적 항원에 특이적으로 결합한 후, IAD는 세포내 신호전달을 활성화한다. 예를 들어, IAD는 항체의 항원-결합 특성을 이용하여 비-MHC-제한된 방식으로 선택된 표적에 대한 T 세포 특이성 및 반응성을 재지시할 수 있다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 CAR을 발현하는 T 세포에 항원 처리와 무관한 항원을 인식하는 능력을 제공하며, 따라서 종양 탈출의 주요한 메커니즘을 우회한다. 더욱이, T 세포에서 발현될 때, CAR은 유리하게는 내인성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 사슬과 이량체화되지 않는다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터"는 유전자 산물을 암호화하거나 또는 특정하는 폴리뉴클레오타이드와 작동 가능하게 연결될 때, 유전자 산물이 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에 세포에서 생성되도록 하는 프로모터를 지칭한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "유도성 프로모터" 또는 "활성화 가능한 프로모터"는 유전자 산물을 암호화하거나 또는 특정하는 폴리뉴클레오타이드와 작동 가능하게 연결될 때, 유전자 산물이 프로모터-특이적 유도인자가 세포에 존재하는 경우에만 실질적으로 세포에서 생산되도록 하는 프로모터를 지칭한다. 유도성 프로모터는 기초 전사 활성이 없거나 또는 낮은 수준이지만, 유도 신호의 존재하에 전사 활성은 때때로 크게 증가한다.

- [0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 "절연체"는 염색체내 및 염색체간 상호작용을 매개하며 인헨서와 프로모터 간의 상호작용을 차단할 수 있는 시스-제어 요소를 지칭한다. 전형적으로, 절연체는 200개 내지 2000개의 염기쌍 길이이며, 서열 특이적 DNA-결합 단백질에 대한 클러스터링된 결합 부위를 포함한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "미세환경"은 다른 조직의 영역 또는 신체의 영역과 일정하거나 또는 일시적인, 물리적 또는 화학적 차이를 갖는 조직 또는 신체의 임의의 부분 또는 영역을 의미한다. 예를 들어, 본 명세서에서 사용되는 "종양 미세환경"은 종양이 존재하는 환경을 지칭하며, 이는 종양 내의 비-세포 영역 및 종양 조직 바로 바깥의 영역이지만 암세포 자체의 세포내 구획에 속하지 않는다. 종양 미세환경은 악성 과정이 생존 및/또는 확장 및/또는 전파되는 구조적 및 또는 기능적 환경을 생성하는 조건을 포함하는 종양 환경의 임의의 및 모든 조건을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 종양 미세환경은 압력, 온도, pH, 이온 강도, 삼투압, 삼투질 농도, 산화적 스트레스, 하나 이상의 용질의 농도, 전해질의 농도, 글루코스의 농도, 하이알루로난의 농도, 락트산 또는 락테이트의 농도, 알부민의 농도, 아데노신의 수준, R-2-하이드록시글루타레이트의 수준, 피루베이트의 농도, 산소의 농도 및/또는 산화제, 환원제 또는 부속인자의 존재와 같지만 이들로 제한되지 않는 조건뿐만 아니라 당업자가 이해할 다른 조건에서의 변경을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드인 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기 또는 다른 천연, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연 또는 유도체화된 뉴클레오타이드 염기를 포함하는 중합체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 온전한 항체 및 항원에 대한 특이적 결합을 유지하는 항체의 단편을 포함하는 다중클론 및 단일클론 항체를 포함한다. 항체 단편은 단편 항원 결합(Fab) 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, Fab'-SH 단편, (Fab')₂ Fv 단편, Fd 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 단일-쇄 가변성 단편(scFv), 2가 scFv, 3가 scFv를 포함한 단일-쇄 항체 단편 및 단일 도메인 항체 단편(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디)일 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 용어는 면역글로불린, 예컨대, 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 단일-쇄 항체, 완전 인간 항체, 인간화된 항체, 항체의 항원-특이적 표적화 영역 및 비-항체 단백질을 포함하는 융합 단백질, 이중접합체 항체, 다중특이성, 예를 들어, 이중특이성, 항체, 다이어바디, 트라이아바디 및 테트라바디, 탠덤 다이-scFv 및 탠덤 트라이-scFv의 유전적으로 조작된 그리고/또는 그렇지 않으면 변형된 형태를 포함한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체"는 이들의 기능적 항체 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 용어는 또한 IgG 및 이의 하위-클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 비롯한 임의의 클래스 또는 하위-클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전장 항체를 포함한다.
- [0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 부분, 예를 들어, 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 다이어바디; 선형 항체(문헌[Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)]); 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다. 항체의 파파인 소화는 "Fab" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생성하며, 각각은 단일 항원-결합 부위 및 쉽게 결정화되는 능력을 반영하는 명칭인 잔여 "Fc" 단편이다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교 결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.
- [0028] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "단일-쇄 Fv", "scFv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하되, 이러한 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 일부 실시형태에서, Fv 폴리펩타이드는 V_H와 V_L 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커 또는 스페이서를 더 포함하며, 이는 sFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있게 한다. sFv의 검토를 위해, 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 "자연 발생적" V_H 및 V_L 도메인은 미국 특허 제8709755 B2호 및 미국 출원 WO/2016/03331A1에 개시된 것들과 같은 특정 조건하에서 scFv 형식으로 생성될 때 이의 친화성을 변경하기 위한 추가의 분자적 진화 없이 숙주로부터 단리되는 V_H 및 V_L 도메인을 지칭한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "친화성"은 2종의 작용제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 지칭하며, 해리 상수(K_d)로 표시된다. 친화성은 비관련 아미노산 서열에 대한 항체의 친화성보다 적어도 1-배 크거나, 적어도 2-배

크거나, 적어도 3-배 크거나, 적어도 4-배 크거나, 적어도 5-배 크거나, 적어도 6-배 크거나, 적어도 7-배 크거나, 적어도 8-배 크거나, 적어도 9-배 크거나, 적어도 10-배 크거나, 적어도 20-배 크거나, 적어도 30-배 크거나, 적어도 40-배 크거나, 적어도 50-배 크거나, 적어도 60-배 크거나, 적어도 70-배 크거나, 적어도 80-배 크거나, 적어도 90-배 크거나, 적어도 100-배 크거나 또는 적어도 1000-배 크거나 또는 그 이상일 수 있다. 표적 단백질에 대한 항체의 친화성은, 예를 들어, 약 100 나노몰(nM) 내지 약 0.1nM, 약 100nM 내지 약 1 피코몰(pM) 또는 약 100nM 내지 약 1 펨토몰(fM) 이상일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "결합능(avidity)"은 회색 후 해리에 대한 2중 이상의 작용제의 복합체의 저항성을 지칭한다. 용어 "면역반응성" 및 "우선적으로 결합하는"은 항체 및/또는 항원-결합 단편과 관련하여 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "결합"은, 예를 들어, 염 브리지 및 물 브리지와 같은 상호작용을 포함하는 공유, 정전기적, 소수성 및 이온성 및/또는 수소-결합 상호작용으로 인한 두 분자 사이의 직접적인 회합을 지칭한다. 비-특이적 결합은 약 10^{-7} M 미만의 친화성으로 결합, 예를 들어, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M 등의 친화성으로 결합하는 것을 지칭할 것이다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "세포 표면 발현 시스템" 또는 "세포 표면 디스플레이 시스템"에 대한 언급은 세포의 표면상에서의 단백질 또는 이의 일부의 디스플레이 또는 발현을 지칭한다. 전형적으로, 세포-표면 단백질에 융합된 관심 단백질을 발현하는 세포가 생성된다. 예를 들어, 단백질은 막관통 도메인을 갖는 융합 단백질로 발현된다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 "요소"는 폴리펩타이드의 융합, 폴리펩타이드의 영역 및 이의 기능적 돌연변이체 또는 단편을 포함하는 폴리펩타이드, 및 마이크로RNA 및 shRNA 및 이의 기능적 돌연변이체 또는 단편을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "영역"은 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 임의의 분절이다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "도메인"은 기능적 및/또는 구조적 특성을 갖는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 영역이다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "줄기" 또는 "줄기 도메인"은 측면 폴리펩타이드 영역에 구조적 가요성 및 간격을 제공하는 가요성 폴리펩타이드 커넥터 영역을 지칭하며, 이는 천연 또는 합성 폴리펩타이드로 구성될 수 있다. 줄기는 일반적으로 인간 IgG1의 Glu216에서 Pro230으로의 신장으로 정의되는 면역글로불린(예를 들어, IgG1)의 힌지 또는 힌지 영역으로부터 유래될 수 있다(문헌[Burton (1985) Molec. Immunol., 22:161-206]). 다른 IgG 아이소타입의 힌지 영역은 중쇄간 이황화(S-S) 결합을 형성하는 첫 번째와 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치시킴으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다. 줄기는 미국 특허 제5,677,425호에 개시된 바와 같이 변경된 힌지 영역을 포함하지만 이로 제한되지 않는 자연 발생 또는 비-자연 발생의 것일 수 있다. 줄기는 임의의 클래스 또는 하위클래스의 항체로부터 유래되는 완전한 힌지 영역을 포함할 수 있다. 줄기는 또한 CD8, CD28 또는 측면 영역에 가요성 및 간격을 제공하는 유사한 기능을 제공하는 다른 수용체로부터 유래되는 영역을 포함할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단리된"은 물질이 그것의 원래의 환경(예를 들어, 자연 발생인 경우 천연 환경)으로부터 제거되는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 자연 발생 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리되지 않지만, 천연 시스템에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리되는 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 조성물의 일부일 수 있으며, 그리고 이러한 벡터 또는 조성물이 그것의 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 단리되어 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 아미노산 잔기의 단일체이다. 폴리펩타이드는 고정된 구조로 접히지 않으며 임의의 번역후 변형도 없다. "단백질"은 고정된 구조로 접히는 폴리펩타이드이다. "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 천연 환경의 오염물질 성분, 예를 들어, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질과 같은 폴리펩타이드의 진단적 또는 치료적 용도를 방해할 수 있는 물질을 제거하기 위해 "정제될" 수 있다. 폴리펩타이드는 (1) Lowry 방법에 의해 결정되는 바와 같이 항체의 90중량% 초과, 95중량% 초과 또는 98중량% 초과, 예를 들어, 99중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 배열분석 장치(spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 환원 또는 비환원 조건하에 쿠마시 블루 또는 은 염색을 사용하여 소듐 도데실 설페이

트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의한 균질성으로 정제될 수 있다.

- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 "면역 세포"는 일반적으로 골수에서 생성된 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell: HSC)로부터 유래되는 백혈구(white blood cell)(백혈구(leukocyte))를 포함한다. "면역 세포"는, 예를 들어, 림프구(T 세포, B 세포, 천연 살해(natural killer: NK) 세포) 및 골수-유래 세포(호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포)를 포함한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 "T 세포"는 T-헬퍼 세포(CD4⁺ 세포), 세포독성 T 세포(CD8⁺ 세포), T-조절 세포(Treg) 및 감마-델타 T 세포를 포함하여 CD3을 발현하는 모든 유형의 면역 세포를 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "세포독성 세포"는 세포독성 반응을 매개할 수 있는 세포인, CD8⁺ T 세포, 천연-살해(NK) 세포, NK-T 세포, $\gamma \delta$ T 세포, CD4⁺ 세포의 하위집단 및 호중구를 포함한다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "줄기 세포"는 일반적으로 만능(pluripotent) 또는 다능성(multipotent) 줄기 세포를 포함한다. "줄기 세포"는, 예를 들어, 배아 줄기 세포(embryonic stem cell: ES); 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell: MSC); 유도-만능 줄기 세포(induced-pluripotent stem cell: iPS); 및 수임 전구 세포(committed progenitor cell)(조혈 줄기 세포(HSC); 골수 유래 세포 등)를 포함한다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료", "치료하는" 등은 목적하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방적일 수 있고/있거나 질환 및/또는 질환에 기인할 수 있는 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "치료"는 포유동물, 예를 들어, 인간에서 질환의 임의의 치료를 포괄하며, 다음을 포함한다: (a) 질환에 대한 소인이 있을 수 있지만 아직 질환에 걸린 것으로 진단되지 않은 대상체에서 질환이 발생하는 것을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉, 이의 발병을 저지하는 것; 및 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉, 질환의 퇴행을 유발하는 것.
- [0045] 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "개체", "대상체", "숙주" 및 "환자"는 인간, 무린(예를 들어, 래트, 마우스), 토끼목(예를 들어, 토끼), 비-인간 영장류, 인간, 개, 고양이, 유제류(예를 들어, 말, 소, 양, 돼지, 염소) 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 포유동물을 지칭한다.
- [0046] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료적 유효량" 또는 "유효한 양"은 질환을 치료하기 위해 포유동물 또는 다른 대상체에게 투여될 때, 질환에 대한 이러한 치료에 영향을 주기에 충분한 작용제의 양 또는 2종의 작용제의 조합된 양을 지칭한다. "치료적 유효량"은 작용제(들), 질환 및 이의 중증도 및 치료될 대상체의 연령, 체중 등에 따라 달라질 것이다.
- [0047] 본 명세서에서 사용되는 용어 "진화(evolution)" 또는 "진화하는"은 그 자체로 개선된 생물학적 분자이고/이거나 또 다른 개선된 생물학적 분자의 생성에 기여하는 상이한 폴리펩타이드를 암호화하는 상이한 폴리뉴클레오타이드를 생성하기 위해 하나 이상의 돌연변이 유발 방법을 사용하는 것을 지칭한다. "생리학적" 또는 "정상적인" 또는 "정상적인 생리학적" 조건은 압력, 온도, pH, 이온 강도, 삼투압, 삼투질 농도, 산화적 스트레스, 하나 이상의 용질의 농도, 전해질의 농도, 글루코스의 농도, 하이알루로난의 농도, 락트산 또는 락테이트의 농도, 알부민의 농도, 아데노신의 수준, R-2-하이드록시글루타레이트의 수준, 피루베이트의 농도, 산소의 농도 및/또는 산화제, 환원제 또는 부속인자의 존재와 같지만 이들로 제한되지 않는 조건뿐만 아니라 대상체에 대한 투여 부위에서, 또는 작용 부위의 조직 또는 장기에서 정상적인 범위 내로 간주될 수 있는 기타 조건이다.
- [0048] 본 명세서에서 사용되는 "형질도입된 세포" 또는 "안정적으로 형질감염된 세포"는 세포의 게놈에 통합되는 외인성 핵산(들)을 포함하는 세포이다. 본 명세서에서 사용되는 "유전적으로 변형된 세포"는 외인성 핵산(들)이 세포의 게놈에 통합되었는지 여부와 관계없이 그리고 외인성 핵산(들)을 세포에 도입하는데 사용된 방법에 관계없이 외인성 핵산(들)을 포함하는 세포이다. 세포의 게놈에 통합되지 않은 세포 내부의 외인성 핵산(들)은 본 명세서에서 "염색체외"로 지칭될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "변형된 세포"는, 예시적인 실시형태에서, 외인성 핵산을 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 또는 외인성 핵산에 의해 유전적으로 변형된 세포인 재조합 핵산 벡터와 회합된 세포이다. 전형적으로, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 조성물 및 방법에서, 변형된 세포는 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 요소를 포함하여 세포 표면의 단백질과 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 표면의 단백질 간의 상호작용을 통해 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합한다. 리포솜 시약과 같은 지질-기반 시약 내부에서의 핵산의 형질감염을 포함하는 조성물 및 방법에서, 재조합 핵산 벡터의 유형인 핵산을 포함하는 지질-기반 시약은 융합되거나 또는 변형된 세포에 의해 국제

화되기 전에 변형된 세포의 지질 이중층과 회합한다. 유사하게는, 폴리에틸렌이민(PEI) 또는 인산칼슘-기반 형질감염과 같은 핵산의 화학-기반 형질감염을 포함하는 조성물 및 방법에서, 핵산은 전형적으로 복합체가 변형된 세포에 의해 국제화되기 전에 변형된 세포의 음으로 하전된 막과 결합하는 재조합 핵산 벡터를 형성하기 위해 양으로 하전된 형질감염 시약과 회합된다. 세포를 안정적으로 형질감염시키거나 또는 유전적으로 변형시키는 다른 수단 또는 방법은 전기천공법, 발사체성 전달(ballistic delivery) 및 미세주입을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "폴리펩타이드"는 일부 또는 전체 단백질 분자뿐만 아니라 임의의 번역후 또는 기타 변형을 포함할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용되는 슈도타이핑 요소는 표적 숙주 세포를 확인하고 이에 결합하는 하나 이상의 폴리펩타이드, 전형적으로 당단백질인 "결합 폴리펩타이드" 및 레트로바이러스와 표적 숙주 세포막의 융합을 매개하여 레트로바이러스 게놈을 표적 숙주 세포에 도입할 수 있게 하는 하나 이상의 "융합성 폴리펩타이드"를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "결합 폴리펩타이드"는 또한 "T 세포 및/또는 NK 세포 결합 폴리펩타이드" 또는 "표적 관여 요소"로도 지칭될 수 있고, "융합성 폴리펩타이드(fusogenic polypeptide)"는 또한 "융합성 요소"로도 지칭될 수 있다.

[0050] 예를 들어, 휴지기 T 세포와 같은 "휴지기(resting)" 림프구는 Ki-67과 같은 활성화 마커를 발현하지 않는 세포 주기의 G0 단계에 있는 림프구이다. 휴지기 림프구는 특정 항원을 만난 적이 없는 미경험 T 세포 및 항원과의 이전 만남으로 인해 변경된 기억 T 세포를 포함할 수 있다. "휴지기" 림프구는 또한 "휴지상태(quiescent)" 림프구로도 지칭된다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 "림프구 제거(lymphodepletion)"는, 예를 들어, 림프구 제거제의 투여에 의해 대상체에서 림프구의 수를 감소시키는 방법을 포함한다. 림프구 제거는 또한 부분 신체 또는 전신 분할 방사선 요법에 의해서도 얻어질 수 있다. 림프구 제거제는 포유동물에게 투여될 때 포유동물에서 기능적 림프구의 수를 줄일 수 있는 화학적 화합물 또는 조성물일 수 있다. 이러한 작용제의 한 예는 1종 이상의 화학 치료제이다. 이러한 작용제 및 투여량은 공지되어 있으며, 치료될 대상체에 따라 치료하는 의사에 의해 선택될 수 있다. 림프구 제거제의 예는 플루다라빈(fludarabine), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 클라드리빈(cladribine), 데닐루킨 디프티톡스(denileukin diftotox), 알렘티즈마브(alemtizumab) 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0052] RNA 간섭(RNAi)은 RNA 분자가 표적화된 RNA 분자를 중화함으로써 유전자 발현 또는 번역을 저해하는 생물학적 과정이다. RNA 표적은 mRNA일 수 있거나, 또는 RNAi에 의한 기능적 저해에 민감한 임의의 다른 RNA일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "저해성 RNA 분자"는 세포 내의 임의의 존재가 RNAi를 생성하고, 저해성 RNA 분자가 표적화된 전사체의 발현을 감소시키는 RNA 분자를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 저해성 RNA 분자는 RNA 듀플렉스를 형성할 수 있는 5' 스템 및 3' 스템을 갖는다. 저해성 RNA 분자는, 예를 들어, miRNA(내인성 또는 인공) 또는 shRNA, miRNA(즉, Pri-miRNA 또는 사전-miRNA) 또는 shRNA의 전구체, 또는 단리된 핵산으로 세포 또는 대상체에 직접적으로 전사 또는 도입되는 dsRNA일 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 "이중 가닥 RNA" 또는 "dsRNA" 또는 "RNA 듀플렉스"는 2개의 가닥으로 구성되는 RNA 분자를 지칭한다. 이중-가닥 분자는 듀플렉스 RNA 구조를 형성하기 위해 혼성화하는 2개의 RNA 가닥 또는 듀플렉스 구조를 형성하기 위해 스스로 되돌아오는 단일 RNA 가닥으로 구성되는 것들을 포함한다. 듀플렉스 영역에 있는 대부분의(반드시 전부는 아님) 염기는 염기쌍이다. 듀플렉스 영역은 표적 RNA에 상보적인 서열을 포함한다. 표적 RNA에 상보적인 서열은 안티센스 서열이고, 종종 18개 내지 29개, 19개 내지 29개, 19개 내지 21개 또는 25개 내지 28개, 또는 일부 실시형태에서, 하한(low end)으로 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개 및 상한(high end)으로 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개 사이의 뉴클레오타이드 길이이되, 주어진 범위는 항상 상한보다 낮은 하한을 갖는다. 이러한 구조는 전형적으로 5' 스템, 루프 및 각 스템과 인접하며 듀플렉스의 일부가 아닌 루프에 의해 연결된 3' 스템을 포함한다. 루프는, 소정의 실시형태에서, 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시형태에서, 루프는 2개 내지 40개, 3개 내지 40개, 3개 내지 21개 또는 19개 내지 21개, 또는 일부 실시형태에서, 하단으로 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 및 상단으로 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개 또는 40개 사이의 뉴클레오타이드를 포함하되, 주어진 범위는 항상 상한보다 낮은 하한을 갖는다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "마이크로RNA 측면 서열"은 마이크로RNA 처리 요소를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 마이크로RNA 처리 요소는 전구체 마이크로RNA로부터 성숙 마이크로RNA의 생산에 기여하는 최소

핵산 서열이다. 종종 이러한 요소는 마이크로RNA 스템-루프 구조의 측면에 있는 40개의 뉴클레오타이드 서열 내에 위치된다. 일부 예에서, 마이크로RNA 처리 요소는 마이크로RNA 스템-루프 구조의 측면에 있는 5개 내지 4,000개의 뉴클레오타이드 길이의 뉴클레오타이드 서열의 신장부(stretch) 내에서 발견된다.

- [0055] 다중 저해성 RNA 분자와 관련하여 사용될 때 용어 "링크"는 2개의 저해성 RNA 분자를 연결하는 연결 수단을 지칭한다.
- [0056] 본 명세서에서 사용되는 "재조합 레트로바이러스"는 복제 가능한 레트로바이러스로 명시적으로 언급되지 않는 한 복제 불가능 또는 "복제 불능" 레트로바이러스를 지칭한다. 용어 "재조합 레트로바이러스" 및 "재조합 레트로바이러스 입자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이러한 레트로바이러스/레트로바이러스 입자는, 예를 들어, 감마 레트로바이러스 및 예시적인 실시형태에서, 렌티바이러스를 포함하는 임의의 유형의 레트로바이러스 입자일 수 있다. 공지된 바와 같이, 이러한 레트로바이러스 입자, 예를 들어, 렌티바이러스 입자는 전형적으로 Gag, Pol 및 Rev와 같은 패키징 성분, 슈도타이핑 요소를 암호화하는 외피 또는 슈도타이핑된 플라스미드 및 전형적으로 관심 유전자(들) 또는 기타 코딩 서열이 암호화되는 플라스미드인 전달, 계놈 또는 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 발현 벡터를 포함하는 플라스미드로 패키징 세포를 형질감염시킴으로써 패키징 세포에서 형성된다. 따라서, 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 발현 벡터는 세포로의 형질감염 후 발현 및 패키징을 촉진하는 서열(예를 들어, 5' LTR 및 3' LTR 측면, 예를 들어, psi 패키징 요소 및 표적 이중 코딩 서열)을 포함한다. 용어 "렌티바이러스" 및 "렌티바이러스 입자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0057] miRNA의 "프레임워크"는 miRNA를 둘러싸는 "5' 마이크로RNA 측면 서열" 및/또는 "3' 마이크로RNA 측면 서열" 및, 일부 경우에, miRNA에서 스템-루프 구조의 스템을 분리하는 루프 서열로 구성된다. 일부 예에서, "프레임워크"는, 예를 들어, miR-155와 같은 자연 발생적 miRNA로부터 유래된다. 용어 "5' 마이크로RNA 측면 서열" 및 "5' 암(arm)"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 용어 "3' 마이크로RNA 측면 서열" 및 "3' 암"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0058] 본 명세서에서 사용되는 용어 "miRNA 전구체"는 miRNA, 예컨대, 일차 RNA 전사체, pri-miRNA 또는 사전-miRNA로 효소적으로 가공될 수 있는 임의의 길이의 RNA 분자를 지칭한다.
- [0059] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작제물"은 단리된 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 작제물은 폴리펩타이드, 예를 들어, 림프증식성 요소를 암호화할 수 있다. 당업자는 작제물이 문맥에 따라 단리된 폴리뉴클레오타이드를 지칭하는지 또는 단리된 폴리펩타이드를 지칭하는지 여부를 이해할 것이다.
- [0060] 본 명세서에서 사용되는 "MOI"는 세포의 수당 감염에 사용된 바이러스 입자의 수의 비와 동일한 감염 다중도 비를 지칭한다. 바이러스 입자의 수의 기능적 역할은 비제한적인 예로서 FACS 및 리포터 발현을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0061] "말초 혈액 단핵 세포"(Peripheral blood mononuclear cell: PBMC)는 둥근 핵을 갖는 말초 혈액 세포를 포함하며, 림프구(예를 들어, T 세포, NK 세포 및 B 세포) 및 단핵구를 포함한다. PBMC가 아닌 일부 혈액 세포 유형은 적혈구, 혈소판 및 과립구(즉, 호중구, 호산구 및 호염기구)를 포함한다.
- [0062] 본 개시내용 및 본 명세서에 제공된 양태 및 실시형태는 개시된 특정 실시예에 제한되지 않으며, 물론 이와 같이 다양할 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시예 및 실시형태를 개시하기 위한 목적이며, 본 개시내용의 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에 제한하려는 의도가 아님을 이해하여야 한다.
- [0063] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 그 범위의 상한 및 하한과 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급되거나 또는 개재하는 값 사이의 하한 단위의 10분의 1까지 각각의 개재하는 값은 본 개시내용 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 제한에 따라 본 발명 내에 포함된다. 언급된 범위가 제한 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 포함된 제한 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다. 범위에 대해 여러 개의 낮은 값과 여러 개의 높은 값이 중첩되어 주어지면, 당업자는 선택된 범위가 높은 값보다 작은 낮은 값을 포함할 것임을 인식할 것이다. 본 명세서의 모든 제목은 독자의 편의를 위한 것이며 제한적이지 않다.
- [0064] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한

임의의 방법 및 물질이 또한 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 이제 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 그 간행물이 인용된 것과 관련하여 방법 및/또는 물질을 개시하고 설명하기 위해 참조에 의해 본 명세서에 인용된다.

[0065] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같은 단수 형태는 문맥에서 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다는 점에 유의하여야 한다. 따라서, 예를 들어, "키메라 항원 수용체"에 대한 언급은 복수의 이러한 키메라 항원 수용체 및 당업자에게 공지된 이의 등가물 등을 포함한다. 청구범위는 임의의 선택적 요소를 제외하도록 작성될 수 있음에 추가로 유의한다. 이와 같이, 이러한 서술은 청구항 구성요소의 인용 또는 "부정적" 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "오직" 등과 같은 이러한 배타적인 용어의 사용에 대한 선행 근거로 사용하기 위한 것이다.

[0066] 명료함을 위해 별개의 실시형태와 관련하여 기재된 본 발명의 소정의 특징은 단일 실시형태에서 조합하여 제공될 수도 있다는 것이 이해된다. 반대로, 간결함을 위해, 단일 실시형태의 맥락에서 기재된 본 발명의 다양한 특징은 별도로 또는 임의의 적합한 하위-조합으로 제공될 수도 있다. 본 발명에 속하는 실시형태의 모든 조합은 본 발명에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 그리고 모든 조합이 별도로 그리고 명시적으로 개시된 것처럼 본 명세서에 개시된다. 또한, 다양한 실시형태의 모든 하위-조합 및 이들의 요소도 또한 본 발명에 의해 구체적으로 포함되며, 각각의 그리고 모든 이러한 하위-조합이 별도로 그리고 명시적으로 본 명세서에 개시된 것처럼 본 명세서에 개시된다.

[0067] 상세한 설명

[0068] 본 개시내용은 림프구, 예를 들어, NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, T 세포를 변형시키기 위한, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키기 위한 개선된 방법 및 조성물을 제공함으로써 선행 기술의 문제를 극복한다. 본 명세서에서 방법 및 조성물의 일부는 전문화된 장치를 필요로 하는 일부 단계를 피하는 림프구를 형질도입 또는 형질감염시키기 위한 단순화되고 보다 신속한 과정을 제공한다. 따라서, 방법은 세포 요법 방법의 대중화를 향한 중요한 단계를 제공한다. 림프구, 예를 들어, NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, T 세포를 변형시키기 위한 예시적인 방법 및 조성물은 선행 방법보다 더 짧은 시간에 수행되며, 실제로 일부 실시형태에서 신속한 현장 진료 방법을 제공한다. 또한, 피하 투여에 적합화된 세포 제형 조성물을 포함하는, 이러한 개선된 방법에서의 용도를 포함하여 많은 용도를 갖는 조성물이 제공된다. 이러한 조성물 중 일부는, 예를 들어, 성장 인자의 부재하에 시험관내 배양을 포함하여 개선된 증식 및 생존 품질을 갖는 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구를 포함한다. 이러한 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구는, 예를 들어, T 세포 증식 및 생존에 영향을 미치는 인자를 더 잘 이해하기 위한 연구 도구로서, 그리고 상업적 생산을 위해, 예를 들어, 수확되고, 테스트되거나 또는 상업적 제품에 사용될 수 있는 성장 인자 및 면역 조절제와 같은 소정의 인자의 생산을 위한 유용성을 가질 것이다. 그리고, 이러한 변형된 및 유전적으로 변형된 림프구는 암의 치료에 유용성을 갖는다.

[0069] 본 명세서에서 면역 세포 요법을 위한 예시적인 방법 및 조성물은 피하 또는 근육내 전달 및 피하 또는 근육내 세포 제형을 포함하고, 이들과 양립 가능하며, 이들에 대해 효과적이고/이거나 심지어 이들에 적합하다. 이러한 전달 방법 및 세포 제형(즉, 전달 조성물) 중 일부는 세포 응집을 촉진한다. 이러한 세포 응집은 일부 실시형태에서, 항원, 성장 인자 및 면역 조절제를 세포 제형 또는 세포 제형의 투여 부위에 첨가함으로써 추가로 향상되는 세포 증식 및 생존을 촉진한다.

[0070] 또한, 악성 세포의 유전적 변형을 통한 표적 항원 이용 가능성(예를 들어, 에피토프 또는 항원 차폐)의 손실과 같은 CAR-암세포에 의한 CAR 요법의 저항성과 관련된 문제를 극복하는 방법 및 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0071] 혈액 또는 이의 성분의 존재하에 T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키기 위한 예시적인 세포 처리 방법

[0072] 예시적인 양태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 방법 또는 세포 제형을 제조하는 관련 방법을 포함하며, 이는 반응 혼합물에서 생체의 림프구(예를 들어, NK 세포 및/또는 T 세포)를 포함하는 혈액 세포를 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드이거나 또는 이를 포함하는 제조합 벡터, 예컨대, 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자를 접촉시키는 단계를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 반응 혼합물에서 T 세포의 유전적 변형을 촉진하기 위해 제조합 레트로바이러스 입자의 용액 또는 표면에 T 세포 활성화 요소를 포함한다. 본 명세서의 실시예에서 이러한 반응 혼합물은 미분획 전혈을 포함할 수 있거나 또는 총 유헤 세포(TNC)를 포함하는 전혈에서 발견되는 모든 또는 많은 세포 유형을 포함할 수 있고, 그리고 예시

적인 실시형태에서, 변형된 T 세포는 피하로 전달된다는 것이 입증되었다. 도 1은 이러한 방법의 다수의 비제한적인 예시적인 작업 흐름을 제공한다.

[0073] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 명세서에 제공된 방법 중 일부는 대상체로부터 혈액이 수집(110)되는 선택적 단계를 포함한다. 혈액은 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 대상체로부터 수집되거나 또는 얻어질 수 있다. 예를 들어, 혈액은 정맥천자, 성분채집 또는 혈액 샘플이 수집되는 임의의 기타 혈액 수집 방법에 의해 수집될 수 있다. 일부 실시형태에서, 수집되는 혈액의 부피는 1ml 내지 120ml이다. 예시적인 실시형태에서, 특히 혈액을 채취하는 대상체는 정상적인 수준의 NK 세포, 예시적인 실시형태에서, T 세포를 갖고, 수집되는 혈액의 부피는 1ml 내지 25ml이다.

[0074] 본 명세서에 제공된 변형, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키는 방법의 일부 실시형태는 대상체로부터 혈액을 수집하는 단계를 포함하지 않는다는 점에 주목하여야 한다. 혈액이 대상체로부터 수집되는지 여부에 관계없이, 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 변형시키기 위해 본 명세서에 제공된 예시적인 방법 양태에서, 림프구는 반응 혼합물에서 복제 불능 레트로바이러스 입자와 접촉된다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 접촉 및 접촉이 일어나는 반응 혼합물은 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 폐쇄형 세포 처리 시스템 내에서 일어난다. 본 명세서에 제공된 시스템 및 방법의 일부 양태 및 실시형태에서 사용되는 이러한 폐쇄형 처리 시스템 및 방법은 당업계에 공지된 임의의 시스템 및 방법일 수 있다. 비제한적인 예로서, 시스템 또는 방법은 전통적인 폐쇄형 세포 처리 시스템 및 방법 또는 본 명세서에서 "더 최근의" 방법 또는 시스템으로 지칭되는 시스템 또는 방법일 수 있다(예를 들어, W02018/136566 및 W02019/055946 참조). 생체의 림프구의 유전적 변형 및/또는 형질도입을 포함하는 전통적인 폐쇄형 세포 처리 방법, 특히 자가 세포 요법을 위한 방법에서, PBMC 농축(들), 세척(들), 세포 활성화, 형질도입, 증식, 수집 및 선택적으로 재도입과 같은 많은 단계가 수 일에 걸쳐 발생한다. 보다 최근의 방법에서, 이러한 생체의 세포 처리와 관련된 단계 및 시간 중 일부가 감소되었다(예를 들어, W02018/136566 참조). 다른 보다 최근의 방법에서(도 1a 참조), 이러한 생체의 세포 처리와 관련된 단계 및 시간 중 일부가 추가로 감소되거나 또는, 예를 들어, 생체의 증식 단계와 마찬가지로 제거되었다(예를 들어, W02019/055946 참조). 이러한 보다 최근의 방법(뿐만 아니라 본 명세서에 제공된 추가로 개선된 세포 처리 방법)은 또한, 예를 들어, 사전활성화가 없거나 또는 최소(예를 들어, 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구를 활성화제와 30분, 15분, 10분 또는 5분 미만으로 접촉시킴)인 신속한 생체의 형질도입 과정을 사용한다. 이러한 방법의 소정의 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소는 접촉 단계가 일어나는 반응 혼합물에 존재한다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소는 반응 혼합물에 존재하는 레트로바이러스 입자의 표면과 회합된다. 예시적인 실시형태에서, 생체의 증식 단계가 없는 신속한 생체의 유전적 변형을 사용하는 이러한 방법은 신속한 현장 진료(rPOC) 자가 세포 요법 방법에 사용된다. 그러나, 이러한 보다 최근의 방법은 여전히 PBMC 농축 단계/절차(120A)를 포함하며, 이는 전형적으로 폐쇄형 시스템 내에서 적어도 약 1시간이 소요되고, 이어서 세포 계수, 이동 및 배지 추가가 뒤 따르며, 이는 형질도입 반응 혼합물(130A)을 형성하기 위해 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전에 적어도 약 45분이 추가로 소요된다. 본 명세서에서 상세히 논의되는 바와 같이 인큐베이션을 포함한 접촉 단계인 "바이러스 형질도입" 단계 후에, 림프구는 전형적으로, 예를 들어, Sepax를 사용하여 현탁액(140A)에 남아 있는 레트로바이러스 입자로부터 세척되고, PBMC를 전달 용액(150A)에 재현탁시켜 수집하여 전형적으로 재주입용 주입 백, 주사용 주사기 또는 보관용 동결보존 바이알(160A)에 세포 제형을 형성한다. 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 전통적인 PBMC 농축 절차는 전형적으로 피콜 밀도 구배 및 원심력(예를 들어, 원심분리) 또는 구심력(예를 들어, Sepax)을 포함하거나, 또는 PBMC를 농축하기 위해 백혈구 성분채집(leukapheresis)을 사용한다.

[0075] 소정의 하위 실시형태에서, 원치 않는 세포의 표면상의 항원에 지시된 항체는 PBMC 단리 전에 혈액(170A) 또는 TNC(170B)에 첨가되고, 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 원치 않는 세포에 결합하기에 효과적인 기간 동안 인큐베이션된다. 항체는 비드에 커플링될 수 있거나, 또는 본 명세서에 보다 상세히 기재되는 바와 같이 원치 않는 세포를 적혈구로 로세팅(rossette)하기 위해 추가적인 항체가 인큐베이션에 포함될 수 있다. 그런 다음, 원치 않는 세포는 원치 않는 세포가 적혈구와 함께 펠릿을 형성하는 PBMC 단리 단계에서 제거된다.

[0076] 본 명세서에 제공된 실시예에서 입증된 바와 같이, 놀랍게도 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)는 항응고제를 포함하는 미분획 전혈의 반응 혼합물에서 복제 불능 레트로바이러스 입자와 접촉될 수 있고, 상당한 백분율의 림프구가 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입될 수 있다는 것이 발견되었다. 따라서, 제조한 레트로바이러스 입자에 의한 림프구의 효과적인 유전적 변형은 PBMC 외에 혈액 성분 및 혈액 세포의 존재하에 수행될 수 있다는 것이 발견되었다.

[0077] 따라서, 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 유전적 변형이거나 또는 이를 유도하는 세포 또는 NK 세

포의 변형은 PBMC 외에 혈액 성분 및 혈액 세포를 포함하는 반응 혼합물에서 수행되되, 이러한 유전적 변형은 반응 혼합물 내의 T 세포 및 NK 세포를 예시적인 실시형태에서 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터와 접촉시킴으로써 일어난다. 본 명세서에 제공된 소정의 예시적인 실시형태에서(도 1b, 도 1E 및 도 1F 참조), PBMC 농축 절차(예를 들어, 밀도 구배 사용) 대신에, PBMC가 아닌 세포 유형도 농축하는 적어도 하나의 이상의 다른 혈액 세포 유형에 대해 림프구를 농축시키는 세포 처리 필터 또는 필터 세트(예를 들어, 백혈구가 역관류에 의해 제거될 수 있는 필터 세트가 포함된 역관류용으로 구성된 백혈구감소 필터 어셈블리)가 사용된다(120B, 120E 및 120F). 이 단계는, 소정의 실시형태에서, 형질도입 반응 혼합물(130B, 130E 및 130F)을 형성하기 위해 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전에 림프구를 풍부하게 하고 농축시킨다. 소정의 실시형태에서, 필터는 PBMC 외에도 혈액 세포를 농축하며, 예를 들어, 필터는 TNC를 농축할 수 있다. 도 1b에 나타낸 바와 같이, 예를 들어, 전형적으로 명세서에서 상세히 논의되는 바와 같이 선택적 인큐베이션이 포함된 접촉 단계인 "바이러스 형질도입" 단계 후에, 림프구는 전형적으로, 예를 들어, Sepax를 사용하거나 또는 백혈구감소 필터의 세포 위로 완충액을 통과시켜 현탁액에 남아 있는 레트로바이러스 입자로부터 세척되고, PBMC 또는 TNC를 전달 용액(150B)에 재현탁시켜 수집하여 세포 제형이 형성되었고, 최종 세포 제형 제품은 전형적으로 재주입용 주입 백, 주사용 주사기 또는 보관용 동결보존 바이알(160B)에 들어 있다.

[0078] 본 명세서에 제공된 방법의 예시적인 실시형태에서, "바이러스 형질도입" 단계의 선택적 인큐베이션이 포함된 접촉 단계는 32℃ 내지 42℃, 예컨대, 37℃의 온도에서 수행된다. 다른 예시적인 실시형태에서, "바이러스 형질도입" 단계의 선택적 인큐베이션이 포함된 접촉 단계는 37℃보다 낮은 온도, 예컨대, 4℃ 내지 실온에서 수행된다(본 명세서에서 "냉간 접촉" 단계로도 지칭됨)(도 1E 및 도 1F 참조). 냉간 접촉 단계와 관련된 선택적 인큐베이션은 본 명세서에 논의된 임의의 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 냉간 접촉 단계와 관련된 선택적 인큐베이션은 1시간 이하 동안 수행된다. 냉간 접촉 및 선택적 인큐베이션 단계 후, 일부 실시형태에서, 림프구는 백혈구감소 필터(140E, 140cF)의 세포 위로 세척 완충액을 통과시켜 필터에 남아 있는 레트로바이러스 입자로부터 세척되고, TNC를 전달 용액(150E, 150bF)에 재현탁시켜 수집하여 세포 제형이 형성되었고, 최종 제품은 전형적으로 재주입용 주입 백, 주사용 주사기 또는 보관용 동결보존 바이알(160E, 160F)에 들어 있다. 이론에 제한되지 않고, 표면에 활성화 요소를 발현하는 바이러스 입자와 함께 1시간 이하의 시간 동안 TNC를 냉간 접촉시키면 바이러스 입자가 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합되지만 바이러스의 국제화는 거의 없을 것으로 여겨진다. 이는 또한 바이러스 입자에 의해 가교된 T 세포 및/또는 NK 세포 응집체로 이어질 것이다. 또한, 더 낮은 온도 및 더 짧은 인큐베이션 시간 때문에, 더 오랜 기간 동안 그리고/또는 37℃에 가까운 온도에서 인큐베이션된 세포에 비해 세포의 활성화가 적을 것이다. T 세포 및/또는 NK 세포의 활성화는 부착 분자의 발현 및 백혈구감소 필터에 대한 결합을 초래하여, 필터의 역관류에 의해 이들 세포를 회수하는 능력을 방해하는 것으로 여겨진다.

[0079] 냉간 접촉 단계를 포함하는 소정의 실시형태에서, "바이러스 형질도입" 단계는 또한 세포가 백혈구감소 필터로부터 제거된 후 2차 인큐베이션(190E, 190F)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 배지와 같은 배양 배지에 세포를 현탁시킴으로써 수행된다. 일부 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 전달 용액에서 수행된다. 예시적인 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 전달 용액에서 수행되지만, 임의의 동결보존제가 없다. 예시적인 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 32℃ 내지 42℃, 예컨대, 37℃의 온도에서 수행된다. 선택적 2차 인큐베이션은 본 명세서에서 논의된 임의의 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 선택적 2차 인큐베이션은 4시간 미만 동안 수행된다. 이론에 제한되지 않고, TNC를 표면에 활성화 요소를 발현하는 바이러스 입자와 함께 2차 인큐베이션하면 세포가 활성화될 것으로 여겨진다. T 세포 및/또는 NK 세포가 활성화되면 세포가 응집될 것이다.

[0080] 따라서, T 세포 및/또는 NK 세포가 응집체를 형성할 수 있는 도 1에 기술된 작업 흐름에는 적어도 2개의 메커니즘이 있다. (1) 표면-결합 바이러스 입자가 세포를 가교시켜 활성이 4℃ 내지 실온의 온도에서 향상되고, 그리고 (2) T 세포 및/또는 NK 세포의 활성화가 이들의 응집을 유도하여 32℃ 내지 42℃의 온도에서 향상된다. 상이한 조건하에 두 메커니즘 중 하나에 의해 형성된 이러한 응집체는 거친 필터에 의해 포획될 수 있는 반면, 기타 찌꺼기, 대략 14μm인 림프구, 단핵구 및 과립구를 포함하는 단일 세포 및 사용된 거친 필터의 공극 크기보다 작은 세포 응집체는 폐기물로 통과한다. 일부 실시형태에서, 37℃ 근처의 온도에서의 인큐베이션을 포함하는 형질도입 반응은 거친 필터를 통과하여 응집된 T 세포 및/또는 NK 세포(200E)를 포획한다. 일부 실시형태에서, 4℃ 내지 실온의 온도 또는 그 근처의 온도에서의 형질도입 반응은 거친 필터를 통과하여 응집된 T 세포 및/또는 NK 세포(200F)를 포획한다. 거친 필터의 세포는 전형적으로 재주입용 주입 백, 주사용 주사기 또는 보관용 동결보존 바이알(160E 및 160F)에 세포 제형을 형성하기 위해 전달 용액에 수집된다. T 세포 및/또는 NK 세포 응집체를 수집하는데 거친 필터가 사용되는 예시적인 실시형태에서, 전달 용액의 세포 조성은 40%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90% 또는 95% 초과인 T 세포이다.

[0081] 본 명세서에 제공된 반응 혼합물, 용도, 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포 또는 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키는 방법의 소정의 실시형태에서, 혈액 샘플 및 이에 따른 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입되는 림프구는 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 PBMC 농축 절차를 거치지 않는다. 일부 이러한 실시형태에서, 혈액 샘플, 예를 들어, 항응고된 전혈 샘플은 혈액 샘플로부터의 림프구를 포함하는 이러한 TNC가 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 벡터와 접촉하기 전에 총 유핵 세포(TNC)를 얻기 위해 백혈구제거 필터 어셈블리로도 알려진 백혈구감소 필터 어셈블리와 같은 필터에 적용된다. 백혈구감소 필터 어셈블리는 당업계에 공지된 임의의 필터, 예를 들어, 총 유핵 세포(TNC)를 수집하는 필터를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 필터는 폴리우레탄, 셀룰로스 아세테이트, 폴리에스터, 코마 코튼(combed cotton), PTFE 또는 GHP를 포함하는 막을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 백혈구감소 필터 어셈블리는, 예를 들어, HemaTrate™ 필터, Acrodisc™ 필터 또는 폴(Pall)로부터 입수 가능한 임의의 백혈구감소 필터, 예를 들어, Leukotrap™ 필터 또는 Haemonetics®를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 백혈구감소 필터는 3세대 또는 4세대 이상의 고급 백혈구감소 필터이다(문헌[Sharma et al. Asian J Transfus Sci. 2010 Jan; 4(1): 3-8]).

[0082] 일부 실시형태에서, 백혈구감소 필터에 적용되는 혈액 샘플의 부피는 40ml 내지 120ml(Hematrate; 쿡 리젠텍(Cook Regentec)) 또는 2ml 내지 12ml(Acrodisc; 폴, AP-4952)이다. 일부 실시형태에서, 백혈구감소 필터 어셈블리에 있는 필터의 공극 직경은 10 μ m, 7.5 μ m, 5 μ m, 4 μ m 또는 3 μ m 미만 또는 0.5 μ m 내지 4 μ m이다. 일부 실시형태에서, 백혈구감소 필터 어셈블리는 혈액 샘플에서 백혈구의 적어도 90%를 수집 및/또는 보유할 수 있으며, 비-백혈구 세포의 적어도 75%가 필터를 통과하고 수집되지 않는다. 일부 실시형태에서, 거친 필터는 백혈구감소 필터 어셈블리에 물리적으로 부착될 수 있다. 거친 필터는 전형적으로 백혈구감소 필터 어셈블리의 필터보다 큰 공극 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 거친 필터의 공극 직경은 적어도 15 μ m이고, 예시적인 실시형태에서, 15 μ m 내지 60 μ m이다. 일부 실시형태에서, 거친 필터는 접촉 단계 전에 백혈구감소 필터 어셈블리를 사용하지 않고 사용될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키는 방법의 접촉 단계 전에 사용되는 것 외에도, 거친 필터는 접촉 단계 후에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 거친 필터는 T 세포 및/또는 NK 세포 응집체를 포획하는데 사용될 수 있다. 이러한 응집체는 세포가 활성화되고/되거나 바이러스 입자에 의해 가교될 때 형성된다. 일부 실시형태에서, 거친 필터는 전형적으로 필터를 통과하는 호중구를 비롯한 단일 혈액 세포를 제거하는데 사용된다. 일부 실시형태에서, 거친 필터는 도 1E에 나타낸 바와 같이 2차 인큐베이션 후에 사용될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 여과된 세포는 수집되어, 대상체에게 도입되거나 또는 재도입될 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 응집체의 일부인 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 세포는 유리하게는 생체내, 특히 피하 투여에서 보다 효과적인 것으로 여겨진다.

[0083] 또한, 접촉이 미분획 전혈(본 명세서에서 "전혈"로도 지칭됨)에서 수행되는 경우에도 레트로바이러스 입자에 의한 T 세포 및 선택적으로 NK 세포의 효과적인 유전적 변형과 관련하여 위에 논의된 놀라운 발견에 기초하여, 예시적인 실시형태에서 복제 불능 레트로바이러스 입자를 전혈에 직접 첨가하여 반응 혼합물(130C)을 형성함으로써 림프구가 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입되고, 전혈의 세포는 본 명세서에 제공된 선택적 인큐베이션으로 접촉 시간 동안 복제 불능 레트로바이러스 입자와 접촉되는 추가의 단순화된 방법이 본 명세서에 제공된다. 따라서, 이 예시적인 실시형태에서, 이러한 추가의 단순화된 방법은 전형적으로 항응고제를 포함하는 전혈의 림프구가 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 림프구 농축 단계를 포함하지 않는다. 본 명세서의 다른 세포 처리 방법과 마찬가지로 이러한 추가의 단순화된 방법은 전형적으로 폐쇄형 세포 처리 시스템 내에서 수행되며, 림프구가 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 사전활성화를 전혀 포함하지 않거나 최소로 포함할 수 있다. 이러한 추가의 단순화된 방법에서, 전혈의 림프구는 혈액 백에서 직접 레트로바이러스 입자와 접촉될 수 있다. 이러한 방법에서 접촉 단계(130C) 후, 레트로바이러스 입자와 접촉된 림프구는 세척되고, PBMC 농축 절차(135C)를 사용하여 농축될 수 있다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 전형적으로 항응고제를 포함하는 전혈의 세포가 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전에 PBMC 농축 절차 및 림프구-농축 여과는 수행되지 않는다. 그러나, 도 1c의 실시형태에서, 이러한 PBMC 농축 방법은 선택적 인큐베이션(130C)을 이용한 접촉이 수행된 후, 예를 들어, 피콜 구배로 Sepax를 사용하여 수행된다(135C). PBMC 농축 후, 림프구는 선택적으로 세포(140C)와 회합되지 않은 채로 남아 있는 임의의 레트로바이러스 입자로부터, 예를 들어, Sepax를 사용하여 더 세척되고, PBMC를 전달 용액(150C)에 재현탁시켜 수집하여 세포 제형이 형성될 수 있고, 최종 제품은 전형적으로 재주입용 주입 백, 주사용 주사기 또는 보관용 동결보존 바이알(160C)에 들어 있다.

[0084] 재조합 레트로바이러스 입자가 T 세포 및/또는 B 세포와 같은 림프구와 접촉하기 위해 혈액에 첨가되기 전에 혈

액 샘플이 PBMC 농축 절차를 거치지 않는 추가의 예시적인 실시형태(도 1d)에서, PBMC 농축 절차는 접촉 단계(즉, T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구가 반응 혼합물 내의 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 접촉되고, 선택적으로 임의의 접촉을 위해 본 명세서에 제공된 인큐베이션 시간 동안 인큐베이션되는 단계) 후에도 과정의 어떤 단계에서도 사용되지 않는다. 본 명세서의 다른 세포 처리 방법과 마찬가지로 이러한 추가의 단순화된 방법은 전형적으로 폐쇄형 세포 처리 시스템 내에서 수행되며, 레트로바이러스 입자와 접촉하여 형질도입 반응 혼합물(130D)을 형성하기 전에 사전활성화를 전혀 포함하지 않거나 또는 최소로 포함할 수 있으므로, 일부 하위 실시형태에서 강력한 현장 진료 방법을 제공한다. 이러한 추가의 예시적인 실시형태의 예에서, 예를 들어, HemaTrate 필터를 사용하는 하나 이상의 백혈구제거 세포 처리 여과(135D)가 선택적 인큐베이션(130D)을 포함하는 접촉 단계 후에 수행될 수 있다. 백혈구감소 필터를 사용한 백혈구 농축 여과 후, 림프구는 선택적으로, 예를 들어, 2% HSA가 포함된 PBS를 필터를 통해 통과시킴으로써 남아 있는 임의의 레트로바이러스 입자로부터 더 세척되고(140D), 예를 들어, 전달 용액으로 재관류를 사용하여 TNC를 용리하고 재현탁시켜 세포 제형의 백혈구 감소 필터에 잔류하는 림프구가 수집될 수 있고(150D), 최종 제품은 전형적으로 주사용 주사기 또는 대상체에게 전달하기 위한 주입 백 또는 보관용 동결보존 바이알(160D)에 들어 있다.

[0085] 위에 나타난 바와 같이, 도 1에 나타난 방법 실시형태 작업 흐름은 세포 제형에 현탁된 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 제공한다. PBMC 또는 림프구가 여과되고/되거나 특히 변형, 유전적 변형 및/또는 형질도입이 필터의 상부에서 수행되는 방법에서, 본 명세서에 제공되는 바와 같은 전달 용액은 본 명세서에 제공된 바와 같이 대상체에게, 특히 피하로 또는 근육내로 투여하기에 적합한 부피를 갖는 세포 제형을 형성하기 위해 필터로부터 세포를 용리, 재현탁 및 수집하는데 사용될 수 있다. 이러한 전달 용액은 또한 투여를 위해 세포가 재현탁, 용리 및/또는 그렇지 않으면 수집되기 전에 위에 언급된 바와 같은 선택적 세척에 사용될 수 있다. 마지막으로, 추가적인 선택적 단계, 예를 들어, 본 명세서에 보다 상세히 개시된 바와 같이 폐쇄형 시스템 내에서 음성 선택에 의한 B 세포 및/또는 암세포와 같은 원치 않는 세포 유형(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포 이외의 임의의 세포 유형)의 제거는 도 1의 임의의 방법 작업흐름 실시형태에서 수행될 수 있다. EA-로세팅(EA-rosetting)은 B 세포를 본 명세서에 보다 상세히 기재되는 바와 같이 밀도-구배 PBMC 단리 단계에서 PBMC로부터 떨어져 펠릿화될 적혈구에 복합체화(170A, 170B 또는 170C)하기 위해 항체, 예를 들어, 항-CD19를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, CD19에 대한 항체로 코팅된 비드는 유사하게는 B 세포를 밀도-구배 PBMC 단리 단계에서 PBMC로부터 떨어져 펠릿화될 비드에 복합체화(170A, 170B 또는 170C)하기 위하여 사용될 수 있다. 대안적으로, 여과 단계가 사용될 수 있다. 이러한 여과 단계는 비드에 복합체화(180D)된 세포를 제거하거나 또는 본 명세서에 기재된 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 활성화 및/또는 가교된 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 응집된 림프구를 포획하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가적인 세척 단계가 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 도 1에 도시되거나 또는 세포 처리 작업흐름에 대해 설명된 세척 단계 중 임의의 하나 이상이 생략될 수 있다.

[0086] 도 2의 것과 같은 백혈구제거 여과 어셈블리를 사용하는 세포 여과 과정은 PBMC 농축 절차, 특히 밀도 구배 원심분리(Ficoll-Paque)를 포함하는 전통적인 PBMC 농축 절차보다 더 신속하기 때문에, 도 1d 내지 도 1f의 임의의 실시형태는 시간이 많이 소요되는 PBMC 농축 절차가 형질도입 전후에 이러한 방법의 임의의 단계에서 수행되지 않으므로 전혈로부터 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구의 농축된 제제를 얻기 위한 훨씬 더 신속한 방법을 제공한다. 예시적인 실시형태에서, 방법은 폐쇄형 세포 처리 시스템에서 수행되므로, 예를 들어, 현재 방법의 많은 문제와 과도한 시간 제한을 극복하는 현장 진료 CAR-T 방법으로서 매우 신속하고, 비교적 단순한 림프구 처리를 위한 강력한 방법을 제공한다.

[0087] 본 명세서의 실시예에 제공되는 바와 같이, 피하 투여는 정맥내 주입을 통해 도입되는 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 림프구에 비해 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 림프구의 증가된 생착과 함께 놀라운 결과를 보여주었다. 이는 동물에서 보다 효과적인 CAR-의존적 종양 감소 및 제거로 이어졌다. 예시적인 실시형태에서, 용액 중 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)가 도입되고, 예시적인 실시형태에서, 피하 투여, 전달 또는 주사에 의해 대상체 내로 재도입된다. 림프구가 PBMC 농축 절차에서 단리된 후 전형적으로 존재하지 않는 적어도 일부의 다른 혈액 성분을 포함하는 예시적인 실시형태를 포함하여, 도 1에 예시된 것과 같은 레트로바이러스 입자와 반응 혼합물 내의 림프구를 접촉시키는 단계를 포함하는 이러한 실시형태의 일부 예에서, 본 명세서에 제공된 별개의 양태인 생성된 세포 제형은 선택적으로 대상체에게 투여(예를 들어, 재투여)된다. 예시적인 실시형태에서, (도 1d) 림프구가 레트로바이러스 입자와 접촉된 후 PBMC 농축 절차가 사용되지 않는 경우, 여기서 생성된 세포 제형은 피하 또는 근육내 투여를 사용하여 대상체에 다시 재도입될 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 본 명세서에 제공된 일부 양태는 피하 전달에 효과적인 예시적인 실시형태 및 피하 전달에 적합한 추가의 예시적인 실시형태에서 양립 가능한 세포 제형뿐만 아니라 이러한 세포 제형을 제조하기 위한 전달 용액(즉, 부형제)이다. 이론에 제한되지 않고, HemaTrate 필터

와 같이 림프구를 농축 및/또는 세척하기 위해 세포 처리 필터만을 사용하는 과정에서 추가적인 혈액 세포, 특히 호중구가 존재하면, 이러한 다른 혈액 세포 유형, 특히 호중구 또는 응집된 T 세포가 환자의 혈액에 직접 다시 주입되는 경우 존재하는 일부 추가적인 위험을 피하기 위해 피하 전달에 더 순응할 수 있는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 림프감소 필터에서 총 유핵 세포로 재구성된 레트로바이러스의 피하 제형은 림프구 외에, 호중구(또는 보다 일반적으로 과립구)를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 세포 제형은 변형된 T 세포(CAR-T 세포) 및/또는 NK 세포(CAR-NK 세포)와 함께 호중구, B 세포, 단핵구, 적혈구, 호염기구, 호산구 및/또는 대식세포를 포함한다. 피하 또는 근육내 제형 및 투여는 림프구로 재구성된 레트로바이러스의 제형(현탁액)이 세포 응집체를 더 포함할 수 있으며 정맥내 전달로 폐 울혈을 유발할 수 있는 부착 수용체를 발현할 수 있기 때문에 정맥내 제형 및 투여에 비해 유리하다.

[0088] 피하 투여를 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 전형적으로 피부 아래 지방층으로의 투여를 포함한다. 피하 전달을 포함하는 본 명세서의 임의의 실시형태는 근육 내로의 전달인 근육내 전달 또는 종양내 전달 대신일 수 있음이 상정된다는 점에 유의하여야 한다. 일부 실시형태에서, 피하 투여는 대상체의 허벅지 위쪽, 팔뚝 위쪽, 복부 또는 엉덩이 위쪽에서 수행될 수 있다. 피하 투여는 피하 투여에 사용되는 지방층을 관통하여 제형 또는 약물을 대상체의 복막으로 전달하는 복강내 투여와 구별된다.

[0089] 이러한 실시형태에서, 세포가 이러한 피하 투여를 용이하게 하기 위해 더 큰 부피의 부형제(본 명세서에서 피하 주사 또는 전달로도 지칭됨)로 피하 투여에 의해 대상체에 도입 또는 재도입(본 명세서에서 전달이라고도 지칭됨)되는 경우, 하이알루로니데이스가 재조합 레트로바이러스와 접촉되거나 또는 단리된 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구 제제의 순차적 전달의 동일한 위치 또는 그 근처에 피하로 주사된 림프구를 포함하는 단리된 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구 제제에 첨가될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 특히 1ml 또는 2ml 초과(예를 들어, 2ml 내지 1,000ml, 2ml 내지 500ml, 2ml 내지 100ml, 2ml 내지 50ml, 2ml 내지 10ml, 2ml 내지 5ml, 5ml 내지 1,000ml, 5ml 내지 500ml, 5ml 내지 100ml, 5ml 내지 50ml 또는 5ml 내지 10ml)의 레트로바이러스 입자와 접촉된 림프구의 세포 제형, 예를 들어, 변형된 NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, T 세포를 포함하는 세포 제형이 대상체에게 피하로 재도입되는 경우의 실시형태에서, 유효량의 하이알루로니데이스가 사용된다. 이론에 제한되지 않고, 하이알루로니데이스, 예를 들어, 재조합 인간 하이알루로니데이스는 특히 전형적으로 투여되는 2ml 이하의 부피를 넘어 많은 양의 피하 전달을 가능하게 하여 다른 주사된 치료제의 분산 및 흡수를 촉진하고, 잠재적으로 공동-주사된 치료제의 약동학적 프로파일을 향상시킨다(예를 들어, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 인용되어 있는 문헌[Bookbinder LH, et al. "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics." J. Control Release (2006) Aug 28;114(2):230-41. Epub 2006 Jun 7(그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 인용됨); 및 Frost, GI, et al. "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration." Expert Opinion Drug Delivery (2007) Jul;4(4):427-440] 참조). 세포 혼합물에서 유체의 분산은 주사 부위에서 혈관 압박을 최소화하면서 더 큰 부피로 촉진될 수 있다. 하이알루로니데이스(예를 들어, 재조합 인간 하이알루로니데이스 PH20 효소(rHuPH20) 또는 Hylenex® 150 USP 단위)는 할로자임 테라퓨틱스 인코포레이티드(Halozyne Therapeutics, Inc.), 캘리포니아주 샌디에이고 소재)로부터 입수 가능하다. 일부 실시형태에서, 50 내지 5000 단위/ml; 또는 1,000 내지 3,000 단위/ml의 rHuPH20이, 예를 들어, 1ml 내지 50ml, 2ml 내지 25ml, 2ml 내지 20ml, 2ml 내지 10ml, 2ml 내지 5ml, 2ml 내지 4ml, 2.5ml 내지 25ml, 2.5ml 내지 20ml, 2.5ml 내지 10ml, 2.5ml 내지 5ml, 5ml 내지 20ml 또는 5ml 내지 10ml의 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구와 함께 전달될 수 있거나, 또는 하이알루로니데이스 및 림프구의 이러한 전달은 순차적일 수 있다. 예를 들어, 추가적인 하이알루로니데이스 효소는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 인용되어 있는 미국 특허 제7,767,429호에서 찾을 수 있다.

[0090] 도 2는 도 1의 방법에서 백혈구감소 필터로서 사용될 수 있는 유핵 세포를 농축하는 세포 처리 백혈구제거 여과 어셈블리(200)의 비제한적인 예시적인 예를 제공한다. 예시적인 실시형태에서 일회용 여과 어셈블리인 예시적인 백혈구제거 여과 어셈블리(200)는 주입구(225) 및 배출구(226)를 갖는 필터 인클로저(210) 내의 백혈구 제거 배지(예를 들어, 필터 세트) 및 관류와 역관류를 사용하여 잔류 백혈구 또는 유핵 혈액 세포를 농축(concentrate), 농축(enrich), 세척 및 수집하는 능력을 제공하는 백, 밸브 및/또는 채널/튜브의 구성을 포함한다(예를 들어, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 인용되어 있는 EP2602315A1 참조). 예시적인 실시형태에서, 백혈구제거 여과 어셈블리(200)는 상업적으로 입수 가능한 HemaTrate 필터(쿡 리첸텍, 인디애나주 인디애나폴리스 소재)이다. 백혈구제거 여과 어셈블리는 폐쇄형 세포 처리 시스템의 PBMC 농축 절차에서 제거되는 과립구를 포함한 총 유핵 세포(TNC)를 농축하는데 사용될 수 있다. HemaTrate 필터 및 도 2의 예시적인 백혈구감소 필터 어셈블리와 같은 EP2602315A1의 백혈구 제거 배지를 포함하는 필터 어셈블리가 과립구를 제거하지 않기 때문에,

이들은 본 명세서의 PBMC 농축 어셈블리 또는 필터로 간주되지 않으며, 이들을 포함하는 방법은 본 명세서의 PBMC 농축 절차 또는 단계로 간주되지 않는다.

[0091] 도 2의 백혈구감소 필터 어셈블리(200)는 전혈 및 백혈구를 포함하는 혈액 세포 제제로부터 백혈구를 분리시킬 수 있을 뿐만 아니라 백혈구의 신속한 세척 및 농축을 가능하게 하는 다양한 튜브 및 밸브, 전형적으로 바늘이 없는 밸브를 포함하는 일회용 멸균 어셈블리이다. 이러한 예시적인 어셈블리에서, 혈액 백(215), 예를 들어, 전혈, 항응고제 및 레트로바이러스 입자를 포함하는 약 120ml의 형질도입/접촉 반응 혼합물을 포함하는 500ml의 PVC 백은 반응 혼합물을 본 명세서에 상세히 개시된 바와 같은 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 단계에 적용시킨 후 주입관(inlet tubing)(255)의 제1 어셈블리 개구부(217)에서 어셈블리(200)에 연결된다. 레트로바이러스 입자에 회합된 일부 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포 및 이 시점에서 유전적으로 변형될 수 있는 일부를 포함하는 림프구뿐만 아니라 전혈 반응 혼합물과 항응고제의 다른 혈액 세포 및 성분이 제1 주입관(255)의 클램프가 해제될 때 중력에 의해 제1 어셈블리 개구부(217)를 통해 주입관(255)으로 들어간다. 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 주입 밸브(247) 및 수집 밸브(245)를 통과하여 필터 인클로저 주입구(225)를 통해 필터 인클로저(210)에 들어가 필터 인클로저(210) 내의 백혈구제거 IV 필터 세트(예를 들어, SKU J1472A 요르겐센 랩스(Jorgensen Labs))와 접촉한다. 백혈구를 포함하는 유핵 혈액 세포는 필터에 의해 유지되지만, 다른 혈액 성분은 필터를 통과하여 필터 인클로저 배출구(226)에서 배출관(256)으로 들어간 다음, 배출구 밸브(247)를 통해, 예를 들어, 2ℓ의 PVC 폐기물 수집 백일 수 있는 폐기물 수집 백(216)에 수집된다.

[0092] 선택적인 완충액 세척 단계는 주입 밸브(247)를 세척 위치로 전환시킴으로써 수행될 수 있다. 이러한 선택적 세척 단계에서, 완충액 백(219), 예를 들어, 500ml의 식염수 세척 백이 주입관(255)의 제2 어셈블리 개구부(218)에 연결된다. 완충액은 주입관(255)의 클램프가 해제될 때 중력에 의해 제2 어셈블리 개구부(218)를 통해 주입관(255)으로 이동한다. 완충액은 주입 밸브(247) 및 수집 밸브(245)를 통과하여 필터 인클로저 주입구(225)를 통해 필터 인클로저(210)에 들어가고, 필터 인클로저(210) 내의 백혈구감소 필터 세트를 통과하여 필터에 잔류하는 림프구를 행군다. 완충액은 필터 인클로저 배출구(226)에서 배출관(256)으로 이동한 다음, 배출구 밸브(247)를 통해 완충액이 제2 어셈블리 개구부(218)로 들어가기 전 이전 단계에서 필터를 통과한 반응 혼합물 성분을 수집하는데 사용된 것과 동일한 폐기물 수집 백이거나 또는 제1 폐기물 수집 백 대신에 교체된 새로운 폐기물 수집 백일 수 있는 폐기물 수집 백(216)에 수집된다. 선택적 세척 단계는 선택적으로 추가적인 완충액으로 위의 과정을 반복하여 여러 번 수행될 수 있다. 또한, 일부 실시형태에서, 선택적 세척 단계는 용리/전달 용액을 사용하여 적어도 부분적으로 수행된다.

[0093] 혈액 백(215) 내 반응 혼합물의 전체 또는 실질적으로 전체 부피가 필터(210)를 통과하고, 선택적 세척 단계(들)가 선택적으로 수행되면, 필터 인클로저(210) 내의 필터 세트에 잔류하는 림프구를 수집하기 위해 유체를 어셈블리(200)에서 반대 방향으로 이동시키는 역관류 과정이 시작된다. 본 명세서의 백혈구감소 필터 어셈블리의 예시적인 실시형태는 재관류에 적합하다. 예시적인 어셈블리(200)에서 역관류 과정을 시작하기 전에, 배출구 밸브(247)는 재관류 위치로 전환되고, 수집 밸브(245)는 수집 위치로 전환된다. 재관류를 시작하기 위해, 예를 들어, 25ml의 주사기일 수 있는 주사기(266) 내의 일부 실시형태에서 본 명세서에 제공된 바와 같은 추가적인 성분을 가질 수 있는 완충액(예를 들어, PBS)일 수 있고 용리 용액일 수 있는 전달 용액은 주사기(266)를 사용한 주입에 의해 배출관(256)으로 전달된다. 그런 다음, 전달 용액은 필터 인클로저 배출구(226)를 통해 필터 인클로저(210)에 들어가고, 필터 세트에 잔류하는 림프구를 세포 제형으로 현탁시키고, 필터 인클로저(210) 바깥으로 필터 인클로저 주입구(225)를 통해 주입관(255)으로 이동시킨다. 그런 다음, 레트로바이러스 입자와 회합된 일부 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 변형된 림프구를 포함하는 세포 제형(이들 중 일부는 이 시점에서 유전적으로 변형 및/또는 형질도입될 수 있음)은 수집 밸브(245)를 통과한 후, 예를 들어, 25ml의 동결보존 백일 수 있는 세포 샘플 수집 백(265)에 수집된다. 수집된 세포 제형은 선택적으로 피하 투여를 통해서와 같이 대상체에게 투여될 수 있다.

[0094] 자가-구동 CAR 방법 및 조성물

[0095] 소정의 양태에서 T 세포 또는 NK 세포에서의 발현이 T 세포 또는 NK 세포에 의해 발현되고 세포내 활성화 도메인, 예를 들어, CD3 제타 세포내 활성화 도메인 또는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 세포내 활성화 도메인에 기능적으로 연결되는 세포의 결합 쌍 구성원 폴리펩타이드에 대한 항원의 결합에 의해 유도되는 유도성 프로모터의 제어하에 있는 막-결합 림프증식성 요소를 암호화하는 "자가-구동 CAR"로 본 명세서에서 지칭되는 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 결합 쌍 구성원 폴리펩타이드는 CAR이다. 다른 실시형태에서, 이러한 결합 쌍 구성원 폴리펩타이드는 TCR이다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 표적에 대한 CAR-결합에 의해 유도되는 막-결합 림프증식성 요소를 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 유도성

프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공된다. 림프증식성 요소의 발현은 T 세포 또는 NK 세포의 증식을 유도할 수 있다. 소정의 양태에서, 자가-구동 CAR을 포함하는 "자가-구동 CAR-T 세포"로 본 명세서에서 지칭되는 유전적으로 변형된 또는 형질도입된 T 세포가 본 명세서에 제공된다. 자가-구동 CAR-T 세포를 포함하는 임의의 실시형태는 자가-구동 CAR을 포함하는 유전적으로 변형된 또는 형질도입된 NK 세포인 "자가-구동 CAR NK 세포"를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 자가-구동 CAR-T 세포 외에 자가-구동 CAR NK 세포도 존재한다. 다른 실시형태에서, 자가-구동 CAR-T 세포 대신에 자가-구동 CAR NK 세포가 존재한다. 이론에 제한되지 않고, 이러한 자가-구동 CAR 및 자가-구동 CAR-T 세포는 신호전달 캐스케이드로 표적 항원에 대한 CAR의 결합에 반응하여 하나 이상의 림프증식성 요소의 전사를 증가시키는 하나 이상의 유도 신호를 생성한다. 이러한 CAR-자극된 전사는 하류 전사 인자, 예를 들어, 활성화된 T 세포의 핵 인자(nuclear factor of activated T cell: NFAT), 활성화 전사 인자 2(activating transcription factor 2: ATF2), 활성화 단백질 1(AP-1) 및 활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄-인핸서(NF- κ B)를 통해 달성된다. 예시적인 실시형태에서, CAR-자극된 전사는 NFAT를 통해 달성되며, 림프증식성 요소의 발현을 조절하는 유도성 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터이다.

[0096] 따라서, 소정의 양태에서 적어도 하나의 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열 및 예시적인 실시형태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 제2 전사 단위를 포함하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(antigen-specific targeting region: ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 구성적으로 활성이고, 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 제1 전사 단위는 신호 펩티다이스 절단 부위를 포함하는 신호 펩타이드 서열 또는 암호화된 폴리펩타이드가 일단 발현되면 T 세포 또는 NK 세포로부터 분비되거나 또는 그렇지 않으면 방출되는 다른 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하지 않는다.

[0097] 또 다른 자가-구동 CAR 양태에서, T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 역배향의 제1 서열을 포함하고, 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 정배향의 제2 서열을 더 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다. 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 5' 또는 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 거리는, 예를 들어, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 뉴클레오타이드 및 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 또는 3' 뉴클레오타이드 사이의 뉴클레오타이드의 수로서 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 제1 전사 단위 및 하나 이상의 제2 전사 단위는 서로 다르게 전사되고, 이러한 전사 단위는 서로 다르게, 즉, 반대 방향으로 배열된다고 하며, 하나 이상의 제1 및 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단은 하나 이상의 제1 및 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단보다 서로 더 멀리 떨어져 있다. 2개의 전사 단위, 즉, 제1 및 제2의 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터는 본 명세서에서 바이시스트론 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 지칭될 수 있다. 다양한 바이시스트론 폴리뉴클레오타이드가 2개, 3개, 4개 이상의 폴리펩타이드 및/또는 저해성 RNA를 암호화할 수 있다. 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 림프증식성 요소에 작동 가능하게 연결된 유도성 프로모터 및 CAR에 작동 가능하게 연결된 구성적 프로모터 및 리보솜 스킵 서열에 의해 분리되는 선택적 세포 태그를 포함한다. CAR에 대한 표적 항원의 결합은 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 전사 단위의 전사를 촉진하는 유도 신호를 생성한다.

[0098] 또 다른 양태에서, 위에 개시된 폴리뉴클레오타이드로 형질도입된 그리고/또는 유전적으로 변형된 유전적으로 변형된 림프구(들), 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포(들) 및/또는 NK 세포(들)가 본 명세서에 제공된다. 또 다른 실시형태에서, 림프구, 예시적인 실시형태에서, 대상체의 T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입하기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자(들)의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 용도는 위에 개시된 폴리뉴클레오타이드로 T 세포 또는 NK 세포를 형질도입 및/또는 유전적으로 변형시키는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 유전적으로 변형된 림프구를 대상체에게 투여하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 유전적으로 변형된 림프구는 이러한 자가-구동 CAR 부문에서 위에 개시된 폴리뉴클레오타이드로 림프구를 형질도입 및/또는 유전적으로 변형시킴으로써 생성된다. 일부 실시형태에서, 유

전적으로 변형된 림프구의 투여는 정맥내 주사, 피하 투여 또는 근육내 투여에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체에 도입되는 변형된 림프구는 동종이계(allogeneic) 림프구일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 림프구는 상이한 사람으로부터 유래되며, 대상체로부터의 림프구는 변형되지 않는다. 일부 실시형태에서, 림프구를 수확하기 위해 대상체로부터 혈액을 수집하지 않는다. 이러한 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부문에 개시된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 명세서에 제공된 양태, 자가-구동 CAR 폴리뉴클레오타이드로 림프구를 형질도입 및/또는 변형시키는 방법, 키트의 제조에서의 이러한 방법의 사용, 이러한 방법에서 형성된 반응 혼합물, 이러한 방법에 의해 제조된 유전적으로 변형된 림프구 및 이러한 방법에 의해 제조된 유전적으로 변형된 림프구를 투여하는 방법은 "자가-구동 CAR을 포함하는 조성물 및 방법 양태"로서 지칭된다.

[0099] 자가-구동 CAR로 림프구를 형질도입시키기 위한 임의의 조성물 및 방법 양태의 예시적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터를 포함할 수 있다. T 세포 또는 NK 세포에서 폴리뉴클레오타이드를 구성적으로 발현하는 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 전사 단위는 자가-구동 CAR 양태의 예시적인 실시형태에서 CAR을 암호화하는 구성적 발현 단위 또는 작제물이다. 구성적 발현 작제물은 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈과 같은 조절 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 조절 서열은 구성적 프로모터가 도입되는 유형의 세포, 즉, T 세포 및/또는 NK 세포에 특이적이다. 구성적 발현 작제물은 관심 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 천연 또는 비-천연 프로모터를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 림프구, 특히 T 세포 및/또는 NK 세포에서 기능적이다. 예시적인 구성적 프로모터는, 예를 들어, CMV, E1F, VAV, TCR β 베타, MCSV 및 PGK 프로모터를 포함한다. 뉴클레오타이드 서열을 프로모터와 작동 가능하게 연결하는 것은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 일부 실시형태에서, 구성적 발현 작제물은 본 명세서에 기재된 제조할 발현 벡터이거나 또는 이의 일부이다.

[0100] 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 활성이 세포의 대사 활성과 일치하여 변동될 수 있지만, 비교적 일관된 속도로 T 세포 또는 NK 세포에서 표적 서열을 전사할 수 있다. 일부 실시형태에서, 한 번에 구성적 프로모터로부터의 표적 서열의 전사는 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에 표적 서열의 전사의 최대 2-배, 1.5-배, 1.45-배, 1.4-배, 1.35-배, 1.3-배, 1.25-배, 1.2-배, 1.15-배, 1.1-배, 1.05-배 또는 적어도 0.5-배, 0.55-배, 0.6-배, 0.65-배, 0.7-배, 0.75-배, 0.8-배, 0.85-배, 0.9-배 또는 0.95-배 이내로 유지된다. 일부 실시형태에서, 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에 범위의 하한에서 다수의 전사체의 0.5-배, 0.55-배, 0.6-배, 0.65-배, 0.7-배, 0.75-배, 0.8-배, 0.85-배, 0.9-배 및 0.95-배와 범위의 상한에서 다수의 전사체의 1.05-배, 1.1-배, 1.15-배, 1.2-배, 1.25-배, 1.3-배, 1.35-배, 1.4-배, 1.45-배 및 1.5-배 사이의 범위 내에서 유지되는 전사를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 당업계에 공지된 임의의 구성적 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 EF1-a 프로모터, PGK 프로모터, CMV 프로모터, MSCV-U3 프로모터, SV40hCD43 프로모터, VAV 프로모터, TCR베타 프로모터 또는 UBC 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 EF1-a 프로모터 뉴클레오타이드 서열(서열번호 350), PGK 프로모터 뉴클레오타이드 서열(서열번호 351) 또는 이의 기능적 부분 또는 변이체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터는 EF1-a 프로모터 이외의 것을 포함할 수 있다.

[0101] 자가-구동 CAR로 림프구를 형질도입시키기 위한 임의의 조성물 및 방법 양태의 예시적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터는 유도 신호의 존재하에 표적 서열의 전사를 유도 신호의 부재하에 표적 서열의 전사보다 적어도 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 20-배, 25-배, 50-배, 100-배, 250-배, 500-배 또는 1,000-배 이상 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터는 유도 신호가 존재할 때 표적 서열의 전사를 범위의 하한에서 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배, 10-배, 20-배, 25-배, 50-배, 100-배 및 250-배 증가시킬 수 있고, 범위의 상한에서 유도 신호의 부재하에 표적 RNA의 전사보다 10-배, 20-배, 25-배, 50-배, 100-배, 250-배, 500-배 및 1,000-배 이상 증가시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 전사 단위는 자가-구동 CAR 양태의 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소를 암호화할 수 있는 유도성 발현 단위 또는 작제물이다. 유도성 발현 작제물은 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈과 같은 조절 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 조절 서열은 유도성 프로모터가 도입되는 세포 유형, 즉, T 세포 및/또는 NK 세포에 특이적이다. 유도성 발현 작제물은 관심 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 천연 또는 비-천연 프로모터를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 프로모터는 림프구, 특히 T 세포 및/또는 NK 세포에서 기능적이다. 일부 실시형태에서, 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터는 NFAT-반응성, ATF2-반응성, AP-1 반응성 또는 NF- κ B-반응성 프로모터일 수 있다. T 세포 활성화시 유도되며 본 명세서의 실시형태, 특히 자가-구동 CAR 양태에 대한 실시형태에서 유도성 프로모터로서 사용될 수 있

는 다른 프로모터는 IL-2 프로모터, IFN γ 프로모터, CD25 프로모터, CD40L 프로모터, CD69 프로모터, CD107a 프로모터, TNF 프로모터, VLA1 프로모터, LFA1 프로모터 또는 임의의 이러한 프로모터의 기능적 및 유도성 단편을 포함한다. 본 명세서에서 논의되는 바와 같이, 이러한 유도성은 하나 이상의 NFAT-결합 요소의 존재로 인해 발생할 수 있다.

[0102] 자가-구동 CAR로 림프구를 형질도입시키기 위한 임의의 조성물 및 방법 양태의 예시적인 실시형태에서, 제1 서열은 역배향일 수 있고, 제2 서열은 정배향일 수 있다. 제1 및 제2 서열의 배향은 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시킬 수 있는 재조합 레트로바이러스 입자에 존재할 때 폴리뉴클레오타이드의 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 한다. 따라서, 5' 말단이 5' LTR에 더 가깝고 3' 말단이 5' LTR에 더 가까운 서열, 예를 들어, 전사 단위, 프로모터, 코딩 서열, miRNA는 정배향이고, 3' 말단이 5' LTR에 더 가깝고 5' 말단이 5' LTR에 더 가까운 서열은 역배향이다. 서열의 말단과 5' LTR 사이의 거리는 전형적으로, 예를 들어, 서열의 5' 또는 3' 뉴클레오타이드와 및 5' LTR의 3' 뉴클레오타이드 사이의 뉴클레오타이드의 수로서 측정된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같이 역배향의 리보스위치(riboswitch)를 더 포함할 수 있다.

[0103] 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터, ATF2-반응성 프로모터, AP-1 반응성 프로모터 또는 NF- κ B-반응성 프로모터일 수 있다. 전사 인자의 NFAT 패밀리는 NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 및 NFAT5를 포함한다. 이론에 제한되지 않고, 예시적인 실시형태에서, CAR-항원 결합 및 그 결과로 생긴 신호전달에 의해 개시되는 칼슘 신호전달은 NFATc1, NFATc2, NFATc3 및 NFATc4 전사 활성을 활성화하는 것으로 여겨진다. 칼슘의 세포 농도가 증가함에 따라, 이는 칼모듈린에 결합한 다음 포스포타이프 칼시뉴린을 활성화한다. 칼시뉴린에 의한 세포질 NFAT 패밀리 구성원의 탈인산화는 핵 국재화로 이어진다. 일단 핵에 들어가면, NFAT는 bZIP 단백질, 예를 들어, 활성인자 단백질 1(AP-1)에 결합하여 NFAT-반응성 프로모터에 결합하고 이를 활성화하는 복합체를 형성한다.

[0104] 종양 미세환경의 다양한 양태는 산성 pH 및 항-증식 사이토카인의 존재를 포함하여 CAR-T 세포의 증식을 저해한다. 이론에 제한되지 않고, 종양 미세환경에서, 저해성 신호의 국재화된 농도가 높은 곳에서 비-분비적이며 구성적으로 활성인 림프증식성 요소는 CAR-T 세포의 증식을 자극할 수 있다. 자가-구동 CAR에서와 같이 활성 CAR 신호전달이 있는 오직 CAR-T 세포에 의한 이러한 림프증식성 요소의 발현은 항원-결합의 부재하에 CAR-T 세포의 증식을 제한할 수 있다. 또한, 종양의 성공적인 치료 후, 자가-구동 CAR-T 세포는 항원의 부재하에 덜 증식한다.

[0105] 자가-구동 CAR 양태의 예시적인 실시형태에서, 유도성 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터이다. NFAT 전사 인자는 일반적으로 약한 결합을 가지며, 유도성 프로모터에서 다중 NFAT-결합 부위가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터일 수 있고, 하나 이상의 NFAT-결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 NFAT-결합 부위는 NFAT-반응성 프로모터인 것으로 당업계에 공지된 프로모터로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 NFAT-결합 부위는 IL-2 프로모터, IL-4 프로모터 및/또는 IL-8 프로모터로부터 유래될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 NFAT-결합 부위는 IL-2 프로모터로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개의 NFAT-결합 부위, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개 또는 적어도 12개의 NFAT-결합 부위, 또는 1개 내지 12개, 2개 내지 12개, 2개 내지 10개, 3개 내지 10개 또는 4개 내지 8개의 NFAT-결합 부위를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 4개, 6개 또는 9개의 NFAT-결합 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터의 NFAT-결합 부위는 정확한 반복을 피하기 위해 NFAT에 결합하는 능력을 유지하는 기능적 서열 변이체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 및/또는 NFATc5에 반응성이다. 일부 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 서열번호 352의 하나 이상의 NFAT-결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, NFAT-결합 부위의 카피 사이의 간격은 범위의 하한에서 3개의 뉴클레오타이드와 범위의 상한에서 60개의 뉴클레오타이드 사이일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, NFAT-결합 부위의 카피 사이의 간격은 범위의 하한에서 6개의 뉴클레오타이드와 범위의 상한에서 20개의 뉴클레오타이드 사이일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 6개의 NFAT-결합 부위를 포함하고, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 353, 또는 이의 기능적 부분 또는 기능적 변이체를 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0106] 이론에 제한되지 않고, 항원에 대한 CAR의 결합은 CAR의 CD3Z 세포내 도메인을 통한 신호전달 캐스케이드를 유도하여, 칼슘 이온의 주입을 초래하여 NFAT를 탈인산화하는 칼시뉴린 활성화를 유도한 다음, 이는 핵으로 전위

되어 NFAT-반응성 프로모터에 결합하여 전사를 활성화할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, CAR-T 세포는 CD3Z 세포내 도메인을 포함하는 CAR을 포함하고, 림프증식성 요소를 포함하는 하나 이상의 전사 단위에 대한 유도성 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터이다.

[0107] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소를 암호화하는 전사 단위는 유도 신호의 부재하에서도 전사의 수준이 낮은 유도성 또는 활성화 가능한 프로모터를 생성하기 위해 상류 NFAT-결합 부위를 갖는 최소 구성적 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 유도 신호의 부재하에, 이러한 유도성 프로모터로부터의 림프증식성 요소의 낮은 전사 수준은 구성적 프로모터로부터의 CAR의 전사 수준의 1/2, 1/4, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 2/250, 1/500 또는 1/1,000 미만일 수 있다. 일부 실시형태에서, 최소 구성적 프로모터는 최소 IL-2 프로모터, 최소 CMV 프로모터 또는 최소 MHC 프로모터를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 최소 프로모터는 최소 IL-2 프로모터(서열번호 354), 또는 이의 기능적 부분 또는 기능적 변이체일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 NFAT-결합 부위는 최소 IL-2 프로모터의 상류에 있다. 예시적인 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 최소 IL-2 프로모터의 상류에 6개의 NFAT-결합 부위를 포함하고, 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 355, 또는 이의 기능적 부분 또는 기능적 변이체를 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0108] 제1 서열이 역배향이고 제2 서열이 정배향인 위에 개시된 폴리뉴클레오타이드의 유도성 및 구성적 프로모터는 특히 EF1-a, CMV 및 CAG 프로모터와 같은 강한 구성적 프로모터의 존재하에 예측할 수 없는 방식으로 서로 간섭할 수 있다. 프로모터 간섭은 하나 또는 둘 모두의 프로모터로부터 전사를 증가 또는 감소시킬 수 있다. 프로모터 간섭은 또한 유도성 프로모터의 동적 범위를 감소시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 절연체는 발산성 전사 단위 사이에 위치된다. 일부 실시형태에서, 절연체는 유도성 프로모터와 구성적 프로모터 사이에 위치된다. 일부 실시형태에서, 절연체는 당업계에 공지된 닭 HS4 절연체, Kaiso 절연체, SAR/MAR 요소, 키메라 닭 절연체-SAR 요소, CTCF 절연체, 집시 절연체 또는 β -글로빈 절연체 또는 이들의 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절연체는 b-글로빈 폴리A 스페이서 B(서열번호 356), b-글로빈 폴리A 스페이서 A(서열번호 357), 250 cHS4 절연체 v1(서열번호 358), 250 cHS4 절연체 v2(서열번호 359), 650 cHS4 절연체(서열번호 360), 400 cHS4 절연체(서열번호 361), 650 cHS4 절연체 및 b-글로빈 폴리A 스페이서 B(서열번호 362) 또는 b-글로빈 폴리A 스페이서 B 및 650 cHS4 절연체(서열번호 3)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절연체는 정배향일 수 있다. 다른 실시형태에서, 절연체는 역배향일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 정배향으로 암호화된 EF1-a 프로모터는 역배향으로 암호화된 650cHS4 절연체에 의해 역배향으로 암호화된 NFAT-유도성 최소 IL-2 프로모터로부터 분리되고, b-글로빈 폴리A 스페이서 A는 역배향으로 암호화되거나 또는 정배향으로 암호화된다. 당업자는 프로모터 간섭을 방지하거나 또는 감소시키기 위해 프로모터 사이에 절연체를 포함시키는 방법을 이해할 것이다.

[0109] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 역배향으로 림프증식성 요소를 암호화하는 서열의 3' 말단 다음에 폴리아데닐화된 서열로 알려진 다수의 아데노신 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화된 서열은 절연체와 함께 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 폴리아데닐화된 서열은 절연체의 부재하에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화된 서열은 β -글로빈 폴리아데닐화된 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화된 서열은 hGH 폴리아데닐화된 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화된 서열은 합성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화된 서열은 hGH 폴리A(서열번호 316), SPA1(서열번호 317) 또는 SPA2(서열번호 318)로부터 선택되는 서열 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 외인성 스플라이스 부위를 포함하지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 정배향 또는 역배향의 외인성 스플라이스 부위를 포함하지 않는다.

[0110] 자가-구동 CAR로 림프구를 형질도입시키기 위한 임의의 조성물 및 방법 양태에서, 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같은 miRNA 또는 shRNA와 같은 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는, 예를 들어, EF1-a 인트론을 포함하는 인트론 내에서 암호화될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 본 명세서의 저해성 RNA 분자 부문을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 본 명세서에서 확인된 임의의 표적을 표적화할 수 있다.

[0111] 자가-구동 CAR로 림프구를 형질도입시키기 위한 임의의 조성물 및 방법 양태에서, 유도성 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같은 림프증식성 요소의 발현을 유도할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 비-분비되며 구성적으로 활성화된 림프증식성 요소이다.

[0112] 세포 제형 및 투여 방법

[0113] 샘플이 PBMC 단리 또는 과립구 제거 절차를 거치지 않는 실시형태와 같은 일부 실시형태에서, 선택적 전달(즉, 투여) 단계를 포함하여 본 명세서의 변형시키는 방법이 적용되는 혈액 샘플에 존재하는 호중구, 호염기구 및/또

는 호산구의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 75%가 세포 제형에 존재한다. 샘플이 B 세포 제거 절차를 거치지 않는 실시형태와 같은 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계를 포함하여 본 명세서의 변형시키는 방법이 적용되는 혈액 샘플에 존재하는 B 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 75%가 세포 제형에 존재한다. 샘플이 단핵구 제거 절차를 거치지 않는 실시형태와 같은 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계를 포함하여 본 명세서의 변형시키는 방법이 적용되는 혈액 샘플에 존재하는 단핵구의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 75%가 세포 제형에 존재한다.

[0114] 일부 실시형태에서, 그리고 세포 제형이 피하로 또는 근육내로 투여되는 예시적인 실시형태에서, 변형된 림프구를 포함하는 세포 제형의 부피는 전형적으로 주입-전달 방법인 전통적인 CAR-T 방법보다 적으며, 약 1ml, 약 2ml, 약 3ml, 약 4ml, 약 5ml, 약 10ml, 약 15ml, 약 20ml 또는 약 25ml 미만일 수 있다.

[0115] 유리하게는 채혈과 변형된 림프구를 대상체에 재도입하는 사이의 짧은 시간은 일부 실시형태에서, 일부 림프구가 재조합 핵산 벡터, 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되고, 아직 유전적으로 변형되지 않았음을 의미한다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구의 적어도 5%는 유전적으로 변형되지 않는다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구는 유전적으로 변형되고, 염색체의 또는 게놈에 통합된 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 변형된 림프구의 적어도 5%에서 염색체의일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구의 적어도 5%는 형질도입되지 않는다.

[0116] 소정의 실시형태에서 짧은 접촉 시간은 또한 선택적 전달 단계를 포함하여, 재조합 레트로바이러스 입자와의 회합을 통해 또는 레트로바이러스 외피와 원형질막의 융합에 의해 표면에 결합 폴리펩타이드, 융합성 폴리펩타이드 및 일부 실시형태에서, 레트로바이러스 입자의 표면에서 유래한 T 세포 활성화 요소를 갖는 본 명세서의 세포 제형에서 다수의 변형된 림프구를 생성한다. 일부 실시형태에서, 세포 제형에서 변형된 림프구의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 요소, 예를 들어, T 세포 활성화 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 요소는, 예를 들어, T 세포 수용체, CD28, OX40, 4-1BB, ICOS, CD9, CD53, CD63, CD81, CD82를 통해 변형된 림프구의 표면에 결합될 수 있고/있거나, 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 요소는 변형된 림프구의 원형질막에 존재할 수 있다.

[0117] 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 제형은 본 명세서에 제공된 방법에 의해 제공된다. 본 명세서에 제공된 임의의 세포 제형은 자가-구동 CAR-T 세포를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 전달 용액에 변형된, 유전적으로 변형된, 전사된, 형질감염된 및/또는 안정적으로 통합된 자가-구동 CAR-T 세포와 같은 자가-구동 CAR-T 세포의 집단을 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공된다.

[0118] 유리하게는 짧은 시간 동안 림프구가 재조합 핵산 벡터와 접촉되고 변형된 림프구가 본 명세서에 제공된 일부 예시적인 실시형태에서 이러한 접촉 후 생체외에 존재하기 때문에, 이러한 실시형태에서, T 세포 및 NK 세포의 일부 또는 전부는 아직 재조합 핵산을 발현하지 않거나 또는 아직 재조합 핵산을 세포의 게놈에 통합하지 않았으며, 이들을 포함하는 실시형태에서 레트로바이러스 입자의 일부는 대상체에게 다시 도입 또는 재도입되거나 또는 세포 제형을 제조하는데 사용되기 전에 포함하지만 이들로 제한되지 않는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 또는 조성물에 사용되거나 또는 이에 포함되기 전에 표적 세포막과 회합될 수 있지만 융합되지 않을 수 있다. 따라서, 예를 들어, 예시적인 실시형태에서, 피하 투여를 포함하는, 예를 들어, 신속한 현장 진료 방법과 같은 본 명세서에 제공된 이러한 예시적인 방법으로부터 생성될 수 있는 다양한 세포 제형 양태 및 실시형태가 본 명세서에 제공된다. 바로 아래 및 본 명세서의 예시적인 실시형태 부문에 기재된 것들을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 이러한 세포 제형은 재조합 레트로바이러스 벡터와 접촉되고 선택적으로 행구어진 후 세포의 수집시에 존재할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 피하로 대상체에게 투여되는 시점까지 존재할 수 있다.

[0119] 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, 세포 제형 내 세포의 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10% 또는 5% 미만은 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 일부 실시형태에서, 림프구, NK 세포 및/또는 T 세포를 포함하는 세포 제형이 제공되며, 세포 제형 내 림프구, NK 세포 및/또는 예시적인 실시형태에서, T 세포의 적어도 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 변형된 세포이다. 일부 실시형태에서, 림프구의 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이가 범위의 하한에서 변형되고, 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 및 95%가

범위의 상한, 예를 들어, 5% 내지 95%, 10% 내지 90%, 25% 내지 75% 및 25% 내지 95%에서 변형된 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 변형된 림프구의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이는 범위의 하한에서 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않고, 변형된 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 또는 전부, 예를 들어, 5% 내지 95%, 10% 내지 90%, 25% 내지 75% 및 25% 내지 95%에서 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 일부 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 폴리뉴클레오타이드는 접촉 및 인큐베이션 후, 그리고 선택적 투여 시에 형성된 이러한 세포 제형에서 염색체외이거나 또는 게놈에 통합될 수 있다. 이러한 세포 제형의 일부 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 염색체외 폴리뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 실시형태에서, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이는 범위의 하한에서 염색체외 폴리뉴클레오타이드를 갖고, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 또는 전부는 범위의 상한, 예를 들어, 5% 내지 95%, 10% 내지 90%, 25% 내지 75% 및 25% 내지 95%에서 염색체외 폴리뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 실시형태에서, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는, 예를 들어, 본 명세서에 제공된 T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법의 결과로서 이러한 세포 제형에서 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 일부 실시형태에서, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이는 범위의 하한에서 형질도입되지 않고, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 또는 전부는 범위의 상한, 예를 들어, 5% 내지 95%, 10% 내지 90%, 25% 내지 75% 및 25% 내지 95%에서 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다.

[0120] 용액의 피하 전달 및 피하 전달에 적합한 세포 제형을 포함하는 본 명세서에 개시된 소정의 실시형태에서, 피하로 전달될 때와 비교하여 정맥내로 전달되는 경우 더 적은 수의 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구가 생략될 수 있다. 일부 실시형태에서, 피하로 전달될 때와 비교하여 정맥내로 전달될 때 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 더 적은 림프구가 생략한다.

[0121] 일부 실시형태에서, 세포가 재조합 레트로바이러스 벡터와 접촉되고 선택적으로 행구어진 후 세포의 수집 시점에 존재하고 및 대상체에게 투여되는 시점까지 존재하는 이러한 제형을 포함하는 세포 제형은 적어도 2개의 비변형된 림프구, 변형된 림프구 및 유전적으로 변형된 림프구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 세포 제형은 변형된 림프구보다 더 많은 비변형된 림프구를 포함한다. 본 명세서에 제공된 방법에 의해 생성된 이러한 세포 제형의 일부 실시형태에서, 변형된, 유전적으로 변형된, 형질도입된 및/또는 안정적으로 형질감염된 T 세포 및 NK 세포의 백분율은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15% 또는 적어도 20%이다. 본 명세서의 실시예에 예시된 바와 같이, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위해 본 명세서에 제공된 예시적인 방법에서, 반응 혼합물에 첨가되거나 또는 반응 혼합물을 생성하는데 사용되는 전혈에서 림프구 및 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 1% 내지 20% 또는 5% 내지 20% 또는 1% 내지 15% 또는 5% 내지 15% 또는 7% 내지 12% 또는 약 10%가 유전적으로 변형되고/되거나 형질도입되어, 생성된 세포 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 림프구는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉되지 않고 변형되지 않는다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 림프구는 종양 침윤 림프구이다.

[0122] 일부 실시형태에서, 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 소정의 실시형태에서 CAR 또는 전위효소(Transposase)를 발현하지 않고/않거나 세포막과 회합된 CAR을 갖지 않는다. 다른 실시형태에서, 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 재조합 바이러스 역전사효소(transcriptase) 또는 인테그레이스(integrase)를 포함한다. 이론에 제한되지 않고, 세포가 생체외에서 며칠 또는 몇 주 동안 배양되고 많은 세포 분열이 일어나는 전통적인 CAR-T 세포 처리 방법과 달리, T 세포 및/또는 NK 세포가 전달 후 몇 시간 내에 레트로바이러스 입자와 접촉되는 본 명세서

에 제공된 예시적인 방법에서, 레트로바이러스 입자와 융합한 후 T 세포 및/또는 NK 세포로 이동하는 레트로바이러스 입자 내에 존재하는 역전사효소 및 인테그레이스의 일부 또는 대부분은 전달 시점에서 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포에 여전히 존재할 것이다. 일부 실시형태에서, 세포 제형이 본 명세서에 제공되되, 세포 제형 내 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 재조합 mRNA(예를 들어, CAR 및/또는 재조합 전위효소를 암호화함)를 발현하지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 제형이 본 명세서에 제공되되, 이러한 세포 제형 내 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 계능에 안정적으로 통합된 재조합 핵산을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 세포, NK 세포 및/또는 T 세포의 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 또는 90% 초과가 생존 가능하다.

[0123] 추가의 실시형태에서, 본 명세서의 방법에 도입 또는 재도입될 수 있는 변형된 림프구를 포함하는 세포 제형은 단핵구 및/또는 B 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, B 세포의 일부는 이들이 재조합 핵산 벡터, 예를 들어, 네이키드(naked) DNA 벡터 또는 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 접촉될 때 접촉 단계 동안 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 B 세포의 적어도 일부, 그러나 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이하가 변형되며, 이는 선택적으로 투여 또는 재투여될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, B 세포의 일부는 이러한 제형 및 방법에서 변형되지 않는다. 추가의 예시적인 실시형태에서, B 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%는 이러한 제형 및 방법에서 변형되지 않는다. 따라서, 일부 실시형태에서, 변형된 림프구는 비변형된 림프구와 함께 세포 제형에 존재하며, 이는 선택적으로 근육내로 또는 피하로 대상체에게 전달된다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 및 선택적으로 대상체에 도입된 변형된 림프구는 동종이계 림프구일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 림프구는 상이한 사람으로부터 유래되며, 대상체로부터의 림프구는 변형되지 않는다. 일부 실시형태에서, 림프구를 수확하기 위해 대상체로부터 혈액을 수집하지 않는다.

[0124] 예시적인 실시형태에서, 호중구는 세포 제형, 비제한적인 예로서 세포 제형이 투여되는 대상체의 안전성을 고려할 때 정맥내 전달에 너무 높은 농도로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 피하로 전달하기 위한 세포 제형에 존재한다. 이론에 제한되지 않고 그리고 본 명세서의 다른 곳에서 논의되는 바와 같이, 호중구의 정맥내 주사 또는 전달은, 예를 들어, 수혈-관련 급성 폐 손상(transfusion-related acute lung injury: TRALI) 및/또는 급성 호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome: ARDS)의 결과로 폐 손상을 유발할 수 있다. 예를 들어, 이러한 상황은 변형된 림프구를 생산하는 방법이 변형된 림프구를 포함하는 세포 제형이 제조되기 전과 용액이 선택적으로 대상체에게 피하로 전달되기 전 PBMC 농축 단계를 포함하지 않을 때 발생할 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 호중구는, 예를 들어, 선택적 전달 단계의 시점에서 세포 제형에 존재한다. 보다 구체적으로, 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계의 시점을 포함하여 본 명세서의 변형시키는 방법이 적용되는 혈액 샘플에 존재하는 호중구의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 75%가 세포 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계의 시점을 포함하여 세포 제형에 존재하는 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 또는 적어도 75%가 호중구이다. 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계의 시점을 포함하여 세포 제형에 존재하는 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 또는 40% 사이가 범위의 하한에 있는 호중구이고, 세포 제형에 존재하는 세포의 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 75%가 범위의 상한에 있는 호중구이며, 예를 들어, 선택적 전달 단계의 시점을 포함하여 세포 제형에 존재하는 세포의 5% 내지 50%, 20% 내지 50%, 30% 내지 75% 또는 50% 내지 75%가 호중구이다.

[0125] 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계의 시점을 포함하여 본 명세서의 변형시키는 방법이 적용되는 혈액 샘플에 존재하는 단핵구의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 75%가 세포 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 선택적 전달 단계의 시점을 포함하여 본 명세서의 변형시키는 방법이 적용되는 혈액 샘플에 존재하는 B 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 75%가 생성된 세포 제형에 존재한다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 변형된 T 세포 및 NK 세포를 포함하는 PBMC 분획을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%, 또는 1% 내지 95%, 5% 내지 95%, 5% 내지 50% 또는 10% 내지 50%는 유전적으로 변형된다.

[0126] 투여되는 세포 제형 또는 기타 용액의 부피는 본 명세서의 다른 곳에 제공된 바와 같이 투여 경로에 따라 달라진다. 피하로 또는 근육내로 주사된 세포 제형은 전형적으로 주입을 통해 전달되는 것보다 부피가 더 작다. 일

부 실시형태에서, 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 현탁액을 포함하는 세포 제형 또는 기타 용액의 부피는 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml 또는 50ml 이하이다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구의 현탁액을 포함하는 세포 제형 또는 기타 용액의 부피는 범위의 하한에서 0.20ml, 0.25ml, 0.5ml, 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml 또는 25ml 및 범위의 상한에서 0.5ml, 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml 또는 50ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml, 50ml, 75ml, 100ml, 125ml, 250ml, 500ml 또는 1000ml일 수 있다. 따라서, 비제한적인 예로서, 부피는 0.2ml 내지 10ml, 0.5ml 내지 10ml, 0.5 내지 2ml, 1ml 내지 250ml, 1ml 내지 100ml, 10ml 내지 100ml 또는 1ml 내지 10ml일 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 전달 용액에 변형된 림프구를 포함하는 10ml 미만, 1ml 내지 25ml 및 예시적인 실시형태에서, 1ml 내지 3ml, 1ml 내지 5ml 또는 1ml 내지 10ml의 세포 제형이 피하로 또는 근육내로 투여된다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 림프구를 포함하는 용액의 부피는 범위의 하한에서 0.20ml, 0.25ml, 0.5ml, 1ml, 2ml, 3ml, 4ml 및 5ml 내지 범위의 상한에서 0.5ml, 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml 및 50ml일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 70kg의 대상체는 7.0×10^7 개 세포/ml의 T 세포의 1ml의 전달 제형을 피하로 투여함으로써 1.0×10^6 개 T 세포/kg로 투여된다. 일부 실시형태에서, 용액의 부피가 적어도 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml 또는 25ml일 때, 용액은 하이알루로니테이스를 포함할 수 있다. 림프구가 특히 변형된 후 여과되고/되거나 특히 형질도입이 필터 위에서 수행되는 본 명세서의 실시형태에서, 전달 용액은 위에 제공된 것일 수 있는 부피로 필터에서 세포를 재현탁시키고/시키거나 용리하는데 사용될 수 있다. 이와 같이, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 전달 용액은 용리 용액이다.

[0127]

일부 실시형태에서, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구는 종양내 또는 근육내 투여, 및 예시적인 실시형태에서, 용액을 피하로 전달하는데 적합화된 멸균 주사기와 같은 피하 전달 장치에 존재하는 세포 제형을 사용하는 피하 투여에 의해 대상체에 도입 또는 재도입된다. 일부 실시형태에서, 용액(예를 들어, 본 명세서의 세포 제형)을 담고 있으며, 장치의 액체 유지부로부터 용액(예를 들어, 세포 제형)을 피하로 투여하기 위한, 예시적인 실시형태에서, 바늘의 개방 말단인 개방된 또는 개방 가능한 말단을 갖는 피하 전달 장치가 사용된다. 이러한 피하 전달 장치는 피하 전달에 효과적이며, 예시적인 실시형태에서 피하 전달에 적합화되거나, 또는 피하로 주사하기에 효과적이거나 또는 피하로 주사하는데 적합화된다. 용액을 피하로 전달하는데 적합한 피하 전달 장치의 비제한적인 예는, 예를 들어, Insuflon[®](백톤 디킨슨(Becton Dickinson))과 같은 유체 피하 카테터와 같은 피하 카테터 및, 예를 들어, Saf-T-Intima[®](백톤 디킨슨)와 같은, 예를 들어, 날개가 있는 무바늘 폐쇄형 유체 피하 카테터 시스템을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 장치는 펌프, 예를 들어, 주입 펌프 또는 연동 펌프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 본 명세서에 개시된 임의의 바늘, 예를 들어, 피하로 전달하는데 잘 맞거나, 효과적이거나, 이를 위해 조정되거나 또는 이에 적합화되거나, 피하로 전달하는데 효과적인 바늘에 유동적으로 연결된다. 예시적인 실시형태에서, 바늘은 26 내지 30의 게이지를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 피하 전달 장치는 피하 전달 펜이다. 이러한 펜은 피하로 전달하기에 효과적인 주사기를 포함하거나 또는 하우스 내로 봉입된 피하 전달에 적합화될 수 있고, 바늘 보호대를 포함할 수 있다. 이러한 펜의 예는 수마트립탄(sumatriptan)을 전달하는데 사용되는 펜을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 세포 제형은 피하 전달 장치, 예를 들어, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 주사기에 존재하는 변형된 세포인 피부를 관통하는 바늘이 있는 주사기에 존재하며(즉, 피하 주사를 받는 대상체는 주사되는 자가 세포의 공급원임), 일부 실시형태에서, 대상체의 피하 조직의 개방 말단에 위치된다. 예시적인 실시형태에서, 피하 전달 장치(예를 들어, 주사기)는 피하 투여에 적합화된 바늘을 포함할 수 있다. 피하 투여는 전형적으로 16 게이지 바늘을 사용할 수 있는 혈액 주입을 위한 정맥내 카테터와 함께 사용되는 것보다 더 작은 직경을 갖는 바늘을 사용한다. 근육내, 및 예시적인 실시형태에서 피하 전달과 양립 가능한 주사기와 같은 전달 장치는 근육내 또는 피하 전달에 성공적으로 사용될 수 있는 임의의 전달 장치(예를 들어, 주사기)이며, 근육내 또는 피하 전달에 효과적이고 적합화된 전달 장치(예를 들어, 주사기)와 범용 주사기 및 적어도 일부 실시형태에서 근육내 또는 피하 전달을 위해 성공적으로 사용될 수 있는 다른 목적을 위해 특별히 설계된 주사기를 포함한다. 공지된 바와 같이, 피하 주사를 위해, 주사기를 사용하는 예시적인 실시형태에서, 바늘은 45도 내지 90도 각도로 피부를 통해 삽입된다. 따라서, 일부 실시형태는 피부에 45도 내지 90도의 각도로 세포 제형을 피하로 주사하는 것뿐만 아니라 대상체의 피부에 대해 45도 내지 90도의 각도의 바늘을 갖는 주사기 또는 다른 피하 전달 장치 내에 포함된 세포 제형을 포함한다. 근육내, 및 예시적인 실시형태에서 피하 전달에 효과적이거나 또는 근육내 또는 피하로 주사하는데 효과적인 주사기는 전형적으로 근육내 또는 피하 전달에 효과적인 매개변수를 갖는 주사기이고, 예를 들어, 게이지가 20 내지 22이고 길이가 1인치 내지 1.5인치인 바늘이 전형적으로 근육내 전달

에 효과적이며, 게이지가 26 내지 및 30이고 길이가 0.5인치 내지 0.625인치인 바늘이 전형적으로 피하 전달에 효과적이다. 피하 전달에 적합화되거나 또는 피하로 주사하는데 적합화된 주사기는 피하 전달을 위해 특별히 제작된 임의의 주사기이다. 피하 전달에 적합화된 이러한 주사기는 일반적으로 피하로 전달할 수 없는 고도로 농축된 생물학적 약물 제형의 피하 전달을 가능하게 하는 코어 환상 유동(core annular flow)을 사용한다(문헌 [Jayaprakash V et al. Adv Healthc Mater. 2020 Aug 24;e2001022]). 피하 전달에 적합화된 또 다른 주사기는 일반적으로 사용되는 것보다 더 짧은 바늘을 사용한다(문헌 [Pager A, Expert Opin Drug Deliv. 2020 Aug 9;1-14]). 피하 전달에 적합화된 또 다른 주사기는 열 가소성 엘라스토머(Thermo Plastic Elastomer: TPE) 바늘 실드가 있는 29G/5-베벨 바늘을 사용한다(문헌 [Jaber A et al. BMC Neurol. 2008 Oct 10;8:38]). 예시적인 실시형태에서, 바늘의 외부 직경은 0.026" 미만이다. 일부 실시형태에서, 바늘의 외부 직경은 최대 0.01625", 0.01865", 0.01825", 0.02025", 0.02255" 또는 0.02525"이다. 일부 실시형태에서, 바늘은 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26s, 27, 28, 29 또는 30 게이지의 바늘이다. 일부 실시형태에서, 바늘의 길이는 1인치 또는 0.5인치 이하이다. 예시적인 실시형태에서, 바늘은 26, 26s, 27, 28, 29 또는 30 게이지의 바늘이며, 바늘의 길이는 0.5인치 내지 0.625인치이다. 일부 실시형태에서, 바늘은 나비 또는 두피 정맥 바늘로도 알려져 있는 날개 달린 주입 세트일 수 있다. 일부 실시형태에서, 도입 또는 재도입은 피하 카테터를 사용하여 수행될 수 있다.

[0128] 이론에 제한되지 않고, 세포 및 세포 제형의 다른 성분이 신속하게 분산되는 정맥내 전달과 대조적으로, 본 명세서에 제공된 피하 및 근육내 전달 방법은 세포 및 세포 제형의 성분, 예를 들어, 예시적인 실시형태에서, T 세포 및 NK 세포가 비장 또는 림프절과 같은 림프 기관에서 만나는 것과 유사한 특성을 유지하면서 세포 활성화 및 증식을 위한 국부 환경을 조성하면서 제어 방출로서 최대 며칠 동안 대상체 내에서 매우 근접하게 유지되도록 한다. 피하 부위로부터의 항체와 같은 20kDa 이상의 큰 단백질 분자의 흡수는 24시간 내지 72시간에 걸쳐 림프관을 통해 혈액으로 흡수되는 반면, 본 명세서에 제공된 피하 및 근육내 방법을 사용한 국부 주사 부위로부터 T 세포 또는 NK 세포의 제어된 방출은 변형된 세포가 일반적으로 순환기에서 검출될 수 있기 전에 초기 증식 단계 후 주사 부위로부터의 이동을 모두 포함하는 것으로 여겨진다. 일부 실시형태에서, 국부 주사 제어 방출은 1주 내지 2주 후에 순환기에 나타나는 유전적으로 변형된 세포를 초래할 것이다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 순환기로 세포의 제어 방출을 가능하게 하기 위해 국부적으로 응집된 세포를 유지하도록 피하 또는 근육내 전달과 양립 가능하거나 또는 심지어 이에 적합화된다. 일부 실시형태에서, 피하 또는 근육내 전달을 위한 세포 제형 내 세포의 농도는 전형적으로 정맥내로 전달되는 것보다 더 높다. 일부 실시형태에서, 피하 또는 근육내 전달을 위한 세포 제형 내 백혈구의 농도는 약 1.5×10^8 개 세포/ml, 약 5×10^8 개 세포/ml, 약 1×10^9 개 세포/ml 내지 1.2×10^9 개 세포/ml 초과이다.

[0129] 예시적인 실시형태에서, 세포, 예를 들어, 본 명세서에서 논의된 변형된 및 비변형된 림프구의 혼합물은 피하 또는 근육내 투여가 가능하고, 이에 효과적이며, 이에 적합화되도록 전달 용액으로 제형화된다. 사실, 본 명세서에 제공된 상업적 용기 및 키트 양태의 소정의 실시형태는 일부 실시형태에서 냉장 보관되는 멸균 피하 및/또는 근육내 전달 용액의 용기이거나 또는 이를 포함한다. 이러한 전달 용액은 피하 또는 근육내 투여, 및 예시적인 실시형태에서, 피하 투여가 가능하고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이며, 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된다. 이를 달성하기 위해, 이러한 전달 용액 및 생성된 세포 제형은 전형적으로 투여될 세포가 투여될 때까지, 예를 들어, 적어도 1시간 동안 생존할 수 있고, 전형적으로 적어도 4시간 동안 생존할 수 있는 환경을 제공하는 pH 및 이온 조성물을 갖는다. 이러한 pH는 전형적으로 pH 6.5 내지 8.0, 또는 7.0 내지 8.0 또는 7.2 내지 7.6이며, pH를 목표 범위로 유지하는데 유효 농도로 존재하는 인산 완충액 또는 중탄산염과 같은 완충액에 의해 유지될 수 있다. 이러한 제형의 이온 조성물은, 예를 들어, 소듐 클로라이드와 같은 염, 예를 들어, 0.8 내지 1.0 또는 약 0.9 또는 0.9 퍼센트의 염과 식염수 조성물을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 전달 용액은 PBS이거나 또는 이를 포함한다. 본 명세서의 전달 용액 및 생성된 세포 제형의 일부 실시형태에서, Na^+ 의 농도는 110mM 내지 204mM이고, Cl^- 의 농도는 98mM 내지 122mM이고/이거나 K^+ 의 농도는 3mM 내지 6mM이다.

[0130] 예시적인 실시형태에서, 전달 용액 및 세포 제형은 칼슘 및/또는 마그네슘을 포함한다. 칼슘의 농도는, 예를 들어, 0.5mM 내지 2mM일 수 있다. 마그네슘의 농도는, 예를 들어, 0.5mM 내지 2mM일 수 있다. 일부 실시형태에서, 전달 용액은 칼슘 및 마그네슘이 없다.

[0131] 일부 실시형태에서, 전달 용액 및 세포 제형은 인간 혈청 알부민 및/또는 헤파린을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 용액 및 세포 제형은 최대 5%의 HSA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 용액은 2% HSA를 포함하는 PBS이다. 일부 실시형태에서, 전달 용액은 2% HSA를 포함하는 DPBS이다. 일부 실시형태에서, 전달 용액은 0.5%

내지 5%, 1% 내지 5% 또는 1% 내지 2.5% HSA를 포함하거나 포함하지 않는, 30 내지 100 U/ml, 40 내지 100 U/ml, 30 내지 60 U/ml 또는 60 내지 80 U/ml의 헤파린을 포함하는 식염수 용액이다. 반응 혼합물 양태에서 헤파린의 농도에 관한 본 명세서의 논의는 전달 용액 및 세포 제형 양태에 동일하게 적용된다.

[0132] 일부 실시형태에서, 전달 용액은 대상체로의 주사에 적합한 다중 전해질 용액이거나 또는 이를 포함한다. 예를 들어, 전달 용액은 단위 투여 용기와 같은 용기 내의 멸균, 비발열성(nonpyrogenic) 등장성 용액일 수 있거나 또는 이를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 용액은 정맥내 투여뿐만 아니라 피하 및/또는 근육내 투여에 적합하거나 또는 적합화된다. 일부 실시형태에서, 전달 용액은 각 100ml에 526mg의 소듐 클로라이드, USP(NaCl); 502mg의 소듐 글루코네이트($C_6H_{11}NaO_7$); 368mg의 소듐 아세테이트 3수화물, USP($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$); 37 mg의 포타슘 클로라이드, USP(KCl); 및 30mg의 마그네슘 클로라이드, USP($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)를 포함하며 pH가 7.4(6.5 내지 8.0)로 조정된, 대상체에 주사하기 위한 다중 피분석물 용액을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 전달 용액은 항균제를 포함하지 않는다. pH는 소듐 하이드록사이드로 조정된다. 일례로서, 다중 전해질 주사 용액은 다양한 상업적 공급업체로부터 입수 가능한 혈장-LYTE 주사(pH 7.4)일 수 있다.

[0133] 예시적인 실시형태에서, 세포 제형은 절대 냉동되지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 세포 제형은 약 7%, 약 6%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1% 미만의 DMSO(v/v)를 포함한다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 세포 제형은 DMSO를 포함하지 않는다.

[0134] 균일한 단일 세포 현탁액은 정맥내 전달에 이상적이지만, 피하 또는 근육내 투여에는 필요하지 않다. 일부 실시형태에서, 피하 또는 근육내 전달을 위한 세포 제형은 세포 응집을 촉진하는 세포의 데포 제형 또는 에멀션이고, 이러한 데포 세포 제형을 제조하는데 본 명세서에서 사용되는 전달 용액은 데포 특성을 제공하는 부속 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는, 예를 들어, 제형이 대상체에게 투여되기 전, 또는 세포, 예를 들어, 본 명세서에 제공된 바와 같은 변형된 림프구가, 예를 들어, 제형을 생성하기 위한 응집제를 포함하는 전달 용액으로 제형화되는, 예를 들어, 1시간, 45분, 30분, 15분, 10분, 5분 또는 1분 이내에 제형에서 응집될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포 제형 내 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95% 또는 99%가 응집된다. 이러한 응집은, 예를 들어, 개별 세포 대 적어도 하나의 다른 세포와 회합된 세포의 현미경 계수를 사용하거나 또는 평균하여 세포의 수를 계수함으로써 결정될 수 있고, 제형 내 세포는 회합되어 있다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 세포 증식을 수용하기 위해 조직 증식과 함께 제어되거나 또는 지연 방출되도록 설계된다.

[0135] 일부 실시형태에서, 피하 또는 근육내 전달을 위한 본 명세서에 제공된 전달 용액은 데포 제형이다. 데포(즉, 지속 방출) 제형은 전형적으로 수성 또는 유지성 현탁액 또는 용액이다.

[0136] 따라서, 일부 실시형태에서, 전달 용액 또는 세포 제형은 하이드로겔과 같은 인공 세포외 매트릭스를 형성하는 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 데포 전달 용액은 데포 제형을 형성하기 위해 유효량의 알기네이트, 콜라겐 및/또는 텍스트란을 포함한다. 겔-형성 생체적합물질을 만드는데 사용될 수 있고 전달 용액 및 본 명세서에 제공된 세포 제형에 포함될 수 있는 한 종류의 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 및 지방족 폴리에스터와의 공중합체, 예컨대, 폴리(락트산)(PLA), 폴리(D,L-락틱-코-글리콜산)(PLGA), 폴리(-카프로락톤)(PCL) 및 폴리포스파젠으로 구성된다. 사용될 수 있는 다른 중합체는 생리학적 환경에서 자발적인 자가-조립이 가능한 폴리(N-(2-하이드록시프로필 메타크릴아마이드 락테이트) 및 폴리(에틸렌글리콜)(p(HPMAm-lac)-PEG)를 기반으로 한 감열성 삼중블록 공중합체를 포함한다(문헌[Vermonden et. al 2006, Langmuir 22: 10180-10184]).

[0137] 일부 실시형태에서, 본 명세서의 전달 용액 또는 세포 제형에 사용되는 하이드로겔은 하이알루론산(HA)을 포함한다. 이러한 HA는 1-에틸-3-(3-다이메틸 아미노프로필)-1-카보다이이미드 하이드로클로라이드로 변형되어, 우선적으로 N-하이드록시석신이미드의 존재하에 본 명세서에 제공된 변형된 림프구에서 발견된 것들과 같은 단백질, 펩타이드, 중합체 및 링커의 아민기와 반응할 수 있는 카복실산기를 가질 수 있다. 항체, 사이토카인 및 펩타이드는 본 명세서에 제공된 일부 세포 제형 실시형태에서 세포 에멀션으로서 공동-주사하기 위한 하이드로겔을 생성하기 위해 이러한 방법을 사용하여 HA에 화학적으로 접합될 수 있다. 추가적으로, 일부 실시형태에서, 전달 용액 및 세포 제형 내의 HA는 중합체(예를 들어, Healon)이고/이거나 피하 주사 후 물질의 국부 이화작용을 감소시키기 위해 글루타르알데하이드와 같은 작용제와 함께 -OH기를 통해 가교(예를 들어, 레스틸렌(애브비(Abbvie)/엘러간(Allergan))), 예를 들어, 가볍게 가교된다. 본 명세서의 전달 용액 및 세포 제형에 사용되는 HA는 가변성 길이 및 점도가 가변적일 수 있다. 본 명세서의 전달 용액 및 세포 제형에 사용되는 HA는 콘드로이틴 설페이트(예를 들어, 비스코트(Viscoat)) 또는 중합체 또는 계면활성제와 같은 다른 글리코사미노글리칸과 추가로 가교될 수 있다. 당업자는 매트릭스의 다공성 및 가교의 정도가 본 명세서의 변형된 림프구와 같은 세포

가 하이드로겔을 통해 이동할 수 있도록 조절될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 명세서의 세포 제형에서 사용될 때, 하이드로겔 매트릭스와 같은 매트릭스는 매트릭스를 통한 세포의 이동을 허용하도록 구성되거나 또는 적합화될 수 있다. 가교시 하이드로겔의 치환 정도 및 농도는 다공성 팽윤비(porosity swelling ratio) 및 영률(Youngs Modulus)(또는 강성)에 영향을 미칠 것이다. 후속적으로 과산화물의 존재하에 가교될 때, 예를 들어, 1 mg/ml의 티로민을 이용한 HA의 초기 1% 치환은 3% 치환 및 5 mg/ml의 용액보다 높은 다공성 및 낮은 강성을 갖는 하이드로겔을 생성할 것이다. 일부 상황에서, 주사 중 전단력을 줄이고, 세포가 1주 내지 2주에 걸쳐 피하 매트릭스로 증식할 수 있도록 적절한 다공성과 반감기를 보장하도록 전단 계수를 줄이는 것이 바람직하다. 일부 실시형태에서, 전단 계수는 약 2.5kPa, 약 3kPa, 약 3.5 kPa 또는 약 4kPa이다.

[0138] 일부 실시형태에서, 전달 용액 또는 세포 제형은 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21과 같은 사이토카인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 CD3, CD28, OX40, 4-1BB, ICOS, CD9, CD53, CD63, CD81 및/또는 CD82에 결합할 수 있는 항체 또는 폴리펩타이드를 포함한다. EDC-NHS 반응은 이러한 단백질을 HA에 연결하거나 또는 위에 기재된 다른 중간체를 통해 연결하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 사이토카인, 항체 또는 폴리펩타이드는 하이드로겔의 성분에 가교된다. 하이드로겔은 주사 전에 주사기 커넥터와 2개의 주사기를 사용하여 세포 현탁액과 혼합될 수 있다. 다른 실시형태에서, 이러한 사이토카인, 항체 또는 폴리펩타이드는 용액에 존재한다.

[0139] CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및 생존은 CAR이 적절한 맥락에서 이의 동족 항원에 결합할 때 CAR을 통한 신호전달에 의해 촉진된다. 일부 실시형태에서, 항원은 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포에 첨가되거나 또는 이와 함께 공동-투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 가용성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 하이드로겔과 같은 인공 매트릭스의 표면에 고정될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 항원은 세포가 표적 세포가 되도록 세포의 표면 상에 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 표적 세포는 전혈에 다량으로 존재하며, 첨가될 필요 없이 세포 제형에 자연적으로 존재한다. 예를 들어, B 세포는 전혈, 단리된 TNC 및 단리된 PBMC에 존재하며, 세포 제형에 자연적으로 존재할 것이며, 둘 다 B 세포에서 발현되는 비제한적인 예로서 CD19 또는 CD22에 대해 지시된 CAR을 발현하는 T 세포 및/또는 NK 세포에 대한 표적 세포로서 작용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이러한 표적 세포는 전혈에 존재하지 않거나 또는 전혈에 다량으로 존재하지 않으므로, 외인성으로 추가된다. 일부 실시형태에서, 표적 세포는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 대상체, 예컨대, 종양 샘플로부터 단리 또는 농축될 수 있다. 다른 실시형태에서, 대상체로부터의 세포는 적절한 항원을 발현하도록 변형된다. 예시적인 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 항원을 포함하는 단백질의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 항원을 포함하는 단백질의 세포의 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 이를 세포 표면에 고정시키는 막관통 도메인과의 융합일 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 막관통 도메인이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 줄기 도메인과의 융합일 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 줄기 도메인이 사용될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 항원은 CD8 줄기 및 막관통 도메인(서열번호 24)과의 융합일 수 있다.

[0140] 예시적인 실시형태에서, 제1 세포 혼합물 내의 세포, 예를 들어, 대상체로부터 얻어진 세포는 표적 항원을 암호화하는 재조합 핵산 벡터로 변형되고, 이는 본 명세서에서 "인공 항원 제시 세포" 또는 "aAPC"로 지칭될 수 있으며, 동일한 대상체로부터의 별개의 제2 세포 혼합물 내의 세포는 항원에 결합하는 CAR을 발현하도록 변형된다. 표적 항원을 암호화하는 벡터로 변형된 세포가 T 세포인 일부 실시형태에서, 세포는 본 명세서에서 "T-APC"로 불릴 수 있다. 이러한 변형된 T-APC는 변형(예를 들어, 형질도입)을 위한 반응 혼합물이 CD3에 대해 지시된 폴리펩타이드와 같은 T 세포 결합 폴리펩타이드를 포함하는 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 세포 혼합물은 전혈, 단리된 TNC, 단리된 PBMC이다. 예를 들어, 제1 세포 혼합물은 Her2의 세포의 도메인과 PDGF의 막관통 도메인의 융합 단백질을 암호화하는 재조합 핵산 벡터로 변형될 수 있고, 제2 세포 혼합물은 HER2에 대해 지시된 CAR을 암호화하는 재조합 핵산 벡터로 변형될 수 있다. 그런 다음, 세포는 전달 용액으로 제형화되거나, 또는 그렇지 않으면 CAR 효과기 세포-대-표적-세포 비를 다양하게 하여 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제형화 또는 투여시 효과기-대-표적 비는 약 10:1, 약 9:1, 약 8:1, 약 7:1, 약 6:1, 약 5:1, 약 4:1, 약 3:1, 약 2:1, 약 1:1, 약 1:2, 약 1:3, 약 1:5, 약 1:6, 약 1:7, 약 1:8, 약 1:9 또는 약 1:10이다. 예시적인 실시형태에서, 표적 세포는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포와 함께 피하로 또는 근육내로 공동-투여된다.

[0141] CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및 생존은 또한 CAR의 ASTRI 동족 항원에 결합하는 것 이외의 상호작용에 의해 CAR을 가교함으로써 개시된 CAR 신호전달에 의해 촉진될 수 있다. 일부 실

시형태에서, 소분자 또는 단백질은 세포 표면의 CAR을 가교하고 활성화할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 항체는 세포 표면의 CAR을 가교하고 활성화할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 항체는 줄기 또는 스페이서 도메인과 같은 CAR의 세포의 도메인에서 에피토프를 인식한다. 일부 실시형태에서, 에피토프는 에피토프 태그, 예컨대, His5(HHHHH; 서열번호 76), HisX6(HHHHHH; 서열번호 77), c-myc(EQKLISEEDL; 서열번호 75), Flag(DYKDDDDK; 서열번호 74), Strep Tag(WSHPQFEK; 서열번호 78), HA Tag(YPYDVPDYA; 서열번호 73), RYIRS(서열번호 79), Phe-His-His-Thr(서열번호 80) 또는 WEAAAREACCRECCARA(서열번호 81)일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 에피토프는 세포의 수용체에 반응하지 않는 세포내 항원에 공통적이다. 일부 실시형태에서, 에피토프 태그는 HisX6 태그(서열번호 77)이다. 일부 실시형태에서, CAR은 에피토프 태그에 결합하는 가용성 항체를 첨가함으로써 가교되고 활성화될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, CAR은 영양 세포(feeder cell)로도 지칭되는 에피토프 태그에 결합하는 표면상의 scFv와 같은 항체를 발현하는 세포를 첨가함으로써 가교되고 활성화될 수 있다. 일부 실시형태에서, scFv는 GPI 앵커를 통해 세포막과 회합한다. 예시적인 실시형태에서, scFv는 막관통 도메인을 통해 세포막과 회합한다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 줄기 또는 스페이서는 막관통 도메인으로부터 scFv를 분리한다. 일부 실시형태에서, 동일한 영양 세포, 예를 들어, CD8a 줄기 및 막관통 도메인에 부착된 항-HisX6 scFv를 발현하는 영양 세포는 상이한 항원에 결합하지만 줄기에 HisX6 에피토프 태그를 포함하는 ASTR이 있는 CAR을 발현하는 세포와 함께 사용될 수 있다. 공통 에피토프 태그를 포함하는 상이한 CAR을 발현하는 세포와 함께 사용될 수 있는 이러한 영양 세포는 또한 범용 영양 세포(universal feeder cell)로도 지칭된다. 범용 영양 세포를 사용하면, CAR이 에피토프 태그를 포함한다면, 상이한 ASTR을 포함하는 CAR에 대한 동족 항원을 발현하는 상이한 영양 세포를 생성할 필요가 없다. CAR을 발현하는 세포 상의 에피토프 태그는 CAR의 클러스터링 및 증식에 관여하기 위해 범용 영양 세포에 의해 가교될 것이다. 예를 들어, 항-HisX6 범용 세포는 Her2에 결합하고 HisX6 에피토프 태그를 포함하는 CAR을 발현하는 세포와 함께 사용될 수 있고, 또한 Ax1에 결합하고 HisX6 에피토프 태그를 포함하는 CAR을 발현하는 세포와 함께 사용될 수 있다. 영양 세포와 CAR의 조합은 세포가 동족 항원에 관여하기 전에 CAR-T 증식을 가능하게 할 수 있다. 추가적으로 CAR의 ASTR이 미세환경 제한된 경우, 항원에 결합하는 영양 세포를 사용하면 해당 제한적 환경 외부로 증식할 수 있다.

[0142] 또 다른 양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 응집체를 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, T 세포 및/또는 NK 세포는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 변형되고, 각각의 전사 단위는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, 하나 이상의 전사 단위는 용액, 예시적인 실시형태에서, 전달 용액 중 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고; 추가로 응집체는 적어도 4개, 5개, 6개 또는 8개의 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하며, 세포 응집체는 최소 치수에서 적어도 15 μ m이고/이거나, 세포 응집체는 적어도 15 μ m의 직경을 갖는 거친 필터 또는 15 μ m 내지 60 μ m의 직경을 갖는 거친 필터에 의해 유지된다.

[0143] **제조합 레트로바이러스 입자**

[0144] 제조합 레트로바이러스 입자는, 예를 들어, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 T 세포 및/또는 NK 세포를 만들기 위해 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위해 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에 개시되어 있다. 제조합 레트로바이러스 입자는 그 자체가 본 발명의 양태이다. 전형적으로, 본 명세서에 제공된 양태에 포함된 제조합 레트로바이러스 입자는 복제가 불가능하며, 제조합 레트로바이러스 입자가 일단 패키징 세포를 떠나면 복제할 수 없음을 의미한다. 사실, 본 명세서에서 달리 명시되지 않는 한, 레트로바이러스 입자는 복제가 불가능하고, 이러한 레트로바이러스 입자가 레트로바이러스에 고유하지 않은 핵산을 게놈에 포함하는 경우, 이들은 "제조합 레트로바이러스 입자"이다. 예시적인 실시형태에서, 제조합 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다.

[0145] 일부 양태에서, 세포, 전형적으로 림프구 및 예시적인 실시형태 T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입시키는데 사용하기 위한 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다. 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자는 본 명세서의 다른 곳에 논의된 임의의 슈도타이핑 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자는 본 명세서의 다른 곳에 논의된 임의의 활성화 요소를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 다음을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다: A. T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위(여기서, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화함); 및 B. 슈도타이핑 요소 및 이의 표면 상의 T 세포 활성화 요소(여기서, T 세포 활성화 요소는 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되지 않음). 일부 실시형태에서, 본 명세서의 다른 곳에 논의된 T 세포 활성화 요소는 임의의 활성화 요소일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 항-CD3 scFvFc일 수 있다. 또 다른

양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되며, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드와 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 키메라 림프증식성 요소일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 IL-7 수용체 알파 사슬 또는 이들의 단편에 연결된 IL-7을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 IL-2/IL-15 수용체 베타 사슬에 연결된 IL-15를 포함하지 않는다.

[0146] 일부 양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되며, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드와 키메라 림프증식성 요소, 예를 들어, 구성적으로 활성인 키메라 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화한다. 예시적인 실시형태에서, 키메라 림프증식성 요소는 이의 동족 수용체에 연결되거나 또는 이의 동족 수용체의 단편에 연결된 사이토카인을 포함하지 않는다.

[0147] 일부 양태에서, 다음을 포함하는 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다: (i) T 세포 및/또는 NK 세포에 결합하고 이에 대한 재조합 레트로바이러스 입자의 막 융합을 촉진할 수 있는 슈도타이핑 요소; (ii) T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 갖는 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 전사 단위는 항원-특이적 표적화 영역, 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드 및 적어도 하나의 림프증식성 요소를 포함하는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하고; 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드 및/또는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 발현은 생체내 제어 요소에 의해 조절되는, 상기 폴리뉴클레오타이드; 및 (iii) 표면 상의 활성화 요소로서, 활성화 요소는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 재조합 레트로바이러스 입자의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되지 않는, 상기 활성화 요소. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터는 패키징 세포주에서 활성이 아니거나 또는 유도성 방식으로 패키징 세포주에서만 활성이다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 제1 및 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드 중 하나는 키메라 항원 수용체를 가질 수 있고, 다른 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 적어도 하나의 림프증식성 요소를 가질 수 있다.

[0148] 일부 양태에서, 자가-구동 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공된다. 자가-구동 CAR을 포함하는 이러한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자, 및 조성물 및 방법 양태에 관한 세부 사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부문 및 예시적인 실시형태 부문에 보다 상세히 개시되어 있다.

[0149] 예를 들어, 슈도타이핑 요소, 활성화 요소 및 막 결합 사이토카인뿐만 아니라 CAR을 암호화하는 핵산; 림프증식성 요소를 암호화하는 핵산; 리보스위치와 같은 제어 요소를 암호화하는 핵산; 프로모터, 특히 T 세포에서 구성적으로 활성이거나 또는 유도성인 프로모터; 및 저해성 RNA 분자를 암호화하는 핵산과 같지만 이들로 제한되지 않는 복제 불능, 재조합 레트로바이러스 입자의 게놈에 포함된 핵산 서열과 같은 복제 불능, 재조합 레트로바이러스 입자에 포함된 다양한 요소 및 요소의 조합이 본 개시내용 전반에 걸쳐 제공된다. 또한, 재조합 레트로바이러스 입자를 제조하는 방법, 입양 세포 요법을 수행하는 방법 및 T 세포를 형질도입시키는 방법과 같은 본 명세서에 제공된 다양한 양태는 복제 불능, 재조합 레트로바이러스 입자를 제조를 생성하고/하거나 포함한다. 이러한 방법에 의해 생성되고/되거나 이에 포함된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 자체는 단리된 형태일 수 있는 복제 불능, 재조합 레트로바이러스 입자 조성물로서 본 발명의 별개의 양태를 형성한다. 이러한 조성물은 건조된(예를 들어, 동결건조된) 형태일 수 있거나, 또는 레트로바이러스 입자의 보관 및 사용을 위해 당업계에 공지된 적합한 용액 또는 매질일 수 있다.

[0150] 따라서, 비제한적인 예로서, 또 다른 양태에서, 게놈 내에 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 핵산 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 갖는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되며, 일부 예에서, 하나 이상의 RNA 표적에 대해 지시된 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상) 저해성 RNA 분자를 암호화하는 제1 핵산 서열 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체 또는 CAR을 암호화하는 제2 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 저해성 RNA 분자가 아닌 본 명세서에서 이전에 기재된 적어도 하나의 림프증식성 요소를 암호화하는 제3 핵산 서열이 존재한다. 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는, 존재하는 경우, 제1 핵산 서열, 제2 핵산 서열 및/또는 제3 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 본 명세서에 제시된 바와 같은 하나 이상의 리보스위치를 포함한다. 이러한 작제물에서, 하나 이상의 저해성 RNA, CAR 및/또는 저해성 RNA가 아닌 하나 이상의 림프증식성 요소의 발현은 리보스위치에 의해 제어된다. 일부

실시형태에서, 2개 내지 10개의 저해성 RNA 분자가 제1 핵산 서열에 의해 암호화된다. 추가의 실시형태에서, 2개 내지 6개의 저해성 RNA 분자가 제1 핵산 서열에 의해 암호화된다. 예시적인 실시형태에서, 4개의 저해성 RNA 분자가 제1 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 실시형태에서, 제1 핵산 서열은 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화하며, 인트론 내에 위치한다. 소정의 실시형태에서, 인트론은 프로모터의 전부 또는 일부를 포함한다. 프로모터는 Pol I, Pol II 또는 Pol III 프로모터일 수 있다. 일부 예시적인 실시형태에서, 프로모터는 Pol II 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 인트론은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성화된 프로모터에 인접하며 이의 하류에 있다. 일부 실시형태에서, 인트론은 EF1- α 인트론 A이다.

[0151] 본 명세서의 제조합 레트로바이러스 입자 실시형태는 레트로바이러스 입자가 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 게놈을 포함하는 것을 포함한다. 저해성 RNA 분자 이외의 CAR 또는 림프증식성 요소를 암호화하는 다른 핵산과 이러한 핵산의 조합을 포함하여 레트로바이러스 입자의 게놈에 포함될 수 있는 저해성 RNA 분자를 암호화하는 이러한 핵산의 다양한 대안적 실시형태는, 예를 들어, 본 명세서에 제공된 저해성 RNA 부분뿐만 아니라 이러한 실시형태를 조합하는 다양한 다른 단락에 포함된다. 또한, 이러한 복제 불능 제조합 레트로바이러스의 다양한 대안은 본 명세서에 개시된 패키징 세포주 양태 내에 개시된 예시적인 핵산에 의해 확인될 수 있다. 당업자는 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상) 저해성 RNA 분자를 암호화하는 게놈을 포함하는 제조합 레트로바이러스 입자의 이러한 부분의 개시내용이 본 명세서의 다른 부분에서 제공된 저해성 RNA 분자를 암호화하는 이러한 핵산에 대한 다양한 대안과 조합될 수 있음을 인식할 것이다. 또한, 당업자는 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화하는 이러한 핵산이, 예를 들어, 저해성 RNA 분자 및 이러한 분자를 암호화하는 핵산에 초점을 맞춘 본 명세서의 부분에 개시된 바와 같이 본 명세서에 제공된 다양한 다른 기능적 핵산 요소와 조합될 수 있음을 인식할 것이다. 또한, 다른 부분에서 본 명세서에 제공된 특정 저해성 RNA 분자의 다양한 실시형태는 본 개시내용의 제조합 레트로바이러스 입자 양태에서 사용될 수 있다.

[0152] 렌티바이러스 벡터와 같은 제조합 레트로바이러스 벡터의 필수 요소는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 요소는 패키징 세포주 부분 및 W02019/055946에 예시된 바와 같이 실시예 부분에 제공된 복제 불능, 제조합 레트로바이러스 입자를 만들기 위한 세부 사항에 포함된다. 예를 들어, 렌티바이러스 입자는 전형적으로 하나 이상의 패키징 플라스미드를 통해 패키징 세포주로 전달될 수 있는 패키징 요소 REV, GAG 및 POL, 슈도타이핑된 플라스미드를 통해 패키징 세포주에 전달될 수 있는 본 명세서에 제공된 다양한 예인 슈도타이핑 요소 및 전달 플라스미드를 통해 숙주 세포에 전달되는 폴리뉴클레오타이드에 의해 생성되는 게놈을 포함한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 바이러스 LTR 및 psi 패키징 신호를 포함한다. 5' LTR은 Tat 전사 활성화에 의존하지 않는 5' LTR을 포함하는 이중 프로모터에 융합된 키메라 5' LTR일 수 있다. 전달 플라스미드는, 예를 들어, 3' LTR의 U3 영역을 제거함으로써 자가-비활성화될 수 있다. 일부 비제한적인 실시형태에서, Vpu, 예컨대, Src-FLAG-Vpu를 포함하지만 이로 제한되지 않는 Vpu를 포함하는 폴리펩타이드(본 명세서에서 "Vpu 폴리펩타이드"로 지칭됨)는 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 조성물 또는 방법 양태 및 실시형태를 위해 레트로바이러스 입자 내에 패키징 된다. 일부 비제한적인 실시형태에서, Vpx, 예컨대, Src-FLAG-Vpx는 레트로바이러스 입자 내에 패키징 된다. 이론에 제한되지 않고, T 세포의 형질도입시, Vpx는 세포의 세포질로 들어가 SAMHD1의 분해를 촉진하여, 역전사에 사용할 수 있는 세포질 dNTP의 풀(pool)을 증가시킨다. 일부 비제한적인 실시형태에서, Vpu 및 Vpx는 본 명세서에 제공된 레트로바이러스 입자를 포함하는 임의의 조성물 또는 방법 양태 및 실시형태를 위한 레트로바이러스 입자 내에 패키징 된다.

[0153] 본 발명의 다양한 양태에 포함되는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)는 특히 이러한 레트로바이러스 입자로 형질도입된 세포를 대상체에게 도입하는 것을 포함하는 실시형태에 대한 안전성의 이유로 인해 예시적인 실시형태에서 복제가 불가능하다. 복제 불능 레트로바이러스 입자가 세포를 형질도입하는데 사용되는 경우, 레트로바이러스 입자는 형질도입된 세포로부터 생성되지 않는다. 게놈을 포함하는 레트로바이러스 입자가 복제 불능임을 보장하는 레트로바이러스 게놈에 대한 변형이 당업계에 공지되어 있다. 그러나, 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 대한 일부 실시형태에서, 복제 가능 제조합 레트로바이러스 입자가 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0154] 당업자는 본 명세서에서 논의된 기능적 요소가 발현 벡터와 같은 상이한 유형의 벡터를 사용하여 패키징 세포 및/또는 T 세포에 전달될 수 있음을 인식할 것이다. 본 발명의 예시적인 양태는 레트로바이러스 벡터, 및 일부 특히 예시적인 실시형태에서 렌티바이러스 벡터를 사용한다. 다른 적합한 발현 벡터가 본 명세서의 소정의 실시형태를 달성하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 발현 벡터는 바이러스 벡터(예를 들어, 백시니아 바이러스에 기반한 바이러스 벡터; 폴리오바이러스; 아데노바이러스(예를 들어, 문헌[Li *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2543-2549, 1994; Borrás *et al.*, *Gene Ther* 6:515-524, 1999; Li and Davidson, *PNAS* 92:7700-7704,

1995; Sakamoto *et al.*, *H Gene Ther* 5:1088 1097, 1999]; WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655 참조); 아데노-관련 바이러스(예를 들어, 문헌[Ali *et al.*, *Hum Gene Ther* 9:81 86, 1998, Flannery *et al.*, *PNAS* 94:6916 6921, 1997; Bennett *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2857 2863, 1997; Jomary *et al.*, *Gene Ther* 4:683 690, 1997, Rolling *et al.*, *Hum Gene Ther* 10:641 648, 1999; Ali *et al.*, *Hum Mol Genet* 5:591 594, 1996; Srivastava in WO 93/09239, Samulski *et al.*, *J. Vir.* (1989) 63:3822-3828; Mendelson *et al.*, *Virology* (1988) 166:154-165; 및 Flotte *et al.*, *PNAS* (1993) 90: 10613-10617] 참조); SV40; 단순 포진 바이러스; 또는 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 무린 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스 및 라우스 육종 바이러스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 인간 면역결핍 증 바이러스, 골수증식 육종 바이러스 및 유방 종양 바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터), 예를 들어, 감마 레트로바이러스; 또는 인간 면역결핍 증 바이러스(예를 들어, 문헌[Miyoshi *et al.*, *PNAS* 94:10319 23, 1997; Takahashi *et al.*, *J Virol* 73:7812 7816, 1999] 참조); 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0155] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 유전자 전달을 위한 일반적인 도구이다(문헌[Miller, *Nature* (1992) 357:455-460]). 재배열되지 않은 핵산 서열을 광범위한 설치류, 영장류 및 인간 체세포로 전달하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 능력은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 세포에 유전자를 전달하는데 매우 적합하게 만든다. 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 알파레트로바이러스 속, 베타레트로바이러스 속, 감마레트로바이러스 속, 델타레트로바이러스 속, 엡실론레트로바이러스 속, 렌티바이러스 속 또는 스푸마바이러스 속으로부터 유래될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법에 사용하기에 적합한 많은 레트로바이러스가 있다. 예를 들어, 무린 백혈병 바이러스(murine leukemia virus: MLV), 인간 면역결핍 증 바이러스(human immunodeficiency virus: HIV), 말 감염성 빈혈 바이러스(equine infectious anaemia virus: EIAV), 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus: MMTV), 라우스 육종 바이러스(RSV), 후지나미 육종 바이러스(Fujinami sarcoma virus: FuSV), 몰로니 무린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus: Mo-MLV), FBR 무린 골육종 바이러스(FBR murine osteosarcoma virus: FBR MSV), 몰로니 무린 육종 바이러스(Moloney murine sarcoma virus: Mo-MSV), 아벨손 무린 백혈병 바이러스(Abelson murine leukemia virus: A-MLV), 조류 골수세포증 바이러스-29(Avian myelocytomatosis virus-29: MC29) 및 조류 적아구증 바이러스(Avian erythroblastosis virus: AEV)가 사용될 수 있다. 레트로바이러스의 상세한 목록은 Coffin 등(문헌["Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp 758-763])에서 찾을 수 있다. 일부 레트로바이러스의 게놈 구조에 대한 세부사항은 당업계에서 찾을 수 있다. 예로서, HIV에 대한 세부사항은 NCBI Genbank(즉, 게놈 등록 번호 AF033819)에서 찾을 수 있다.

[0156] 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 속으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 HIV, SIV 또는 FIV로부터 유래될 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 속의 인간 면역결핍 증 바이러스(HIV)로부터 유래될 수 있다. 렌티바이러스는 일반적인 레트로바이러스 유전자 gag, pol 및 env 외에 조절 또는 구조적 기능을 갖는 다른 유전자를 포함하는 복잡한 레트로바이러스이다. 더 높은 복잡성으로 인해 렌티바이러스는 잠복 감염 과정에서와 같이 수명 주기를 조절할 수 있다. 전형적인 렌티바이러스는 AIDS의 병인인 인간 면역결핍 증 바이러스(HIV)이다. 생체내에서, HIV는 림프구 및 대식세포와 같이 거의 분열하지 않는 말단 분화 세포를 감염시킬 수 있다.

[0157] 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 Vpx 폴리펩타이드를 함유한다.

[0158] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 Vpu 폴리펩타이드를 포함하고/하거나 함유한다.

[0159] 예시적인 실시형태에서, 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 이러한 레트로바이러스 입자는 전형적으로 바이러스 외피 내에 위치한 캡시드 내에 레트로바이러스 게놈을 포함한다.

[0160] 일부 실시형태에서, DNA-함유 바이러스 입자가 재조합 레트로바이러스 입자 대신에 사용된다. 이러한 바이러스 입자는 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스바이러스, 사이토메갈로바이러스, 포크스바이러스, 조류 포크스 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus: VSV) 또는 신드비스 바이러스일 수 있다. 당업자는 상이한 바이러스 및 레트로바이러스 또는 레트로바이러스 입자와 함께 사용하기 위해 본 명세서에 개시된 방법을 수정하는 방법을 이해할 것이다. DNA 게놈을 포함하는 바이러스 입자가 사

용되는 경우, 당업자는 바이러스 입자의 DNA 게놈의 전부 또는 일부를 이러한 바이러스로 형질도입된 T 세포의 게놈 내로의 통합을 유도하기 위해 이러한 게놈에 기능적 단위가 포함될 수 있음을 이해할 것이다.

- [0161] 일부 실시형태에서, HIV RRE 및 HIV Rev를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 영역은 N-말단 RGG 박스 RNA 결합 모티프 및 ICP27을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 영역으로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, HIV Rev를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 영역은 아데노바이러스 E1B 55-kDa 및 E4 Orf6을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 영역으로 대체될 수 있다.
- [0162] 소정의 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같은 자가-구동 CAR을 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 이러한 실시형태는 게놈이 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 레트로바이러스 입자이되, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고,
- [0163] a. 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고,
- [0164] b. 그리고, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하되, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 활성화 요소를 추가로 디스플레이할 수 있다.
- [0166] 이론에 제한되지 않고, 자가-구동 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 이러한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉 및 형질도입된 T 세포는 T 세포 활성화 요소가 CAR-자극 유도성 프로모터의 유도 신호를 자극할 수 있기 때문에 CAR-자극 유도성 프로모터로부터 전사의 초기 부스트를 받을 수 있다. T 세포 활성화 요소의 결합은 칼슘 이온 주입을 유도하여 NFAT의 탈인산화와 이의 후속 핵 전위 및 NFAT-반응성 프로모터에 대한 결합을 유발할 수 있다. 이러한 CAR-자극 유도성 프로모터로부터 전사 및 번역된 림프증식성 요소는 이러한 세포에 대한 증식의 초기 증가를 제공할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 막-결합 항-CD3 항체일 수 있고, GPI-연결되거나 또는 그렇지 않으면 바이러스에 디스플레이될 수 있다. 일부 실시형태에서, 막-결합 항-CD3 항체는 MuLV 또는 VSV-G와 같은 바이러스 외피 단백질에 융합될 수 있다.
- [0167] 일부 실시형태에서, 단리된 복제 불능 레트로바이러스 입자는 대규모 용기에 담긴 대규모 배취이다. 이러한 대규모 배취는, 예를 들어, 10^6 내지 10^8 TU/㎖의 역가 및 1×10^{10} TU 내지 1×10^{13} TU, 1×10^{11} TU 내지 1×10^{13} TU, 1×10^{12} TU 내지 1×10^{13} TU, 1×10^{10} TU 내지 5×10^{12} TU 또는 1×10^{11} TU 내지 5×10^{12} TU의 총 배취 크기를 가질 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 양태 또는 실시형태에 대한 레트로바이러스 입자는 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 실질적으로 순수하다.
- [0168] **레트로바이러스 게놈 크기**
- [0169] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에서, 재조합 레트로바이러스 게놈, 비제한적인 예에서 렌티바이러스 게놈은 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 수에 제한이 있다. 본 명세서에 제공된 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 암호화 영역에 의해 암호화된 폴리펩타이드는 폴리뉴클레오타이드 암호화 영역이 야생형 폴리펩타이드에 대한 폴리뉴클레오타이드 암호화 영역보다 적은 뉴클레오타이드에 의해 암호화되도록 하는 기능적 활성을 유지하는 절단 또는 다른 결실일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 암호화 영역에 의해 암호화된 폴리펩타이드는 하나의 프로모터로부터 발현될 수 있는 융합 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 하나의 융합 폴리펩타이드와 하나의 프로모터로부터 2개 이상의 기능적 폴리펩타이드를 생성하기 위한 절단 신호를 가질 수 있다. 또한, 초기 생체의 형질도입 후 필요하지 않은 일부 기능은 게놈에 포함되지 않고, 오히려 패키징 세포막을 통해 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에 존재한다. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 내에 패키징되는 기능적 요소를 최소화하기 위해 이러한 다양한 전략이 본 명세서에서 사용된다.
- [0170] 일부 실시형태에서, 패키징될 재조합 레트로바이러스 게놈은 범위의 하한에서 1,000개, 2,000개, 3,000개, 4,000개, 5,000개, 6,000개, 7,000개 및 8,000개의 뉴클레오타이드 내지 범위의 상한에서 2,000개, 3,000개, 4,000개, 5,000개, 6,000개, 7,000개, 8,000개, 9,000개, 10,000개 및 11,000개의 뉴클레오타이드일 수 있다.

패키징될 재조합 레트로바이러스 게놈은 본 명세서에 상세히 개시된 바와 같이 제1 및 제2 조작 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재조합 패키징될 재조합 레트로바이러스 게놈은 5,000개, 6,000개, 7,000개, 8,000개, 9,000개, 10,000개 또는 11,000개 미만의 뉴클레오타이드일 수 있다. 패키징될 수 있는 본 명세서의 다른 곳에 논의된 기능은 레트로바이러스 어셈블리 및 패키징에 필요한 레트로바이러스 서열, 예컨대, 레트로바이러스 rev, gag 및 pol 코딩 영역뿐만 아니라 5' 및 3' LTR 또는 이의 활성 절단 단편, 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소 및 cPPT/CTS 요소를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 또한, 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는, 일부 실시형태에서, 레트로바이러스 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향에 대해 역배향(비제한적인 예로서 WO2019/055946에 예시됨)으로 다음 중 임의의 하나 이상의 또는 모두를 포함할 수 있다: 제1 및 제2 조작 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 영역(이들 중 적어도 하나는 적어도 하나의 림프증식성 요소를 포함함); 키메라 항원 수용체를 포함할 수 있는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드; 제1 및/또는 제2 조작 신호전달 폴리펩타이드의 발현을 조절하는 리보스위치와 같은 제어 요소인 miRNA; 안전 스위치 폴리펩타이드, 인트론, T 세포와 같은 표적 세포에서 활성인 프로모터, 2A 절단 신호 및/또는 IRES.

[0171] **키트 및 상업적 제품**

[0172] 일 양태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 양태 및 실시형태에 따른 레트로바이러스 입자를 포함하는 상업적 용기 또는 패키지와 같은 용기 또는 이를 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다. 비제한적인 예로서, 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 게놈에 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 핵산 서열의 핵산 서열은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 림프증식성 요소 및/또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 핵산 서열의 핵산 서열은 하나 이상의 RNA 표적에 대해 지시된 1개, 2개 또는 그 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화할 수 있다.

[0173] 상업적 용기뿐만 아니라 키트를 포함하는 임의의 양태 또는 실시형태에서 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 용기는 튜브, 바이알, 플레이트의 웰 또는 레트로바이러스 입자의 보관을 위한 기타 용기일 수 있다. 사실, 본 명세서에 제공된 일부 양태는 레트로바이러스 입자를 포함하는 용기를 포함하되, 이러한 레트로바이러스 입자는 본 명세서에 개시된 임의의 핵산(들) 또는 다른 성분(들)을 포함한다. 예시적인 실시형태에서 이러한 용기는 실질적으로 순수한 레트로바이러스 입자로서 때때로 본 명세서에서 약칭으로 지칭되는 실질적으로 순수한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함한다. 전형적으로, 실질적으로 순수한 레트로바이러스 입자의 제제 및/또는 용기는 무균이며, 표준 프로토콜에 따라 마이코플라스마, 동일한 유형의 복제 가능 레트로바이러스 및 외래성 바이러스에 대해 음성이다(예를 들어, 문헌["Viral Vector Characterization: A Look at Analytical Tools"; October 10, 2018](<https://cellculturedish.com/viral-vector-characterization-analytical-tools/>에서 이용 가능함) 참조). 실질적으로 순수한 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 예시적인 방법이 본 명세서의 실시예에 제공된다. 이러한 방법의 경우, 바이러스 상청액은 침출 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용 여과 및 제형화의 조합에 의해 정제되었다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 실질적으로 순수한 레트로바이러스 입자는 품질 관리 테스트 결과에 기초하여 다음 특성을 모두 충족한다:

- [0174] a. 마이코플라스마에 대해 음성;
- [0175] b. 25E U/ml 미만, 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서 10E U/ml 미만의 내독소;
- [0176] c. 검출된 용기에서 의도적으로 동일한 유형(예를 들어, 렌티바이러스)으로 검출된 복제 가능 레트로바이러스의 부재;
- [0177] d. 검출된 외래성 바이러스의 부재;
- [0178] e. 1pg 미만의 숙주 세포 DNA/바이러스 TU, 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서 0.3 pg/TU 미만;
- [0179] f. 재조합 레트로바이러스 입자를 만드는데 사용된 임의의 플라스미드의 100개 미만의 잔류 플라스미드 카피/바이러스 TU, 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서 10개 미만의 카피/바이러스 TU.
- [0180] g. 1ng 미만의 HEK 단백질/TU, 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서 50pg 미만의 HEK 단백질/TU.
- [0181] h. 100 TU/ng 초과 P24 단백질, 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서 10,000 TU/ng 초과 P24 단백질.

- [0182] 레트로바이러스 입자는 전형적으로 고객에게 출시되기 전에 위에 제공된 일부 또는 전부를 포함하는 출시 사양에 대해 테스트된다. 각 입자의 역가(potency)는 ELISA에 의한 p24 바이러스 캡시드 단백질, q-RT PCR에 의한 바이러스 RNA 게놈 카피, qPCR-기반 산물-증강 RT(qPCR-based product-enhanced RT: PERT) 검정에 의한 역전사 효소 활성 측정을 기반으로 정의될 수 있지만, 모두 생물학적 검정에서 기능적 유전자 형질도입 단위(Transducing Unit: TU)를 측정함으로써 감염성 역가로 전환될 수 있다.
- [0183] 생물학적 검정 및 qPCR에 의한 정제된 벌크 레트로바이러스 물질 및 완제품의 감염성 역가의 결정은 레트로바이러스의 감염성 역가의 결정을 위한 예시적인 분석 테스트 방법이다. 지표 세포 은행(indicator cell bank)(예컨대, FIXT)은, 예를 들어, 무혈청 배지에서 성장하고, 웰당 150,000개의 세포로 시딩된 다음, 레트로바이러스 제품의 연속 희석액에 노출될 수 있다. 정제된 레트로바이러스 입자의 희석은, 예를 들어, 1:200 내지 1:1,600으로 지표 세포에서 이루어진다. 시스템 적합성을 위해 참조 표준 바이러스가 추가될 수 있다. 레트로바이러스와 함께 4일 동안 인큐베이션한 후, 세포가 수확되고, DNA가 추출되고 정제된다. 예를 들어, 100개 내지 10,000,000개 카피/웰의 인간 게놈 및 고유한 레트로바이러스 게놈 서열 플라스미드 pDNA 앰플리콘으로부터의 표준 곡선을 사용한 다음 레트로바이러스 입자에 노출된 세포 샘플의 게놈 DNA를 추가한다. 각 PCR 반응에 대해, 레트로바이러스 앰플리콘 및 hRNAeP와 같은 내인성 대조군 둘 다의 Cq 값이 반응당 카피로 다시 외삽된다. 이러한 값에서 통합된 게놈 카피수가 계산된다. 일부 경우에, 293T와 같은 지표 세포는 3배체(triploid)로 특성화되어 있으므로, 세포당 단일 카피 유전자의 3개의 카피가 계산에 이용되어야 한다. 웰당 초기 생존 세포 수를 사용하여, 세포에 첨가된 레트로바이러스의 부피 및 레트로바이러스 입자 ml 당 형질도입 단위(TU)의 게놈 카피수 비가 결정될 수 있다.
- [0184] 역가 테스트는 순도 및 특정 활성을 갖는 방출 사양에 대한 역가 테스트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 최종 제품의 역가 방출 테스트는 바이러스 입자 양(예를 들어, 바이러스 단백질에 대해 ELISA를 수행함으로써, 예를 들어, 렌티바이러스에 대해 적어도 100, 1,000, 2,000 또는 2,500 TU/ng p24의 컷오프로 p24 캡시드 단백질 ELISA를 수행함으로써) 및, 예를 들어, 유전적 변형된 세포에 노출된 리포터 세포주에 의한 인터페론 감마 방출을 측정함으로써 CAR 기능과 비교될 수 있는 형질도입 단위(TU) 수의 측정을 포함한다.
- [0185] 이러한 레트로바이러스 입자의 용기를 포함하는 본 명세서의 임의의 키트 또는 단리된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 양태에서, 0.1개 내지 50개, 0.5개 내지 50개, 0.5개 내지 20개, 0.5개 내지 10개, 1개 내지 25개, 1개 내지 15개, 1개 내지 10개, 1개 내지 5개, 2개 내지 15개, 2개 내지 10개, 2개 내지 7개, 2개 내지 3개, 3개 내지 10개, 3개 내지 15 또는 5개 내지 15개, 또는 적어도 0.1개, 0.5개, 1개, 2개, 2.5개, 3개, 5개, 10개 또는 15개의 레트로바이러스 입자를 사용하여 만든 반응 혼합물에서 MOI(세포당 적용된 형질도입 단위 또는 TU의 수)를 달성하거나 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 또는 15의 MOI를 달성하는데 충분한 재조합 레트로바이러스 입자가 용기에 존재한다. 키트에 제공되는 바이러스 입자의 형질도입 단위는 개별 세포에서 너무 많은 통합체(integrand), 세포 게놈당 평균 3개 미만의 렌티게놈 카피, 보다 바람직하게는 세포당 1개의 카피를 생성하는 것을 방지하는 MOI를 사용할 수 있어야 한다. 키트 및 단리된 레트로바이러스 입자 실시형태의 경우, 이러한 MOI는 1×10^6 개 표적 세포/ ml 라고 가정하여, 예를 들어, 전혈의 경우, 1×10^6 개 PBMC/ ml 의 혈액이라 가정하여 1 ml , 2.5 ml , 5 ml , 10 ml , 20 ml , 25 ml , 50 ml , 100 ml , 250 ml , 500 ml 또는 1,000 ml 의 반응 혼합물을 기반으로 할 수 있다. 따라서, 레트로바이러스 입자의 용기는 1×10^5 내지 1×10^9 , 1×10^5 내지 1×10^8 , 1×10^5 내지 5×10^7 , 1×10^5 내지 1×10^7 , 1×10^5 내지 1×10^6 ; 5×10^5 내지 1×10^9 ; 5×10^5 내지 1×10^8 , 5×10^5 내지 5×10^7 , 5×10^5 내지 1×10^7 , 5×10^5 내지 1×10^6 또는 1×10^7 내지 1×10^9 , 1×10^7 내지 5×10^7 , 1×10^6 내지 1×10^7 내지 1×10^6 내지 5×10^6 의 TU를 포함할 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 용기는 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^6 내지 1×10^8 , 1×10^6 내지 5×10^7 , 1×10^6 내지 5×10^6 또는 5×10^7 내지 1×10^8 의 레트로바이러스 형질도입 단위를 포함할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 이러한 수의 입자는 1 내지 10의 MOI로 1 ml 내지 100 ml 의 혈액을 지원할 것이다. 일부 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 나와 있는 바와 같이, 10 ml , 5 ml , 3 ml 또는 심지어 2.5 ml 의 혈액이 T 세포 및/또는 NK 세포 변형 및 선택적으로 본 명세서에 제공된 피하 및/또는 근육내 투여 방법을 위해 처리될 수 있다. 따라서, 본 방법의 이점은 일부 예시적인 실시형태에서, CAR-T 방법과 같이 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 선행 방법보다 훨씬 더 적은 레트로바이러스 입자 형질도입 단위를 필요로 한다는 점이다.
- [0186] 레트로바이러스 입자를 포함하는 각 용기는, 예를 들어, 0.05 ml 내지 5 ml , 0.05 ml 내지 1 ml , 0.05 ml 내지 0.5 ml , 0.1 ml 내지 5 ml , 0.1 ml 내지 1 ml , 0.1 ml 내지 0.5 ml , 0.1 내지 10 ml , 0.5 내지 10 ml , 0.5 ml 내지 5 ml ,

0.5ml 내지 1ml, 1.0ml 내지 10.0ml, 1.0ml 내지 5.0ml, 10ml 내지 100ml, 1ml 내지 20ml, 1ml 내지 10ml, 1ml 내지 5ml, 1ml 내지 2ml, 2ml 내지 20ml, 2ml 내지 10ml, 2ml 내지 5ml, 0.25ml 내지 10ml, 0.25 내지 5ml 또는 0.25 내지 2ml의 부피를 가질 수 있다.

- [0187] 소정의 실시형태에서, 용기 내 레트로바이러스 입자는 GMP-등급 또는 cGMP-등급 레트로바이러스 입자(즉, 규제 기관에 따라 GMP 또는 현재 GMP 요건하에 생산됨) 또는 GMP 시스템을 사용하여 수행된 레트로바이러스 제조 과정의 제품이다. 이러한 레트로바이러스 입자는 전형적으로, 예를 들어, GMP 품질 시스템 및 GMP 절차 관리를 사용하는 USA FDA(즉, 미국 GMP 또는 미국 cGMP), EMA(즉, EMA GMP 또는 EMA cGMP) 또는 중국의 국가약품감독관리국(National Medical Products Administration: NMPA)(즉, 중국 FDA)(즉, NMPA GMP 또는 NMPA cGMP) 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(good manufacturing practice: GMP)을 사용하여 제조된다. 이러한 제품은 전형적으로 GMP 또는 cGMP 요건을 충족하는 시설에서 생산된다. 이러한 제품은 전형적으로 GMP 또는 cGMP 규정에 따라 엄격한 품질 관리 시스템하에 제조된다. GMP-등급 레트로바이러스 입자는 전형적으로 무균이다. 이는 레트로바이러스 입자, 예를 들어, 실질적으로 순수한 레트로바이러스 입자를, 예를 들어, 0.45 μ m 또는 0.22 μ m 필터로 여과함으로써 달성될 수 있다. GMP-등급 레트로바이러스 입자는 전형적으로 실질적으로 순수하며, 효능, 품질 및 안전성에 대한 대조군 제조 테스트 사양으로 제조된다.
- [0188] 일부 실시형태에서, 용기 내 레트로바이러스 입자를 포함하는 용액은 검출 가능한 소 단백질이 없으며, 이는 "소를 포함하지 않는 것(bovine-free)"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 소 혈청 단백질과 같은 소 단백질은 레트로바이러스 생산 동안 패키징 세포를 배양하는데 사용되지 않기 때문에, 레트로바이러스 입자의 이러한 용액은 소를 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 레트로바이러스 입자의 용액은 GMP-등급이며, 소를 포함하지 않는다. 실질적으로 순수한 핵산 용액은 전형적으로 소를 포함하지 않으며, 소를 포함하지 않는 브로스에서 제조된다.
- [0189] 일부 양태에서, NK 세포 및/또는 예시적인 실시형태에서, T 세포를 변형시키기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 이러한 키트는 폴리뉴클레오타이드, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 실질적으로 순수한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 하나 또는 복수의 용기(여기서, 하나 이상의 제1 전사 단위는 때때로 제1 CAR로 지칭되는 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화함) 및 본 명세서에서 부속 키트 성분으로도 불리는 부속 성분(들)의 하나 이상의 용기를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 레트로바이러스 입자)는, 예를 들어, -70℃ 또는 그 이하(예를 들어, -80℃)에서 냉동 보관될 수 있다.
- [0190] 예시적인 실시형태에서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 제공된 임의의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 양태 및 실시형태에 따른 레트로바이러스 입자의 게놈, 전형적으로 실질적으로 순수한 레트로바이러스 입자에 위치한다. 예시적인 실시형태에서, 키트 내 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 하나 이상의 제1 전사 단위는 본 명세서에 제공된 임의의 실시형태에 따른 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하며, 선택적으로 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화한다.
- [0191] 부속 키트 성분은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0192] a. 본 명세서에 제공된 바와 같이 피하 및/또는 근육내 투여와 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이며, 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0193] b. 본 명세서에 제공된 바와 같은 하이알루로니데이스의 하나 이상의 용기;
- [0194] c. 백 또는 별개의 용기에 항응고제를 포함하는 예시적인 실시형태에서 혈액 수집 백과 같은 하나 이상의 혈액 백, 혈액 처리 완충액 백, 혈액 처리 폐기물 수집 백 및 혈액 처리 세포 샘플 수집 백;
- [0195] d. T 세포 및/또는 NK 세포의 피하 또는 근육내 전달과 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이며, 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된 하나 이상의 멸균 주사기;
- [0196] e. 본 명세서에 상세히 개시된 바와 같은 T 세포 활성화 요소, 예를 들어, 레트로바이러스 입자를 포함하는 용기 또는 별개의 용기에 용액으로 제공되거나 또는 예시적인 실시형태에서 복제 불능 레트로바이러스 입자의 표면과 회합되는 항-CD3;
- [0197] f. 하나 또는 복수의 백혈구제거 여과 어셈블리;

- [0198] g. T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입과 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이며, 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된 용액 또는 배지를 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0199] h. T 세포 및/또는 NK 세포를 행구는 것에 대해 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이며, 그리고/또는 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된 용액 또는 배지를 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0200] i. pH-조절 약리학적 작용제를 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0201] j. T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 전형적으로 실질적으로 순수한 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 명세서의 임의의 실시형태에 따른 재조합 레트로바이러스 입자 내에서 발견됨)를 포함하는 하나 이상의 용기, 여기서 하나 이상의 제2 전사 단위는 예시적인 실시형태에서, 동일한 표적 암세포(예를 들어, B 세포)에서 발견되는 상이한 표적 에피토프, 소정의 실시형태에서 상이한 항원에 대해 지시되는 제2 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화함;
- [0202] k. 핵산(예를 들어, 레트로바이러스 입자)에 의해 암호화된 제1 CAR 및/또는 제2 CAR에 대한 동족 항원을 포함하는 하나 이상의 용기; 및
- [0203] l. 이의 사용을 위한, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 피하로 또는 근육내로 전달하기 위한 그리고/또는 대상체에서 종양 성장 또는 암을 치료하기 위한 다른 키트 성분과 물리적으로 또는 디지털 방식으로 결합된 설명서.
- [0204] 일부 실시형태에서, 혈액 백은 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 또는 500ml 이하의 혈액을 담을 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 적어도 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 또는 500ml의 혈액을 담을 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 범위의 하한에서 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml 및 50ml의 혈액 내지 범위의 상한에서 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 및 500ml의 혈액을 담을 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 범위의 하한에서 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml 및 50ml의 혈액 내지 범위의 상한에서 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 및 500ml의 혈액을 담을 수 있다. 예를 들어, 혈액 백은 1ml 내지 10ml, 5ml 내지 25ml, 10ml 내지 50ml, 25ml 내지 100ml, 50ml 내지 200ml 또는 100ml 내지 500ml의 혈액을 담을 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 헤파린을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 혈액 백은 헤파린을 포함하지 않는다.
- [0205] 일부 실시형태에서, 키트는 단일-팩/사용 키트일 수 있지만, 다른 실시형태에서, 키트는 선택적으로 피하 투여를 통해 CAR을 암호화하는 핵산과 접촉하는 것으로부터 하나 이상의 혈액 샘플을 처리하기 위한 멀티-팩 또는 다중-사용 키트이다. 전형적으로, 키트 내 CAR을 암호화하는 핵산의 용기(및 선택적으로 소정의 실시형태에서 제2 CAR을 암호화하는 핵산의 쌍을 이루는 용기)는 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 방법 및 선택적으로 피하 투여를 수행하는데 사용된다. CAR 및 선택적으로 제2 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 용기(들)는 전형적으로 냉동 보관되고 운송된다. 따라서, 키트는 본 명세서에 제공된 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 방법의 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 10회, 12회, 20회, 24회, 50회 및 100회의 수행을 위한 CAR을 암호화하는 핵산의 충분한 용기(예를 들어, 바이알)(및 선택적으로 소정의 실시형태에서 제2 CAR을 암호화하는 쌍을 이루는 용기)를 포함할 수 있고, 따라서 CAR을 암호화하는 핵산(예를 들어, 레트로바이러스 입자)의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 10개, 12개, 20개, 24개, 50개 및 100개의 용기(예를 들어, 바이알)를 포함할 수 있으며, 유사하게는 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 20, 24, 50 및 100의 팩, 수행, 투여 또는 X 키트로 간주된다. 유사하게는, 키트 내 부속 성분은 키트를 사용하여 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키고 선택적으로 피하 투여하는 방법의 유사한 수의 수행을 위해 제공된다.
- [0206] 이러한 키트에 존재하는 경우, 하나 이상의 백혈구제거 여과 어셈블리는 전형적으로 하나 또는 복수의 백혈구감소 필터 또는 백혈구감소 필터 세트를 포함하며, 각각은 전형적으로 도 2의 예시적인 어셈블리에 의해 예시된 바와 같이 일회용 폐쇄형 혈액 처리 시스템에 사용하도록 적합화된 필터 인클로저뿐만 아니라, 이에 연결되거나 연결되도록 적합화된 복수의 연결된 멸균 튜브 및 이에 연결되거나 또는 연결되도록 적합화된 복수의 밸브 내에 있다. 전형적으로, 키트 내 CAR을 암호화하는 핵산의 각 용기에 대해 하나의 백혈구제거 여과 어셈블리가 있다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 20-팩의 키트는 CAR을 암호화하는 핵산의 20개의 바이알 및 백혈구제거 여과 어셈블리 20개를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 키트는 핵산 및 하나 이상의 백혈구제거 여과 어셈블리를 포함하는 하나 또는 복수의 용기를 포함한다. 이러한 키트는 선택적으로, 예를 들어, 주입, 또는 예시적인 실시형태에서 근육내 및/또는 추가의 예시적인 실시형태에서 피하 전달을 포함하는 임의의 경로를 통해 대상

체에게 투여하기 위해 사용되도록 의도될 수 있다. 따라서, 이러한 키트는 선택적으로 이러한 투여 경로와 함께 사용되도록 의도된 다른 부속 성분을 포함한다. 피하 또는 근육내 전달 용액의 하나 이상의 용기는 본 명세서에서 보다 상세하게 논의되고, 전형적으로 무균이며, 100ml 내지 5ℓ, 1ml 내지 1ℓ, 1ml 내지 500ml, 1ml 내지 250ml, 1ml 내지 200ml, 1ml 내지 100ml, 1ml 내지 10ml 또는 1ml 내지 5ml; 5ml 내지 1ℓ, 5ml 내지 500ml, 5ml 내지 250ml, 5ml 내지 100ml, 5ml 내지 10ml 또는 대략 5ml의 총 조합 부피를 포함하거나 또는 용기당 별도로 포함할 수 있다. 일부 예시적인 실시형태에서, 키트는 피하 전달 용액의 복수의 용기를 포함하며, 각 용기의 부피는 10ml 내지 200ml, 10ml 내지 100ml, 1ml 내지 20ml, 1ml 내지 10ml, 1ml 내지 5ml, 1ml 내지 2ml, 2ml 내지 20ml, 2ml 내지 10ml, 2ml 내지 5ml, 0.25ml 내지 10ml, 0.25 내지 5ml 또는 0.25 내지 2ml이다. 예시적인 실시형태에서, 키트 내에 CAR을 암호화하는 핵산의 각 용기에 대해 전달 용액의 용기가 하나씩 있다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 20-팩의 키트는 CAR을 암호화하는 핵산의 20개의 바이알 및 멸균 전달 용액의 20개의 용기를 포함한다.

- [0207] 소정의 키트 양태에서, 제1 CAR을 암호화하는 핵산 및 선택적으로 제2 CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 용기(들) 중 하나 또는 둘 모두가 본 명세서에 제공된 임의의 자가-구동 CAR 실시형태에 따른 핵산인 실시형태가 본 명세서에 제공된다. 이러한 실시형태에서, 키트의 부속 성분은 다음 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다:
- [0208] a. 본 명세서에 제공된 바와 같은 정맥내 투여에 적합화되고, 이와 양립하고/하거나 이에 효과적인 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기; 및
- [0209] b. 이의 사용을 위한, 예를 들어, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 정맥내로 전달하기 위한 다른 키트 성분과 물리적으로 또는 디지털 방식으로 결합된 설명서.
- [0210] 소정의 양태에서, T 세포 또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되되, 키트의 사용은 T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 함께 접촉시키는 것을 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면 상의 슈도타이핑 요소 및 표면 상의 T 세포 활성화 요소를 포함하며, 상기 접촉은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 T 세포 또는 NK 세포의 형질도입을 촉진하여 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포를 생성한다.
- [0211] 일부 양태에서, T 세포 또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도를 포함하는 양태가 본 명세서에 제공된다. 폴리뉴클레오타이드 및 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 관련된 세부사항은 본 명세서 및 예시적인 실시형태 부문에 더 상세히 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포는 대상체로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 막-결합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 접촉은 범위의 하한에서 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 내지 범위의 상한에서 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 21시간 및 24시간, 예를 들어, 1시간 내지 12시간 동안 수행될 수 있다. 키트의 제조에 사용하기 위한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 본 명세서의 다른 곳에 논의된 임의의 양태, 실시형태 또는 하위 실시형태를 포함할 수 있다.
- [0212] 또한, 또 다른 양태에서, 단리된 패키징 세포, 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 패키징 세포 및/또는 패키징 세포주 양태에 따른 패키징 세포주로부터 단리된 패키징 세포를 포함하는 상업적 용기 또는 패키지와 같은 용기 또는 이를 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 제공된 방법에 사용되는 완충액 또는 시약과 같은 추가적인 시약을 포함하는 추가적인 용기를 포함한다. 또한, 소정의 양태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 따라 T 세포 또는 NK 세포를 변형, 예시적인 실시형태에서 유전적으로 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 임의의 양태에서 임의의 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공된다. 또한 소정의 양태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 따라 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 키트의 제조에서의 임의의 양태에서 본 명세서에 제공된 임의의 패키징 세포 또는 패키징 세포주의 용도가 본 명세서에 제공된다.
- [0213] 또 다른 양태에서, 활성 성분으로서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 암 또는 종양 성장을 치료 또는 예방하기 위한 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 암 또는 종양 성장을 치료 또는 예방하기 위한 주입 조성물 또는 다른 세포 제형이 본 명세서에 제공된다. 약제학적 조성물 또는 주입 조성물의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 상기 또는 본 명세서의 다른 곳에 논의된 임의의 양태, 실시형태 또는 하위 실시형태를 포함할 수 있다.

- [0214] 추가 혈액 성분에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법
- [0215] 소정의 양태에서, 반응 혼합물에서 림프구를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 혈액 또는 이의 성분 및/또는 항응고제를 포함하는 반응 혼합물에서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포, 소정의 예시적인 실시형태에서, 휴지기 T 세포 및/또는 휴지기 NK 세포를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 이러한 반응 혼합물 자체는 본 명세서에 제공된 별개의 양태를 나타낸다. 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 림프구 및 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자, T 세포 활성화 요소 및 아래 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물이 적어도 10%의 전혈을 포함하기 때문에 존재하는 것으로 나와 있는 하나 이상의 추가적인 혈액 성분 세트를 포함하되, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 전형적으로 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드 및 예시적인 실시형태에서, 표면 상의 슈도타이핑 요소를 포함한다. 이러한 방법에서, 접촉(및 접촉 조건하에 인큐베이션)은 림프구와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키되, 재조합 레트로바이러스 입자는 림프구를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시킨다. 이러한 방법의 반응 혼합물 또는 반응 혼합물 양태는 적어도 10%의 미분획 전혈(예를 들어, 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 전혈) 및 선택적으로 유효량의 항응고제를 포함하거나; 또는 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 적어도 하나의 추가적인 혈액 또는 혈액 제제 성분을 더 포함하고, 예를 들어, 반응 혼합물은 유효량의 항응고제 및 PBMC가 아닌 하나 이상의 혈액 제제 성분을 포함한다. 전혈의 백분율은 미분획 전혈을 사용하여 만든 반응 혼합물의 부피의 백분율이다. 예를 들어, 반응 혼합물이 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 전혈, 예시적인 실시형태에서, 미분획 전혈에 첨가함으로써 형성되는 경우, 반응 혼합물에서 전혈의 백분율은 반응 혼합물의 총 부피에 100을 곱한 전혈의 부피이다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 PBMC가 아닌 혈액 또는 혈액 제제 성분은 다음 추가적인 성분 중 하나 이상(예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개) 또는 전부이다:
- [0216] a) 적혈구, 여기서 적혈구는 반응 혼합물의 부피의 1% 내지 60%를 포함함;
- [0217] b) 호중구, 여기서 호중구는 반응 혼합물 내 백혈구의 적어도 10%를 포함하거나 또는 반응 혼합물은 T 세포만큼 많은 호중구를 적어도 10% 포함함;
- [0218] c) 호염기구, 여기서 호염기구는 반응 혼합물 내 백혈구의 적어도 0.05%를 포함함;
- [0219] d) 호산구, 여기서 반응 혼합물은 반응 혼합물 내 백혈구의 적어도 0.1%를 포함함;
- [0220] e) 혈장, 여기서 혈장은 반응 혼합물의 부피의 적어도 1%를 포함함; 및
- [0221] f) 항응고제,
- [0222] (위의 이러한 혈액 또는 혈액 제제 성분 a-f는 본 명세서에서 ("주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분")으로 지칭됨).
- [0223] 전혈의 백분율을 포함하는 본 명세서에 개시된 임의의 양태에서, 백분율은 부피를 기준으로 한다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물의 부피의 적어도 25%는 전혈일 수 있다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 100 mL의 이러한 반응 혼합물 중 적어도 25mL는 전혈일 것이다.
- [0224] 이러한 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 적어도 10%의 전혈, 소정의 예시적인 실시형태에서, 적어도 25%, 50%, 75%, 90% 또는 95%의 전혈 또는 예를 들어, 25% 내지 95%의 전혈을 포함하기 때문에, 본 명세서의 소정의 실시형태에서 발견되는 PBMC가 아닌 하나 이상의 추가적인 혈액 성분이 반응 혼합물의 소정의 예시적인 실시형태(본 명세서에 제공된 관련 용도, 세포 제형, 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포, 또는 T 세포 및/또는 NK 세포 양태를 변형시키는 방법을 포함)에 존재한다. 이러한 예시적인 실시형태에서, 이러한 반응 혼합물은 전혈을 항응고제와 조합하고(예를 들어, 전혈을 항응고제를 포함하는 혈액 수집 튜브에 수집함으로써), 재조합 레트로바이러스의 용액을 항응고제와 함께 혈액에 첨가함으로써 형성된다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 본 명세서, 예를 들어, 예시적인 실시형태 부문에 보다 상세히 기재되는 바와 같은 항응고제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 전혈은 제대혈이 아니거나 또는 이를 포함하지 않는다.
- [0225] 이러한 양태의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 반응 혼합물을 형성하기 위해 다른 반응 혼합물 성분에 직접 첨가되는 일부 부피의 전혈에 의해 형성된다. 따라서, 이러한 실시형태에서, 반응 혼합물은 전형적으로 PBMC 농축 절차를 포함하지 않는 방법에 의해 형성된다. 따라서, 전형적으로 이러한 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 위의 a) 내지 f)에 열거된 추가적인 성분을 포함한다. 또한, 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 실질적으로 전혈 또는 전혈을 포함하기 때문에, 반응 혼합물은 위의 a) 내지 e)에 열거된 모든 추가적인 성분을 포함한다.

"실질적으로 전혈"은 개체(들)로부터 단리되고, PBMC 농축 절차를 거치지 않고 다른 용액으로 50% 미만으로 희석된 혈액이다. 예를 들어, 이러한 희석은 항응고제의 첨가뿐만 아니라 레트로바이러스 입자를 포함하는 일정량의 유체의 첨가로 인한 것일 수 있다. 전혈에서 림프구를 형질도입시키는 것과 관련된 방법 및 조성물에 대한 추가의 반응 혼합물 실시형태가 본 명세서에 제공된다.

[0226] 또 다른 양태에서, 림프구, 예시적인 실시형태에서 대상체의 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 전혈에서 림프구를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 위의 방법을 포함한다. 또 다른 양태에서, 변형된 림프구를 대상체에게 투여하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 변형된 림프구는 전혈에서 림프구를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 위의 방법에 의해 생성된다. 전혈에서 림프구를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 이러한 방법, 키트의 제조에서의 이러한 방법의 용도, 이러한 방법에서 형성된 반응 혼합물, 이러한 방법에 의해 제조된 세포 제형, 이러한 방법에 의해 제조된 변형된 림프구 및 이러한 방법에 의해 제조된 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구를 투여하는 방법을 포함하는 본 명세서에 제공된 양태는 본 명세서에서 "전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태"로 지칭된다. 이러한 양태에 대한 예시적인 실시형태는 전혈에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 것을 포함하지만, 이러한 양태는 또한 위의 추가적인 성분 a 내지 f 중 하나 이상이 PBMC 농축 절차 후 전형적인 것보다 더 높은 농도로 형질도입 반응 혼합물에 존재하는 다른 실시형태를 포함한다는 것에 유의하여야 한다. 예를 들어, 이러한 양태는 혈액을 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 성분과 PBMC 제제에 존재하지 않는 추가적인 혈액 성분으로 분리하는 필터를 사용하여 분획될 때 발생한다(예를 들어, 백혈구감소 필터를 사용 및 그로 인한 필터에 의해 잔류하는 T 세포 및 NK 세포를 포함하는 세포-분획에서의 호중구의 존재).

[0227] 전혈 또는 하나 이상의 위의 성분을 포함하는 반응 혼합물 및 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 이러한 방법 양태의 다양한 요소 또는 단계가 본 명세서, 예를 들어, 이 부분 및 예시적인 실시형태 부문에 제공되며, 이러한 방법은 본 명세서에서 추가로 논의되는 바와 같이 본 명세서 전반에 걸쳐 제공되는 실시형태를 포함한다. 당업자는 본 명세서의 어느 곳에서나 본 명세서에 제공된 많은 실시형태가 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태의 임의의 양태에 적용될 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 이 부분 및/또는 예시적인 실시형태 부문에서 제공된, 예를 들어, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 임의의 조성물 및 방법 양태의 실시형태는 하나 이상의 폴리펩타이드 림프증식성 요소, 저해성 RNA, CAR, 슈도타이핑 요소, 리보스위치, 활성화 요소, 막-결합 사이토카인, miRNA, 코작-유형 서열, WPRE 요소, 삼중 종결 코돈 및/또는 본 명세서에 개시된 다른 요소를 포함하는 것을 포함하여 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 중 임의의 실시형태를 포함할 수 있으며, 패키징 세포를 사용하여 레트로바이러스 입자를 생성하는 본 명세서의 방법과 조합될 수 있다. 또한, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물(예를 들어, 반응 혼합물) 및 방법 양태의 임의의 양태 및 실시형태는 본 명세서에 제공된 자가-구동 CAR을 포함하는 임의의 조성물 및 방법 양태와 조합될 수 있다. 자가-구동 CAR을 포함하는 임의의 조성물 및 방법 양태에 관한 세부사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부문 및 예시적인 실시형태 부문에 보다 상세하게 개시된다.

[0228] 소정의 예시적인 실시형태에서, 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 전혈에서 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구를 변형, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키기 위한 이러한 방법은 시험관내 또는 생체외에서 수행될 수 있다.

[0229] 항응고제는 본 명세서에 제공된 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물(예를 들어, 반응 혼합물) 및 방법 양태의 소정의 실시형태에 대한 반응 혼합물에 포함된다. 일부 예시적인 실시형태에서, 혈액은, 예를 들어, 당업계에 공지된 표준 혈액 수집 프로토콜을 사용하여 수집 용기(예를 들어, 튜브 또는 백)에 존재하는 항-응고제로 수집된다. 본 명세서에 제공된 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태에서 사용될 수 있는 항응고제는 트롬빈 혈액 응고 캐스케이드를 차단 또는 제한하는 화합물 또는 생물체제를 포함한다. 항응고제는 다음을 포함한다: 금속 킬레이트제, 바람직하게는 칼슘 이온 킬레이트제, 예컨대, 시트르산, 소듐 시트레이트, 포스페이트, 아데닌 및 당당류 또는 다당류, 예를 들어, 텍스트로스, 옥살레이트 및 EDTA와 같은 하나 이상의 성분을 포함하는 시트레이트 용액을 포함하는 시트레이트(예를 들어, 유리 시트레이트 이온을 함유); 헤파린 및 헤파린 유사체, 예컨대, 미분획 헤파린, 저분자량 헤파린 및 다른 합성 당류; 및 바이타민 K 길항제, 예컨대, 쿠마린. 예시적인 시트레이트 조성물은 산 시트레이트 텍스트로스(acid citrate dextrose: ACD)(항응고제 시트레이트 텍스트로스 용액 A 및 용액 B로도 불림(문헌[United States Pharmacopeia 26, 2002, pp 158])); 및 시트레이트 포스페이트 텍스트로스(citrate phosphate dextrose: CPD) 용액을 포함하며, 이는 또한 당업계에 공지된 바와 같이 CPD-A1로도 제조될 수 있다. 따라서, 항응고제 조성물은 또한 포스페이트 이온 또는 일염기성

포스페이트 이온, 아데닌 및 당당류 또는 다당류를 포함할 수 있다.

[0230] 이러한 항응고제는 당업계에 공지된 바와 같이 혈액의 응고를 방지하는데 유효한 농도(즉, 유효량) 또는, 예를 들어, 2배, 1.5배, 1.25배, 1.2배, 1.1배 또는 9/10, 4/5, 7/10, 3/5, 1/2, 2/5, 3/10, 1/5 또는 1/10의 유효 농도인 농도로 반응 혼합물에 존재할 수 있다. 다양한 항응고제의 유효 농도는 공지되어 있으며, 물리적으로 관찰될 수 있는 혈액 응고를 방지하는 능력에 대해 다양한 농도를 분석함으로써 경험적으로 쉽게 결정될 수 있다. 응고를 측정하는 수많은 응고계(coagulometer)가 상업적으로 이용 가능하며, 다양한 센서 기술, 예를 들어, QCM 센서가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Yao et al., "Blood Coagulation Testing Smartphone Platform Using Quartz Crystal Microbalance Dissipation Method," Sensors (Basel). 2018 Sep; 18(9): 3073] 참조). 유효 농도는 항응고제가 튜브 또는 백에 사용될 혈액 부피로 희석된 후 상업적으로 입수 가능한 튜브 또는 백에 임의의 상업적으로 입수 가능한 항응고제의 농도를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 내 산 시트레이트 텍스트로스(ACD)의 농도는 상업적으로 입수 가능한 ACD 혈액 수집 튜브 또는 백 내 ACD의 0.1X 내지 5X 또는 0.25X 내지 2.5X, 0.5X 내지 2X, 0.75X 내지 1.5X, 0.8X 내지 1.2X, 0.9X 내지 1.1X, 약 1X 또는 1X 농도일 수 있다. 예를 들어, 표준 과정에서, 혈액은 9부의 혈액 및 1부의 항응고제의 비로 3.2%(109mM) 소듐 시트레이트(109mM)를 포함하는 튜브 또는 백에 수집될 수 있다. 따라서, 1부 내지 2부의 레트로바이러스 입자 용액을 1부의 항응고제 대 9부의 혈액의 이 혼합물에 첨가함으로써 제조된 반응 혼합물의 소정의 예시적인 실시형태에서, 시트레이트 농도는, 예를 들어, 25% 내지 0.4% 또는 0.30% 내지 0.35%일 수 있다. 예시적인 표준 혈액 수집 실시형태에서, 15ml의 ACD 용액 A가 100ml의 혈액을 수집하기 위한 혈액 백에 존재한다. 혈액의 추가 전 ACD는 시트르산(무수) 7.3 g/l (0.73%), 소듐 시트레이트(2수화물) 22.0 g/l (2.2%) 및 텍스트로스(1수화물) 24.5 g/l [USP](2.4%)를 포함한다. 100ml의 혈액을 ACD를 포함하는 백에 추가한 후, 예를 들어, 5ml 내지 20ml의 레트로바이러스 입자의 부피가 첨가된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 반응 혼합물 내 ACD 성분의 농도는 0.05% 내지 0.1% 또는 0.06% 내지 0.08% 시트르산(무수), 0.17% 내지 0.27% 또는 0.20% 내지 0.24% 소듐 시트레이트(2수화물), 0.2% 내지 0.3% 또는 0.20% 내지 0.28% 또는 0.22% 내지 0.26% 텍스트로스(1수화물)일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 소듐 시트레이트는 반응 혼합물에서 0.001M 내지 0.02M의 농도로 사용된다.

[0231] 일부 실시형태에서, 헤파린은, 예를 들어, 상업적으로 입수 가능한 헤파린 혈액 수집 튜브의 헤파린 농도의 0.1X 내지 5X 또는 0.25X 내지 2.5X, 0.5X 내지 2X, 0.75X 내지 1.5X, 0.8X 내지 1.2X, 0.9X 내지 1.1X, 약 1X 또는 1X 농도로 반응 혼합물에 존재한다. 헤파린은 5,000 달톤 내지 30,000 달톤 범위의 분자량을 갖는 글리코사미노글리칸 항응고제이다. 일부 실시형태에서, 헤파린은 약 1.5 내지 45, 5 내지 30, 10 내지 20 또는 15 USP 단위/ml 반응 혼합물의 농도로 사용된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 반응 혼합물에서 EDTA, 예를 들어, K₂EDTA에 대한 유효 농도는 0.15 mg/ml 내지 5 mg/ml, 1 mg/ml 내지 3 mg/ml 1.5 mg/ml 내지 2.2 mg/ml 또는 1 mg/ml 내지 2 mg/ml 또는 약 1.5 mg/ml 혈액일 수 있다. 본 명세서에 제공된 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태에서, 반응 혼합물은 조합된 유효 용량이 반응 혼합물 및/또는 반응 혼합물 자체의 형성 전에 혈액의 응고를 방지하는 2종 이상의 항응고제를 포함할 수 있다.

[0232] 일부 실시형태에서, 항응고제는 혈액이 수집될 때 혈액의 응고가 적어도 부분적으로 그리고 적어도 접촉 단계 및 그 후의 선택적 인큐베이션 기간을 통해 저해되도록 생체의 형질도입을 위해 대상체로부터 혈액이 수집되기 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 예를 들어, 산 시트레이트 텍스트로스는 80 mg/kg/일 내지 5 mg/kg/일(mg은 시트르산의 mg을 지칭하고, kg은 치료될 포유동물에 적용됨)로 대상체에게 투여될 수 있다. 헤파린은, 예를 들어, 5 유닛/kg/hr 내지 30 유닛/kg/hr의 용량으로 전달될 수 있다.

[0233] 명세서의 소정의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 본 명세서에 제공된 바와 같이 PBMC가 아닌 혈액 또는 혈액 제제 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분의 비제한적인 예시적인 농도는 다음 단락에서 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 반응 혼합물을 사용하는 방법으로부터 생성된 세포 제형은 이러한 추가적인 성분을 일부 실시형태에서 반응 혼합물에 대해 아래에 제공되는 다른 세포에 대해 동일한 비 또는 백분율로 포함할 것임이 이해될 것이다.

[0234] 적혈구와 관련하여, 일부 실시형태에서, 적혈구는 일부 실시형태에서 전형적인 PBMC 단리 후보보다 더 많은 T 세포에 대한 상대량으로 본 명세서의 반응 혼합물 및 세포 제형에 존재하고, 일부 실시형태에서, 적혈구는 범위의 하한에서 반응 혼합물의 부피의 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 35% 또는 40% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물의 부피의 25%, 50%, 60% 또는 75% 사이를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 적혈구는 반응 혼합물의 1% 내지 60%, 10% 내지 60%, 20% 내지 60%, 30% 내지 60%, 40% 내지 60%, 40% 내지 50%, 42% 내지 48%,

44% 내지 46%, 약 45% 또는 45%를 포함한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물 또는 세포 제형에서 T 세포보다 더 많은 적혈구가 존재한다.

[0235] 호중구와 관련하여, 일부 실시형태에서, 호중구는 일부 실시형태에서 전형적인 PBMC 단리 후보보다 더 많은 T 세포에 대한 상대량으로 본 명세서에 제공된 반응 혼합물 및 세포 제형에 존재하고, 일부 실시형태에서, 호중구는 범위의 하한에서 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 25%, 35% 또는 40% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 25%, 50%, 60%, 70%, 75% 및 80% 사이, 예를 들어, 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 25% 내지 70% 또는 30% 내지 60% 또는 40% 내지 60%를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물 및 본 명세서의 세포 제형에서 T 세포 및/또는 NK 세포보다 더 많은 호중구가 존재한다.

[0236] 호산구와 관련하여, 호산구는 일부 실시형태에서 전형적인 PBMC 단리 후보보다 더 많은 T 세포에 대한 상대량으로 반응 혼합물 또는 세포 제형에 존재하고, 일부 실시형태에서, 호산구는 범위의 하한에서 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.2%, 1.4%, 1.6% 및 1.8% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 2.0%, 2.2%, 2.4%, 2.6%, 2.8%, 3.0%, 3.5%, 4%, 5%, 6%, 8% 및 10% 사이를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 호산구는 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 0.05% 내지 10.0%, 0.1% 내지 9%, 0.2% 내지 8%, 0.2% 내지 6%, 0.5% 내지 4%, 0.8% 내지 4% 또는 1% 내지 4%를 포함한다.

[0237] 호염기구와 관련하여, 일부 실시형태에서, 호염기구는 일부 실시형태에서 전형적인 PBMC 단리 후보보다 더 많은 T 세포에 대한 상대량으로 반응 혼합물 또는 세포 제형에 존재하고, 일부 실시형태에서, 호염기구는 범위의 하한에서 반응 혼합물의 백혈구의 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.45% 및 0.5% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물의 백혈구의 0.8%, 0.9%, 1.0%, 1.1%, 1.2%, 1.5% 및 2.0% 사이를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 호염기구는 반응 혼합물의 백혈구의 0.05% 내지 1.4%, 0.1% 내지 1.4%, 0.2% 내지 1.4%, 0.3% 내지 1.4%, 0.4% 내지 1.4%, 0.5% 내지 1.4%, 0.5% 내지 1.2%, 0.5% 내지 1.1% 또는 0.5% 내지 1.0%를 포함한다.

[0238] 혈장과 관련하여, 일부 실시형태에서, 혈장 성분은 반응 혼합물 또는 세포 제형에 존재하며, 일부 실시형태에서, 혈장은 범위의 하한에서 반응 혼합물의 부피의 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 35% 또는 45% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물의 부피의 25%, 50%, 60%, 70% 및 80% 사이를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 혈장은 반응 혼합물의 0.1% 내지 80%, 1% 내지 80%, 5% 내지 80%, 10% 내지 80%, 30% 내지 80%, 40% 내지 80%, 45% 내지 70%, 50% 내지 60%, 52% 내지 58%, 54% 내지 56%, 약 55% 또는 55%를 포함한다.

[0239] 혈소판과 관련하여, 일부 실시형태에서, 혈소판은 일부 실시형태에서 전형적인 PBMC 단리 후보보다 더 많은 T 세포에 대한 상대량으로 반응 혼합물 또는 세포 제형에 존재하고, 일부 실시형태에서, 혈소판은 범위의 하한에서 반응 혼합물의 1×10^5 개, 1×10^6 개, 1×10^7 개 또는 1×10^8 개 혈소판/ml 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물의 1×10^9 개, 1×10^{10} 개, 1×10^{11} 개, 1×10^{12} 개, 2×10^{13} 개 또는 2×10^{14} 개 혈소판/ml 사이를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 혈소판은 일부 실시형태에서 전형적인 PBMC 단리 후보보다 더 많은 T 세포에 대한 상대량으로 그리고 일부 실시형태에서 반응 혼합물 또는 세포 제형의 백혈구의 0.1% 내지 9%, 0.1% 내지 1% 또는 1% 내지 9% 사이로, 반응 혼합물의 1×10^5 개 내지 1×10^{12} 개 혈소판, 1×10^6 개 내지 1×10^{11} 개 혈소판, 1×10^7 개 내지 1×10^{10} 개 혈소판, 1×10^8 개 내지 1×10^9 개 혈소판/ml 또는 1×10^8 개 내지 5×10^8 개 혈소판/ml를 포함한다.

[0240] 림프구를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키는 방법을 위한 단계 및 반응 혼합물

[0241] 소정의 양태에서, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포 및 소정의 예시적인 실시형태에서, 휴지기 T 세포 및/또는 휴지기 NK 세포(전형적으로, 이의 집단)와 같은 림프구를 형질도입, 형질감염, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 이는 림프구를 예시적인 실시형태에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터(전형적으로, 이의 집단)와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 접촉(및 접촉 조건하에 인큐베이션)은 막 회합, 막 융합 또는 세포내이입, 및 선택적으로 재조합 핵산 벡터에 의한 휴지기 T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입 또는 형질감염을 촉진하여 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성한다. 본 명세서에 제공된 많은 양태 및 실시형태가 재조합 레트로바이러스 입자의 관점에서 논의되었지만, 본 명세서에 제공된 것을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 많은 상이한 재조합 핵산 벡터가 이러한 방법 및 조성물에 사용되고/되거나 포함될 수 있음을 당업자는 인식할 것이라는 점은 주목할 만하다. 예시적인 실시형태에서, 재조합 핵산 벡터는 복제 불능 재조합 레트로바이러스

입자이며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 전형적으로 표면 상의 슈도타이핑 요소의 일부일 수 있는 융합성 요소 및 결합 요소를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 사전-활성화는 필요하지 않으며, 본 명세서에 제공된 임의의 활성화 요소일 수 있는 활성화 요소는 접촉이 일어나는 반응 혼합물에 존재한다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에 존재한다. 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 항-CD3 scFv 또는 항-CD3 scFvFc와 같은 항-CD3이다.

[0242] 본 명세서에 제공된 많은 방법 양태는 다음 단계를 포함한다: 1) 대상체로부터 혈액을 수집하는 선택적 단계; 2) 반응 혼합물에서, 수집되는 혈액으로부터 유래할 수 있는 NK 세포 및/또는 예시적인 실시형태에서, T 세포와 같은 세포를 재조합 벡터(전형적으로, 이의 많은 카피), 예시적인 실시형태에서, CAR 및/또는 림프증식성 요소를 암호화하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 접촉시키는 단계(여기서, 접촉은 선택적 인큐베이션을 포함할 수 있음); 3) 전형적으로, 반응 혼합물에서 세포로부터 결합되지 않은 재조합 벡터를 세척하는 단계; 4) 전형적으로, 예시적인 실시형태에서 세포 제형인 세포 현탁액을 형성하기 위한 예시적인 실시형태에서 전달 용액일 수 있는 용액에서 변형된 NK 세포 및/또는 예시적인 실시형태에서, 변형된 T 세포와 같은 변형된 세포를 수집하는 단계; 및 5) 세포 제형을 대상체, 예시적인 실시형태에서, 혈액이 수집되는 대상체에게, 예를 들어, 주입을 통해, 또는 소정의 예시적인 실시형태에서 근육내로 또는 종양내로, 또는 추가의 예시적인 실시형태에서 피하로 전달하는 선택적 단계. 소정의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 미분획 전혈을 포함하거나 또는 PBMC가 아닌 하나 이상의 세포 유형을 포함하며, 총 유핵 세포(TNC)를 포함하는 전혈에서 발견되는 모든 또는 많은 세포 유형을 포함할 수 있다는 점은 주목할 만하다. 소정의 실시형태에서, 재조합 벡터는 CAR과 림프증식성 요소를 모두 암호화하는 자가-구동 CAR을 포함한다는 점은 주목할 만하다.

[0243] 비제한적인 예로서, 일부 실시형태에서, 10ml 내지 120ml의 혈액이 수집되고(또는 총 혈액 부피 0.5 내지 2.0에 대해 백혈구 성분채집을 수행하여 백혈구를 10ml 내지 120ml로 단리함); 수집된 미분획 혈액/단리된 세포가 백혈구감소 필터를 통과하여 필터의 상단에서 TNC가 단리되고; 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 백혈구감소 필터의 상단의 TNC에 총 반응 혼합물 부피가 500 μ l 내지 10ml가 되도록 첨가되어 반응 혼합물을 형성하고 접촉을 시작하고; 반응 혼합물이 본 명세서에 제공된 임의의 접촉 시간, 비제한적인 예로서, 1시간 내지 4시간 동안 선택적으로 인큐베이션되고; 비-관련 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 10ml 내지 120ml의 세척 용액으로 반응 혼합물을 여과함으로써 반응 혼합물의 세포로부터 세척되고; TNC 필터에 잔류하는 변형된 T 세포 및 NK 세포를 포함하는 세포가 2ml 내지 10ml의 전달 용액으로 필터로부터 용리되어 대상체에게 도입 또는 재도입하기에 적합한 세포 제형을 형성한다.

[0244] 전형적으로 림프구, PBMC 및 예시적인 실시형태에서, NK 세포 및/또는 추가의 예시적인 실시형태에서, T 세포를 변형, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키는 방법인 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서 사용되는 임의의 방법의 실시형태는 대상체로부터 혈액을 수집하는 단계를 포함할 수 있다. 혈액은 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 림프구(예를 들어, T 세포 및 NK 세포)와 같은 혈액 세포를 포함하는 혈액 성분을 포함한다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 대상체는 암(즉, 인간 암 대상체)을 앓고 있는 인간 대상체이다. 소정의 실시형태는 이러한 단계를 포함하지 않는다는 점은 주목할 만하다. 그러나, 대상체로부터 혈액을 수집하는 단계를 포함하는 실시형태에서, 혈액은 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 대상체로부터 수집되거나 또는 수득될 수 있으며, 이와 같이 수집되는 혈액 또는 혈액-유래 성분은 "혈액-유래 생성물"로 지칭될 수 있으며, 전형적으로 이는 말초 혈액으로부터 단리되기 때문에 전형적으로 "말초 혈액-유래 생성물"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 혈액-유래 생성물은 정맥천자 또는 당업계에 공지된 방법 임의의 다른 혈액 수집법에 의해 수집될 수 있으며, 이에 의해 미분획 전혈의 샘플이 용기, 예를 들어, 혈액 백에 수집되거나 또는 이에 의해 백혈구 및 림프구가, 예컨대, 성분채집(예를 들어, 백혈구 성분채집 또는 림프혈장 성분채집(lymphoplasmapheresis))에 의해 혈액으로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 수집되는 혈액(예를 들어, 미분획 전혈)의 양은 1ml 내지 5ml, 5ml 내지 10ml, 10ml 내지 15ml, 15ml 내지 20ml, 20ml 내지 25ml, 5ml 내지 25ml, 25ml 내지 250ml, 25ml 내지 125ml, 50ml 내지 100ml 또는 50ml 내지 250ml, 75ml 내지 125ml, 90ml 내지 120ml 또는 95ml 내지 110ml이다. 일부 실시형태에서, 수집되는 혈액 부피는 범위의 하한에서 1ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml, 50ml, 55ml, 60ml, 65ml, 70ml, 75ml, 80ml, 85ml, 90ml, 95ml, 100ml, 110ml, 120ml, 130ml, 140ml, 150ml, 175ml, 200ml, 225ml, 250ml, 275ml, 300ml, 350ml, 400ml, 450ml, 500ml, 600ml, 700ml, 800ml 또는 900ml 사이 및 범위의 상한에서 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml, 50ml, 55ml, 60ml, 65ml, 70ml, 75ml, 80ml, 85ml, 90ml, 95ml, 100ml, 110ml, 120ml, 130ml, 140ml, 150ml, 175ml, 200ml, 225ml, 250ml, 275ml, 300ml, 350ml, 400ml, 450ml, 500ml, 600ml, 700ml, 800ml 또는 900ml 또는 1l 사이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 수집되는 혈액 부피는 250ml, 100ml, 75ml, 20ml, 15ml, 10ml 또는 5ml 미만이다. 일부 실시형태에서, 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK

세포)는 성분채집에 의해 얻어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 성분채집(예를 들어, 백혈구 성분채집 또는 림프혈장 성분채집) 동안 채취되고 처리된 혈액 부피는 범위의 하한에서 대상체의 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1, 1.25 또는 1.5 사이의 총 혈액 부피 및 범위의 상한에서 대상체의 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25 또는 2.5 사이의 총 혈액 부피, 예를 들어, 0.5 내지 2.5, 0.5 내지 2, 0.5 내지 1.5 또는 1 내지 2의 총 혈액 부피이다. 인간의 총 혈액 부피는 전형적으로 4.5ℓ 내지 6ℓ 범위이므로, 미분획 전혈이 수집되는 경우보다 성분채집 동안 전형적으로 훨씬 더 많은 혈액이 채취되고 처리된다. 표적 혈액 세포(예를 들어, T 세포)가 성분채집에 의해 얻어지거나 또는 미분획 전혈이, 예를 들어, 혈액 백에 수집되는지 여부에 관계없이, 그 안의 표적 혈액 세포(예를 들어, T 세포)는 소정의 예시적인 실시형태에서 표적 혈액 세포가 변형, 유전적으로 변형 그리고/또는 형질도입되게 하는 본 명세서에 제공된 방법에 따라 처리될 것으로 상정된다. 성분채집(예를 들어, 백혈구 성분채집 또는 림프혈장 성분채집)을 사용하여 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 분획을 수집하는 경우(예를 들어, 류코팩(leukopak) 또는 림포플라즈마팩(lymphoplasmapak)을 제공하기 위해), 이러한 세포는 용액에 직접 재현탁되거나 또는 1회 이상의 세척 후에 재현탁되고, 여기에 CAR을 암호화하는 재조합 벡터가 첨가되어 본 명세서에 제공된 반응 혼합물을 형성한다. 이러한 반응 혼합물은 본 명세서의 임의의 방법에 사용될 수 있다. 대상체 또는 이로부터의 혈액 샘플이 낮은 CD3+ 혈구수를 갖는 일부 예시적인 방법에서, 본 명세서에 제공된 방법에 포함시키기 위해 혈액 세포(예를 들어, 백혈구 또는 림프구)를 수집하기 위해 성분채집(예를 들어, 백혈구 성분채집 또는 림프혈장 성분채집)이 사용된다.

[0245] 혈액이 대상체로부터 수집되는지 또는 혈액 세포가 성분채집에 의해 얻어지는지 여부에 관계없이, 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 변형시키기 위한 본 명세서에 제공된 임의의 방법 양태에서, 림프구의 집단(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)은 전형적으로 반응 혼합물에서 일부 실시형태에서, 비-바이러스 벡터의 카피이고, 예시적인 실시형태에서, 동일한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 벡터의 많은 카피와 접촉된다. 본 명세서에 제공된 임의의 실시형태에서 접촉은, 예를 들어, 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 혈액 세포의 처리에 적합화된 폐쇄형 시스템의 챔버, 예를 들어, 혈액 백 내에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 접촉하는 동안 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 또는 500ml 이하의 혈액을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 접촉하는 동안 적어도 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 또는 500ml의 혈액을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백은 접촉하는 동안 범위의 하한에서 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 25ml 및 50ml 사이의 혈액 및 범위의 상한에서 10ml, 15ml, 20ml, 25ml, 50ml, 75ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 400ml 및 500ml 사이의 혈액을 가질 수 있다. 예를 들어, 혈액 백은 접촉하는 동안 1ml 내지 10ml, 5ml 내지 25ml, 10ml 내지 50ml, 25ml 내지 100ml, 50ml 내지 200ml 또는 100ml 내지 500ml의 혈액을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈액 백 내부의 혼합물은 해파린을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 혈액 백 내부의 혼합물은 해파린을 포함하지 않는다. 형질도입 반응 혼합물은 하나 이상의 완충액, 이온 및 영양 배지를 포함할 수 있다. 레트로바이러스 입자와 관련하여, 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 소정의 예시적인 반응 혼합물에 렌티바이러스 입자의 0.1 내지 50, 0.5 내지 50, 0.5 내지 20, 0.5 내지 10, 1 내지 25, 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 5, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 7, 2 내지 3, 3 내지 10, 3 내지 15 또는 5 내지 15의 감염 다중도(MOI); 또는 적어도 1 및 6, 11 또는 51 미만의 MOI; 또는 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 5 내지 10 MOI 단위가 존재한다. 일부 실시형태에서, MOI는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 또는 15일 수 있다. 혈액에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법과 관련하여, 소정의 실시형태에서, PBMC가 단리되고 반응 혼합물에 사용된 방법에서보다 더 높은 MOI가 사용될 수 있다. 예를 들어, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법의 예시적인 실시형태는, 1×10^6 PBMC/ml 혈액으로 가정하여, 1 내지 50, 2 내지 25, 2.5 내지 20, 2.5 내지 10, 4 내지 6 또는 약 5 및 일부 실시형태에서, 5 내지 20, 5 내지 15, 10 내지 20 또는 10 내지 15의 MOI로 레트로바이러스 입자를 사용할 수 있다.

[0246] 예시적인 실시형태에서, 이러한 접촉 및 접촉이 일어나는 반응 혼합물은 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 폐쇄형 세포 처리 시스템 내에서 일어난다. 패키징 세포, 예시적인 실시형태에서, 패키징 세포주, 특히 예시적인 실시형태에서 본 명세서의 소정의 양태에서 제공된 패키징 세포가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 생성하는데 사용될 수 있다. 반응 혼합물 내 세포는 PBMC 또는 TNC일 수 있고/있거나 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법을 제공하는 본 명세서의 반응 혼합물 양태에서, 항응고제 및/또는 PBMC가 아닌 추가적인 유형의 혈액 세포를 포함하는 추가적인 혈액 성분이 본 명세서에서 논의되는 바와 같이 존재할 수 있다. 사실, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 이러한 조성물 및 방법 양태의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 본질적으로 전혈, 및 전형적으로 항응고제, 레트로바이러스 입자 및 레트로바이러스 입

자가 전혈에 전달된 비교적 소량의 용액일 수 있다.

[0247] 본 명세서에 제공된 전혈에서 림프구를 변형시키기 위한 조성물 및 방법 양태와 관련된 반응 혼합물에서, NK 세포 및 T 세포를 포함하는 림프구는 반응 혼합물을 형성하기 전에 PBMC 농축 절차를 포함하는 방법보다 반응 혼합물에서 더 낮은 백분율의 혈액 세포 및 더 낮은 백분율의 백혈구로 존재할 수 있다. 예를 들어, 이러한 양태의 일부 실시형태에서, NK 세포 또는 심지어 T 세포보다 더 많은 과립구 또는 호중구가 반응 혼합물에 존재한다. 전혈에서 림프구를 변형시키기 위한 양태의 반응 혼합물에 존재하는 항응고제 및 하나 이상의 추가적인 혈액 성분의 조성에 관한 세부사항은 본 명세서의 다른 부분에 상세히 기재된다. 본 명세서에 제공된 일부 반응 혼합물에서, T 세포는, 예를 들어, 범위의 하한에서 반응 혼합물의 림프구의 10%, 20%, 30% 또는 40% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물의 림프구의 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포는 림프구의 10% 내지 90%, 20% 내지 90%, 30% 내지 90%, 40% 내지 90%, 40% 내지 80% 또는 45% 내지 75%를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 예를 들어, NK 세포는 범위의 하한에서 반응 혼합물의 림프구의 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 사이 및 범위의 상한에서 반응 혼합물의 림프구의 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13% 또는 14% 사이로 존재할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포는 반응 혼합물의 림프구의 1% 내지 14%, 2% 내지 14%, 3% 내지 14%, 4% 내지 14%, 5% 내지 14%, 5% 내지 13%, 5% 내지 12%, 5% 내지 11% 또는 5% 내지 10%를 포함한다.

[0248] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태는 전형적으로 이러한 양태에 대해 본 명세서에 개시된 반응 혼합물에서 혈액 샘플로부터의 림프구가 재조합 핵산 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 혈액 샘플의 PBMC 농축 단계와 같은 임의의 혈액 분별을 포함하지 않는다. 따라서, 일부 실시형태에서, 미분획 전혈 내 림프구는 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉된다. 그러나, 일부 실시형태에서, 특히 본 명세서의 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부분의 일부 양태에 대해, 호중구/과립구는 세포가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전에 다른 혈액 세포로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 말초 혈액 림프구(PBL)를 포함하는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 레트로바이러스 입자가 포함된 반응 혼합물에 조합되기 전에, 예를 들어, PBMC 농축 절차를 사용하여 혈액 샘플의 다른 성분으로부터 분리된다. 당업자는 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 상이한 혈액 분획을 농축시키기 위해 당업계에 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

[0249] PBMC 농축 절차는 PBMC가 다른 혈액 세포 유형보다 적어도 25-배 및 전형적으로 적어도 50-배 농축되는 절차이다. 예를 들어, PBMC는 전혈에서 혈액 세포의 1% 미만을 구성하는 것으로 여겨진다. PBMC 농축 절차 후, PBMC 분획에서 분리된 세포의 적어도 30% 및 일부 예에서 많게는 70%가 PBMC이다. 일부 PBMC 농축 절차를 사용하여 더 높은 PBMC의 농축을 달성하는 것이 가능하다. 다양한 상이한 PBMC 농축 절차가 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, PBMC 농축 절차는 밀도 구배 배지 전체에서 림프구, 단핵구, 과립구 및 적혈구와 같은 주요 세포 집단을 분리하는 피콜 밀도 구배 원심분리 과정이다. 이러한 방법에서, 수성 배지는 고밀도 용액을 형성하는 친수성 다당류인 피콜을 포함한다. 두 층을 혼합하지 않고 밀도 배지 위 또는 아래의 전혈을 계층화한 후 원심분리하면 밀도에 따라 세포가 분산되고, PBMC 분획은 혈장과 밀도 구배 배지 사이의 계면에서 얇은 흰색 층을 형성할 것이다(예를 들어, 문헌[Panda and Ravindran (2013) Isolation of Human PBMCs. BioProtoc. Vol. 3(3)] 참조). 또한, 구심력이 Sepax 세포 처리 시스템의 회전력을 사용하여 피콜에서 PBMC를 다른 혈액 성분으로부터 분리하는데 사용될 수 있다.

[0250] 일부 실시형태에서, 성분채집, 예를 들어, 백혈구 성분채집은 PBMC와 같은 세포를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, AMICUS RBCX(프레지니우스-카비(Fresenius-Kabi)) 및 Trima Accel(테루모 비시티(Terumo BCT)) 성분채집 장치 및 키트가 사용될 수 있다. 성분채집에 의해 분리된 세포는 전형적으로 T 세포, B 세포, NK 세포, 단핵구, 과립구, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한다. 성분채집에 의해 수집된 세포는 세척되어 혈장 분획이 제거되고, 인산 완충 식염수(PBS), 또는 칼슘이 부족하고, 마그네슘이 부족할 수 있거나 또는 후속 처리 단계에서 2가 양이온이 전부는 아니지만 많이 부족할 수 있는 세척 용액과 같은 적절한 완충액 또는 배지에 넣어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 성분채집에 의해 수집된 세포는 본 명세서에 제공된 임의의 방법에 의해 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 성분채집에 의해 수집된 세포는 본 명세서에 제공된 임의의 세포 제형을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 성분채집에 의해 수집된 세포는, 예를 들어, Ca-무포함, Mg-무포함 PBS와 같은 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집에 의해 수집된 세포를 포함하는 샘플의 바람직하지 않은 성분은 제거될 수 있고, 세포는 배양 배지에 재현탁된다. 일부 실시형태에서, 백혈구 성분채집은 림프구와 같은 세포를 분리하는데 사용될 수 있다. PBMC를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 실시형태, 류코팩이 사용될 수 있다. TNC를 포함하는 임의의 실시형태에서, 버피 코

트(buffy coat)가 사용될 수 있다. 또 다른 PBMC 농축 방법에서, 자동화된 백혈구 성분채집 수집 시스템(예컨대, 테루모 비시티 인코포레이티드(미국 콜로라도 80215레이크우드 소재)의 SPECTRA OPTIA® 성분채집 시스템)은 전형적으로 혈장, 적혈구 및 과립구와 같은 유출 물질을 공여체에 되돌려 보내는 동안 고속 원심분리를 사용하여 표적 PBMC 분획으로부터 전혈의 주입을 분리하는데 사용되지만, 이러한 회송(returning)은 본 명세서에 제공된 방법에서 선택적일 것이다. 잔류 적혈구 및 과립구를 제거하기 위해 추가 처리가 필요할 수 있다. 두 방법은 모두 PBMC의 시간 집약적 정제를 포함하며, 백혈구 성분채집 방법은 PBMC 농축 단계 동안 환자의 참석과 참여가 필요하다.

[0251] PBMC 농축 절차의 추가의 비제한적인 예로서, 본 명세서의 형질도입, 유전적 변형 및/또는 변형 방법에 대한 일부 실시형태에서, PBMC는 Sepax 또는 Sepax 2 세포 처리 시스템(바이오세이프(BioSafe))을 사용하여 분리된다. 일부 실시형태에서, PBMC는 CliniMACS Prodigy 세포 프로세서(밀텐이 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 사용하여 분리된다. 일부 실시형태에서, 대상체로부터 혈액을 채취하고, 특정 세포 유형(예컨대, 예를 들어, PBMC)을 분류하는 장치를 통해 혈액을 통과시키고, 나머지를 대상체에게 다시 돌려보내는 자동화된 성분채집 분리가 사용된다. 밀도 구배 원심분리는 성분채집 후에 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC는 백혈구감소 필터 어셈블리를 사용하여 분리된다. 그 후, 일부 실시형태에서, 자성 비드 활성화 세포 분류는 세포 표현형(즉, 양성 선택)에 따라, 예를 들어, PBL 또는 이의 서브세트와 같은 PBMC로부터의 특정 세포 집단을 정제하기 위해, 이들이 본 발명의 반응 혼합물에 사용되기 전에 사용된다.

[0252] 예를 들어, T 세포가 동원 동안 만나는 환경을 모방하는 기질을 이용하여, 이를 반응 혼합물에 첨가하기 전에 T 세포를 정제하는 기질 부착 또는 음성 선택과 같은 정제를 위한 다른 방법이 또한 사용될 수 있고, 여기서 원치 않는 세포는 접촉 단계를 위한 반응 혼합물이 형성되기 전에 제거를 위해 원치 않는 세포를 표적으로 하는 항체 복합체를 사용하여 제거를 위해 표적화된다. 일부 실시형태에서, 적혈구 로세팅이 반응 혼합물을 형성하기 전에 적혈구를 제거하기 위해 사용된다. 다른 실시형태에서, 조절 줄기 세포는 접촉 단계 전에 제거될 수 있고, 따라서 이러한 실시형태에서, 접촉 단계 동안 존재하지 않는다. 특히 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법에 대한 본 명세서의 일부 실시형태에서, ABC 수송 저해제 및/또는 기질은 선택적 인큐베이션 또는 방법의 임의의 단계와 함께 또는 없이 접촉 전, 동안 또는 접촉 전 및 동안 존재하지 않는다(즉, 접촉이 일어나는 반응 혼합물에 존재하지 않음).

[0253] 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 대한 소정의 예시적인 실시형태에서, 림프구는 생체내, 시험관내 또는 생체외에 상관없이 사전 활성화 또는 자극 없이 그리고/또는 사전 활성화 또는 자극을 필요로 하지 않고; 그리고/또는 추가로, 일부 실시형태에서, 선택적 인큐베이션과 함께 또는 선택적 인큐베이션 없이 초기 접촉 후 생체외 또는 시험관내 활성화 또는 자극 없이, 또는 선택적 인큐베이션과 함께 또는 선택적 인큐베이션 없이 초기 접촉 후 생체외 또는 시험관내 활성화 또는 자극을 필요로 하지 않고 변형, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입된다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 세포는 접촉하는 동안 활성화되고, 접촉 전 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간 또는 8시간 초과 동안 전혀 활성화되지 않거나 활성화되지 않는다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 레트로바이러스 입자 표면에 존재하지 않는 요소에 의한 활성화는 세포를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는데 필요하지 않다. 따라서, 이러한 활성화 또는 자극 요소는 접촉 전, 동안 또는 후에 레트로바이러스 입자 외에는 필요하지 않다. 따라서, 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 사전-활성화 또는 자극을 필요로 하지 않는 이러한 예시적인 실시형태는 T 세포 및 그 안의 생물학적 메커니즘을 더 잘 이해하기 위한 시험관내 실험을 신속하게 수행하는 능력을 제공한다. 또한, 이러한 방법은 PBMC, 림프구, T 세포 또는 NK 세포를 사용하여 생산된 생물학적 제품의 훨씬 더 효율적인 상업적 생산 및 이러한 상업적 생산 방법의 개발을 제공한다. 마지막으로, 이러한 방법은 입양 세포 요법을 위한 림프구(예를 들어, NK 세포 및 특히 T 세포)의 보다 신속한 생체의 처리를 제공하여, 이러한 요법, 예를 들어, 신속한 현장 진료(rPOC) 방법을 제공함으로써 이러한 요법의 전달을 근본적으로 단순화한다. 예시적인 실시형태에서, 림프구의 일부, 대부분, 적어도 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 또는 전부는 레트로바이러스 입자와 조합되어 반응 혼합물을 형성할 때 휴지기이며, 전형적으로 반응 혼합물에서 레트로바이러스 바이러스 입자와 접촉될 때 휴지기이다. 혈액 또는 이의 성분 내 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구를 변형시키는 방법에서, 림프구는 수집 직전에 생체내에서 수집된 혈액에 존재할 때 전형적으로 휴지 상태에서 접촉될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 95% 내지 100%의 휴지기 세포(Ki-67⁻)로 구성된다. 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 접촉되는 T 세포 및/또는 NK 세포는 범위의 하한에서 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 및 95% 사이의 휴지기 세포 및 범위의 상한에서 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 사이의 휴지기 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 미경험 세포를 포함한다. 일부 예시적인 실시형태에서, 이 단락의 하

위 실시형태는 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태에 포함된다.

[0254] 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 명세서의 양태의 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 사이의 접촉은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입을 촉진할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 접촉 기간 동안, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포를 식별하고 이에 결합하며, T 세포 및 NK 세포는 본 명세서에 사용되는 용어로 "변형"된다. 이 시점에서, 레트로바이러스와 숙주 세포막이 융합되기 시작하고, 항-CD3 항체를 포함하여 임의의 레트로바이러스 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 요소가 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 표면에 통합된다. 그런 다음, 형질도입 과정의 다음 단계로, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자로부터의 유전 물질이 T 세포 및/또는 NK 세포에 들어가고, 이때 T 세포 및/또는 NK 세포는 본 명세서에서 사용된 문구로 "유전적으로 변형"된다. 이러한 과정은 접촉이 시작된 후 몇 시간 또는 며칠 후 그리고 심지어 비-관련 레트로바이러스 입자를 씻어낸 후에도 발생할 수 있다는 점은 주목할 만하다. 그런 다음, 유전 물질은 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포의 게놈 DNA에 통합되고, 이때 T 세포 및/또는 NK 세포는 이제 본 명세서에서 사용되는 용어로 "형질도입"된다. 유사하게는, 세포는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 이외의 재조합 벡터에 의해 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입될 수 있다. 세포는 또한 형질감염 후 T 세포 및/또는 NK 세포의 게놈 DNA에 유전 물질을 내재화하고 통합시킬 수 있으며, 이때 T 세포 및/또는 NK 세포는 이제 본 명세서에서 사용되는 용어로 "안정적으로 형질감염"된다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키는 임의의 방법은 형질도입 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 형질도입시키는 방법이다. 접촉이 시작된 후 생체내 또는 생체외에서 6일까지, 대다수의 변형된 및 유전적으로 변형된 세포가 형질도입된 것으로 여겨진다. 렌티바이러스 형질도입 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법은, 예를 들어, 문헌[Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505]에 기술되어 있다. 본 개시내용 전반에 걸쳐, 형질도입된 또는 일부 실시형태에서 안정적으로 형질감염된, T 세포 및/또는 NK 세포는 생체외 형질도입 동안 세포의 게놈에 혼입되는 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드의 적어도 일부를 보유하는 생체외에서 형질도입된 세포의 자손을 포함한다. 형질도입된 세포를 "재도입하는" 본 명세서의 방법에서, 이러한 세포는 전형적으로 대상체의 혈액으로부터 수집될 때 형질도입된 상태가 아님을 이해할 것이다.

[0255] 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 본 명세서의 방법에서 재조합 레트로바이러스와 접촉되기 전에 활성화되지 않지만, 예시적인 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 재조합 레트로바이러스 및 림프구의 초기 접촉이 일어나는 반응 혼합물에 존재한다. 예를 들어, 이러한 T 세포 활성화 요소는 반응 혼합물의 용액에 있을 수 있다. 예를 들어, 가용성 항-CD3 항체는 25 내지 200 ng/ml, 50 내지 150 ng/ml, 75 내지 125 ng/ml 또는 100 ng/ml로 접촉하고, 그 이후 선택적 인큐베이션 동안 반응 혼합물에 존재할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 레트로바이러스 표면과 회합된다. T 세포 활성화 요소는 본 명세서에 제공된 임의의 T 세포 활성화 요소일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 항-CD3 scFv 또는 항-CD3 scFvFc와 같은 항-CD3일 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 활성화 요소를 더 포함할 수 있으며, 이는 추가의 예시적인 예에서 레트로바이러스의 표면의 외부면과 회합된다.

[0256] 본 명세서에 제공된 전혈에서 림프구를 형질도입시키는 방법 및/또는 변형 또는 유전적으로 변형시키는 방법의 접촉 단계는 전형적으로 레트로바이러스 입자, 전형적으로 레트로바이러스 입자의 집단이 형질도입 반응 혼합물을 형성하기 위해 액체 완충액 및/또는 배지에 현탁되어 있는 동안 PBMC 농축 절차 후에 존재하지 않는 항응고제 및/또는 PBMC 이외의 추가적인 혈액 성분을 포함하는 혈액 세포, 전형적으로 혈액 세포의 집단과 접촉하는 초기 단계를 포함한다. 본 명세서에 제공된 다른 양태에서와 같이, 이러한 접촉 후에 레트로바이러스 입자 및 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 혈액 세포를 현탁액에 포함하는 이러한 반응 혼합물에서 선택적 인큐베이션 기간이 뒤따른다. 혈액 또는 이의 성분에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 방법에서, 반응 혼합물은 본 명세서에 개시된 바와 같이 적어도 1종, 2종, 3종, 4종, 5종 또는 모든 추가적인 혈액 성분을 포함할 수 있고, 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 항응고제를 포함한다.

[0257] 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서 형질도입 반응 혼합물은 레트로바이러스 입자 및 림프구의 초기 접촉 후 선택적 인큐베이션 단계에서 23℃ 내지 39℃에서, 일부 예시적인 실시형태에서 37℃에서 인큐베이션될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 형질도입 반응은 더 빠른 융합/형질도입을 위해 37℃ 내지 39℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 접촉 단계는 선택적 인큐베이션 단계가 포함된 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같은 냉

간 접촉 단계이다. 일부 실시형태에서, 냉간 접촉 단계는 37℃ 미만, 예컨대, 1℃ 내지 25℃ 또는 2℃ 내지 6℃의 온도에서 수행된다. 이러한 온도에서의 접촉 단계와 관련된 선택적 인큐베이션은 본 명세서에서, 예를 들어, 예시적인 실시형태 부문에서 논의된 임의의 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 온도와 관련된 선택적 인큐베이션은 1시간 이하 동안 수행된다.

[0258] 접촉이 필터 상에서 수행되는 예시적인 실시형태를 포함하는 일부 실시형태에서, 접촉은 본 명세서에서 냉간 접촉이라고 지칭되는 더 낮은 온도, 예를 들어, 2℃ 내지 25℃에서 수행된 다음, 현탁액에 회합되지 않은 채로 남아 있는 레트로바이러스 입자는, 예를 들어, T 세포 및 NK 세포를 포함하는 백혈구를 보유하지만 유리되지 않고 회합되지 않은 바이러스 입자는 보유하지 않는 백혈구감소 필터와 같은 필터 상에서 반응 혼합물을 세척함으로써 반응 혼합물로부터 제거된다. 형질도입 반응 혼합물에서 접촉할 때 세포 및 레트로바이러스 입자는 현탁액에 남아 있지 않고 세포와 회합되지 않은 레트로바이러스 입자를 세포로부터 제거하기 위해 즉시 처리될 수 있다. 선택적으로, 현탁액에 유리되어 있거나 또는 현탁액 중 세포와 회합되어 있는 현탁액 중 세포 및 레트로바이러스 입자는 본 명세서에 제공된 방법에서 접촉 단계를 위해 본 명세서에 제공된 바와 같이 다양한 길이의 시간 동안 인큐베이션될 수 있다. 추가 단계 전에, 이러한 세포가 시험관내, 생체외에서 연구되거나 또는 대상체에게 도입되는지 여부에 관계없이 세척이 수행될 수 있다. 이러한 현탁액은 세포 및 레트로바이러스 입자가 침전되도록하거나, 또는 원심력과 같은 힘을 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 용기 또는 챔버의 바닥에 인가하는 것을 통해 이러한 침전을 유발하는 것을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 g 힘은 원심 접종(spinoculation) 절차에서 성공적으로 사용된 g 힘보다 낮다. 추가 접촉 시간 및 접촉과 선택적 인큐베이션에 관한 논의는 본 명세서, 예를 들어, 예시적인 실시형태 부문에서 추가로 논의된다.

[0259] 현재 방법은 제형화 및 대상체로의 재도입 전에 유전적으로 변형된 림프구의 생체외 증식의 광범위한 기간을 필요로 한다. 대상체가 한 번의 방문으로 혈액을 채취하고, 림프구를 변형시키고 재도입할 수 있는 효과적인 현장 진료 입양 세포 요법에 대한 필요성이 오랫동안 느껴져 왔다. 본 명세서에 제공된 방법은 생체외 증식 단계 없이 림프구, 소정의 예시적인 실시형태에서, PBMC, 다른 예시적인 실시형태에서, 총 유핵 세포(TNC)의 신속한 생체외에서 처리를 허용하여, 예를 들어, 이러한 현장 진료 방법 및 일부 예시적인 실시형태에서, 더 짧은 기간(신속한 현장 진료(rPOC))을 제공함으로써 입양 세포 요법의 전달을 근본적으로 단순화한다. 선행 방법보다 훨씬 짧고 더 단순한 림프구, 특히 NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, T 세포를 변형시키기 위한 예시적인 방법이 본 명세서에 개시된다. 따라서, 일부 실시형태에서, PBMC 또는 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키는 본 명세서에 제공된 임의의 방법에서, 접촉 단계는 예시적인 실시형태 부문에 제공된 것들을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 본 명세서에 제공된 임의의 기간 동안 수행될 수 있다(또는 발생할 수 있음). 예를 들어, 상기 접촉은 24시간 미만, 예를 들어, 12시간 미만, 8시간 미만, 4시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만, 30분 미만 또는 15분 미만 동안일 수 있지만, 각 경우에 세포와 회합되지 않은 현탁액에 남아 있는 레트로바이러스 입자가 세포로부터 분리되고, 전형적으로 본 명세서에서 추가로 상세히 논의되는 바와 같이 폐기되기 전, 레트로바이러스 입자 및 세포가 형질도입 반응 혼합물에서 현탁액으로 접촉하는 적어도 초기 접촉 단계가 있다. 이론에 의해 제한되는 것은 아니지만, 접촉은 전형적으로 레트로바이러스 입자를 포함하는 용액을 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 용액에 첨가함으로써 레트로바이러스 입자와 림프구가 함께 결합될 때 시작되는 것으로 여겨진다는 점에 유의하여야 한다.

[0260] 초기 냉간 접촉을 포함하는 초기 접촉 후, 일부 실시형태에서, 용액에 유리되어 있고 세포와 회합되지 않은 채로 남아 있는 재조합 핵산 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 입자)를 제거하지 않고 지정된 기간 동안 현탁액에서 세포 및 예시적인 실시형태에서 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터를 포함하는 반응 혼합물의 인큐베이션이 있다. 이러한 인큐베이션은 때때로 본 명세서에서 선택적 인큐베이션으로 지칭된다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 접촉(초기 접촉 및 선택적 인큐베이션을 포함)은 15분 내지 12시간, 15분 내지 10시간 또는 15분 내지 8시간 또는 예시적인 실시형태 부문에 포함된 임의의 시간 동안 수행될 수 있다(또는 발생할 수 있음). 냉간 접촉 단계를 포함하는 소정의 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 선택적 세척 단계 후에 세포를 현탁시킴으로써 수행되어, 세포와 회합되지 않은 재조합 핵산 벡터 및 예시적인 실시형태에서 레트로바이러스 입자가 세척되어 제거된다. 예시적인 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 32℃ 내지 42℃, 예컨대, 37℃의 온도에서 수행된다. 선택적 2차 인큐베이션은 본 명세서에서 논의된 임의의 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 선택적 2차 인큐베이션은 6시간 이하 동안 수행된다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 접촉(초기 접촉 및 선택적 인큐베이션을 포함)은 범위의 하한에서 30초 또는 1분, 2분, 5분, 10분, 15분, 30분 또는 45분 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 사이 및 범위의 상한에서 10분, 15분, 30분 또는 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간 및 72시간 사이 동안 수행될 수 있다(또는 발생할 수 있음)(여기서, 본 명세서에서 일반적으로 표시된 바와 같이 선택된 범위의 하한은

선택된 범위의 상한보다 작음). 따라서, 일부 실시형태에서, 레트로바이러스 입자를 림프구에 첨가함으로써 반응 혼합물이 형성된 시간 후, 반응 혼합물은 범위의 하한에서 5분 및 10분, 15분 또는 30분 사이 또는 범위의 상한에서 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 10시간 또는 12시간 동안 인큐베이션될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 15분 내지 12시간, 15분 내지 10시간, 15분 내지 8시간, 15분 내지 6시간, 15분 내지 4시간, 15분 내지 2시간, 15분 내지 1시간, 15분 내지 45분 또는 15분 내지 30분 동안 인큐베이션될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 30분 내지 12시간, 30분 내지 10시간, 30분 내지 8시간, 30분 내지 6시간, 30분 내지 4시간, 30분 내지 2시간, 30분 내지 1시간 또는 30분 내지 45분 동안 인큐베이션될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 1시간 내지 12시간, 1시간 내지 8시간, 1시간 내지 4시간 또는 1시간 내지 2시간 동안 인큐베이션될 수 있다. 또 다른 예시적인 실시형태에서, 접촉은 반응 혼합물에서 임의의 추가 인큐베이션 없이 초기 접촉 단계 단독(현탁액에 유리되어 있는 레트로바이러스 입자 및 현탁액 중 세포를 포함하는 반응 혼합물에서 임의의 추가의 인큐베이션 없이) 또는 반응 혼합물에서 5분, 10분, 15분, 30분 또는 1시간 인큐베이션 동안 수행된다.

[0261] 초기 접촉 및 접촉 단계의 일부일 수 있는 선택적 인큐베이션을 위한 표시된 기간 후에, 반응 혼합물 내 혈액 세포 또는 이의 T 세포 및/또는 NK 세포-함유 분획은 이러한 세포와 회합되지 않은 레트로바이러스 입자로부터 분리된다. 예를 들어, 이는 PBMC 농축 절차(예를 들어, Sepax 유닛에서 피콜 구배)를 사용하거나 또는 본 명세서에 제공된 소정의 예시적인 실시형태에서, 백혈구 제거 필터 세트 어셈블리를 통해 반응 혼합물을 여과한 다음 T 세포 및 NK 세포를 포함하는 백혈구를 수집함으로써 수행될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이는 500g, 예를 들어, 400g 또는 300g 내지 490g 또는 350g 내지 450g 미만의 상대 원심력에서 반응 혼합물의 원심분리에 의해 수행될 수 있다. 별개의 세포로부터 레트로바이러스 입자를 분리하기 위한 이러한 원심분리는, 예를 들어, 5분 내지 15분 또는 5분 내지 10분 동안 수행될 수 있다. 원심력이 세포와 회합되지 않은 레트로바이러스 입자로부터 세포를 분리하는데 사용되는 예시적인 실시형태에서, 이러한 g 힘은 전형적으로 원심접종 절차에서 성공적으로 사용되는 g 힘보다 낮다.

[0262] 일부 예시적인 실시형태에서, 임의의 양태에서 본 명세서에 제공된 방법은 원심접종을 수행하는 단계를 포함하지 않는다. 이러한 실시형태에서, 세포 또는 세포는 적어도 15분 동안 적어도 400g, 500g, 600g, 700g 또는 800g의 원심접종을 받지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 세포들은 적어도 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분 또는 45분 동안 적어도 800g의 원심접종을 받지 않는다. 일부 실시형태에서, 원심접종은 접촉 단계의 일부로서 포함된다. 예시적인 실시형태에서, 원심접종이 수행될 때, 원심접종의 시간은 위에서 논의된 선택적 인큐베이션의 인큐베이션 시간을 제공하기 때문에 접촉의 일부로서 추가적인 인큐베이션은 없다. 다른 실시형태에서, 15분 내지 4시간, 15분 내지 2시간 또는 15분 내지 1시간의 원심접종 후 추가 인큐베이션이 있다. 원심접종은, 예를 들어, 30분 내지 120분, 전형적으로, 적어도 60분, 예를 들어, 60분 내지 180분 또는 60분 내지 90분 동안 수행될 수 있다. 원심접종은 전형적으로 적어도 800g 이상, 전형적으로 적어도 1200g, 예를 들어, 800g 내지 2400g, 800g 내지 1800g, 1200g 내지 2400g 또는 1200g 내지 1800g의 상대 원심력으로 원심분리기에서 수행된다. 원심접종 후, 이러한 방법은 전형적으로 펠릿화된 세포 및 레트로바이러스 입자를 재현탁시킨 다음, 원심접종이 수행되지 않을 때 위에 논의된 단계에 따라 세포와 회합되지 않은 레트로바이러스 입자를 제거하는 추가적인 단계를 포함한다.

[0263] 원심접종을 포함하는 실시형태에서, 선택적 인큐베이션 및 원심접종을 포함하는 접촉 단계는 4℃ 내지 42℃ 또는 20℃ 내지 37℃에서 수행될 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 원심접종은 수행되지 않고, 접촉 및 관련 선택적 인큐베이션은 20℃ 내지 25℃에서 4시간 이하, 2시간 이하, 1시간 이하, 30분 이하, 15분 이하 또는 15분 내지 2시간, 15분 내지 1시간 또는 15분 내지 30분 동안 수행된다.

[0264] 본 명세서의 임의의 방법에 따라 제공되는 림프구를 유전적으로 변형시키는 방법은 전형적으로 임의의 이식 유전자, 예를 들어, CAR 또는 림프증식성 요소를 암호화하거나 또는 예시적인 실시형태에서 본 명세서에 제공된 임의의 CAR 및 림프증식성 요소 실시형태에 따른 CAR 및 림프증식성 요소 둘 다를 암호화하는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 세포 내로의 삽입을 포함한다. 이러한 CAR 및 림프증식성 요소는 접촉 및 선택적 인큐베이션 후 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식을 지원할 수 있는 본 명세서에 제공된 더 짧고 보다 단순화된 방법을 지원하기 위해 제공될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 제공된 임의의 방법의 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 T 세포 및/또는 NK 세포 내부의 레트로바이러스 입자의 게놈으로부터 전달될 수 있어, 이들 세포는 본 명세서의 림프증식성 요소 부문에 개시된 증가된 증식 및/또는 생존의 특징을 갖는다. 본 명세서에 제공된 임의의 방법의 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포는 적어도 7일, 14일 또는 28일 동안

마우스에서 생체내 생착 및/또는 마우스에서 생체내 농축이 가능하다. 당업자는 이러한 마우스가 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포 간의 임의의 면역학적 차이가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 형질 도입된 림프구의 임의의 성분에 대해 마우스에서 유도되는 면역 반응을 일으키지 않도록 처리되거나 또는 그렇지 않으면 유전적으로 변형될 수 있음을 이해할 것이다.

[0265] 예를 들어, 세포 및 레트로바이러스 입자가 초기에 접촉될 때 또는 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서, 그 후 반응 혼합물과의 선택적 인큐베이션 기간 동안, 레트로바이러스 입자를 포함하는 접촉 단계에 포함될 수 있는 배지 및 배지에 현탁된 세포 또는 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서 세포를 배양하는 동안 및/또는 다양한 세척 단계 동안 사용될 수 있는 배지는 생체의 T 세포 및/또는 NK 세포 배양을 위한 상업적으로 입수 가능한 배지와 같은 기본 배지를 포함할 수 있다. 이러한 배지의 비제한적인 예는 X-VIVO™ 15 화학적으로 정의된, 무혈청 조혈 세포 배지(론자(Lonza))(2018 카탈로그 번호 BE02-060F, BE02-00Q, BE-02-061Q, 04-744Q 또는 04-418Q), ImmunoCult™-XF T 세포 증식 배지(스템셀 테크놀로지스(STEMCELL Technologies))(2018 카탈로그 번호 10981), PRIME-XV® T 세포 증식 XSFM(Irvine 과학)(2018 카탈로그 번호 91141), AIM V® 배지 CTS™(치료적 등급)(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific))(본 명세서에서 "써모 피셔"로 지칭됨) 또는 CTS™ Optimizer™ 배지(써모 피셔)(2018 카탈로그 번호 A10221-01(기본 배지(병)) 및 A10484-02(보충제), A10221-03(기본 배지(백)), A1048501(기본 배지 및 보충제 키트(병)) 및 A1048503(기본 배지 및 보충제 키트(백))을 포함한다. 이러한 배지는 키트 성분에 대해 본 명세서에서 논의되는 바와 같이 cGMP에 따라 제조된 화학적으로 정의된 무혈청 제형일 수 있다. 배지는 이종 물질이 없으며(xeno-free) 완전할 수 있다. 일부 실시형태에서, 기본 배지는 FDA 510(k) 승인 장치와 같은 생체의 세포 처리에 사용하기 위한 규제 기관에 의해 승인되었다. 일부 실시형태에서, 배지는 써모 피셔(매사추세츠주 월섬 소재)로부터 입수 가능한 2018 카탈로그 번호 A1048501(CTS™ OpTmizer™ T 세포 증식 SFM, 병 형식) 또는 A1048503(CTS™ OpTmizer™ T 세포 증식 SFM, 백 형식)의 T 세포 증식 보충제가 보충되거나 또는 보충되지 않은 기본 배지이다. 대상체로부터 유래된 인간 혈청 알부민, 인간 AB+ 혈청 및/또는 혈청과 같은 첨가제가 형질도입 반응 혼합물에 첨가될 수 있다. IL2, IL7 또는 IL15 또는 인간 혈청에서 발견되는 것과 같은 지지 사이토카인이 형질도입 반응 혼합물에 첨가될 수 있다. 소정의 실시형태에서, dGTP가 형질도입 반응에 첨가될 수 있다.

[0266] 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 변형시키는 단계를 포함하는 본 명세서의 임의의 방법의 일부 실시형태에서, 세포는 사전 활성화 없이 레트로바이러스 입자와 접촉될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는 본 명세서의 임의의 방법의 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 한 실시형태에서 4시간 초과 동안 또는 6시간 초과 동안, 또는 또 다른 실시형태에서 8시간 초과 동안, 또 다른 실시형태에서, 형질도입 전에 단핵구에 부착되는 기질 상에서 인큐베이션 되지 않았다. 하나의 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 형질도입 전에 단핵구를 제거하기 위해 부착성 기질 상에서 밤새 인큐베이션 되었다. 또 다른 실시형태에서, 방법은 형질도입 전 30분, 1시간 또는 2시간 이하 동안 단핵구에 결합하는 부착성 기질 상에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 인큐베이션 하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 상기 형질도입 단계 전 부착성 기질 상에서의 인큐베이션에 의해 단핵구를 제거하는 단계에 노출되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 접촉 단계 및/또는 변형 및/또는 유전적으로 변형 및/또는 형질도입 단계 전 또는 동안 소 혈청, 예컨대, 세포 배양 소 혈청, 예를 들어, 태아 소 혈청과 함께 인큐베이션 되거나 또는 이에 노출되지 않는다.

[0267] 본 명세서에 제공된 변형을 위한 방법의 일부 또는 모든 단계, 또는 이러한 방법의 사용은 폐쇄형 시스템에서 수행된다. 따라서, 이러한 방법에서 형성된 반응 혼합물 및 이러한 방법에 의해 제조된 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)는 이러한 폐쇄형 시스템 내에 포함될 수 있다. 폐쇄형 시스템은 일반적으로 세포가 처리되고/되거나 수송되는 시스템의 실내 환경 또는 심지어 후드 내 환경, 튜브 및 챔버와 같은 도관 외부와 같은 환경에 대해 폐쇄형 또는 완전 폐쇄형인 세포 처리 시스템이다. 세포 처리 절차에서 안전성 및 규제 제어에 대한 가장 큰 위험 중의 하나는 전통적인 개방 세포 배양 시스템에서 발견되는 바와 같이 환경에의 빈번한 노출을 통한 오염의 위험이다. 특히 항생제의 부재하에 이러한 위험을 완화하기 위해, 일회용(disposable)(1회용) 장비의 사용에 중점을 둔 일부 상업적 공정이 개발되었다. 그러나, 무균 조건하에 사용하더라도, 샘플을 채취하거나 또는 추가적인 성장 배지를 추가하기 위해 플라스크를 여는 것으로부터 오염의 위험이 항상 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 전형적으로 생체의 방법인 본 명세서에 제공된 방법은 전형적으로 폐쇄형-시스템 내에서 수행된다. 이러한 과정은 외부 환경에 노출되지 않도록 설계되고 운영될 수 있다. 물질 이동은 멸균 튜브 및 멸균 용접된 결합부(welded connection)와 같은 멸균 결합부를 통해 발생한다. 가스 교환을 위한 공기는 환경 노출을 방지하기 위해 0.2μm 필터를 통해 가스 투과막

을 통해 발생할 수 있다. 일부 예시적인 실시형태에서, 방법은, 예를 들어, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포를 제공하기 위해 T 세포에 대해 수행된다.

[0268] 이러한 폐쇄형 시스템 방법은 상업적으로 이용 가능한 장치로 수행될 수 있다. 상이한 폐쇄형 시스템 장치가 방법 내 상이한 단계에서 사용될 수 있으며, 세포는 세포 또는 배지가 환경에 노출되는 것을 방지하기 위해 용접, 루어(luer), 스파이크 또는 클레이브 포트와 같은 배관 및 결합부를 사용하여 이러한 장치 사이에서 이동될 수 있다. 예를 들어, 혈액은 선택적으로 항응고제를 포함하는 IV 백 또는 주사기에 수집될 수 있고, 일부 양태에서, PBMC 농축 및 단리를 위해 Sepax 2 장치(바이오세이프)로 이동될 수 있다. 다른 실시형태에서, 전혈은 백혈구를 수집하기 위해 백혈구감소 필터 어셈블리를 사용하여 여과될 수 있다. 단리된 PBMC 또는 단리된 백혈구는 선택적 활성화, 형질도입 및 선택적 증식을 위해 G-Rex 장치의 챔버로 이동될 수 있다. 대안적으로, 수집되는 혈액은 혈액 백, 예를 들어, 혈액이 수집되는 백에서 형질도입될 수 있다. 마지막으로, 세포는 수확되고, Sepax 2 장치를 사용하여 또 다른 백에 수집될 수 있다. 방법은 폐쇄형 시스템 T 세포 및/또는 NK 세포 생산에 적합화된 임의의 장치 또는 조합에서 수행될 수 있다. 이러한 장치의 비제한적인 예는 G-Rex 장치(윌슨 울프(Wilson Wolf)), GatheRex(윌슨 울프), Sepax 2(바이오세이프), WAVE 생물반응기(제너럴 일렉트릭(General Electric)), CultiLife 세포 배양 백(타카라(Takara)), PermaLife 백(오리젠), CliniMACS Prodigy(밀테니 바이오텍) 및 VueLife 백(세인트-고바인(Saint-Gobain))을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 선택적 활성화, 형질도입 및 선택적 증식은 폐쇄형 시스템의 동일한 챔버 또는 용기에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 예시적인 실시형태에서, 챔버 G-Rex 장치의 챔버일 수 있고, PBMC 또는 백혈구는 농축 및 단리된 후 G-Rex 장치의 챔버로 이동될 수 있으며, 수확할 때까지 G-Rex 장치의 동일한 챔버에 남아 있을 수 있다.

[0269] 본 명세서에 제공된 방법은 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전 또는 후에 혈액 및 그 안의 세포 및/또는 이의 분획뿐만 아니라 림프구를 폐쇄형 시스템 내의 용기 사이로 이동시키는 것을 포함할 수 있으므로 환경에 노출되지 않는다. 폐쇄형 시스템에 사용되는 용기는, 예를 들어, 튜브, 백, 주사기 또는 다른 용기일 수 있다. 일부 실시형태에서, 용기는 연구 시설에서 사용되는 용기이다. 일부 실시형태에서, 용기는 상업적 생산에서 사용되는 용기이다. 다른 실시형태에서, 용기는 혈액 수집 과정에서 사용되는 수집 용기일 수 있다. 본 명세서의 변형시키는 방법은 전형적으로 접촉 단계를 포함하되, 림프구는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 접촉은 용기, 예를 들어, 혈액 백 내에서 수행될 수 있다. 혈액 및 이의 다양한 림프구-함유 분획은 접촉을 위해 폐쇄형 시스템 내의 또 다른 용기(예를 들어, 제1 용기에서 제2 용기)로 이동될 수 있다. 제2 용기는 G-Rex 장치와 같은 폐쇄형 장치의 세포 처리 구획일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된(예를 들어, 형질도입된) 세포를 접촉시킨 후 폐쇄형 시스템(즉, 환경에 대한 노출 없이) 내에서 상이한 용기로 이동될 수 있다. 이러한 이동 전 또는 후에, 세포는 전형적으로 실질적으로 모든 또는 모든 레트로바이러스 입자를 제거하기 위해 폐쇄형 시스템 내에서 세척된다. 일부 실시형태에서, 혈액의 수집에서 접촉(예를 들어, 형질도입), 선택적 인큐베이션 및 인큐베이션 후 단리 및 선택적 세척에 이르기까지 본 명세서에 개시된 과정은 범위의 하한에서 15분, 30분 또는 1시간, 2시간, 3시간 또는 4시간 및 범위의 상한에서 4시간, 8시간, 10시간 또는 12시간 동안 수행된다.

[0270] 이러한 방법뿐만 아니라 이러한 방법에 의해 제조된 NK 세포 및 T 세포의 용도와 같은 다른 양태의 다양한 실시형태가 본 명세서에 상세히 개시되어 있다. 또한, PBMC, 림프구, T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키기 위한 이러한 방법 양태의 다양한 요소 또는 단계가 본 명세서, 예를 들어, 이 부분 및 예시적인 실시형태 부문에 제공되고, 이러한 방법은 본 명세서에서 추가로 논의되는 바와 같이 본 명세서 전반에 걸쳐 제공된 실시형태, 예를 들어, 이 부분 및 예시적인 실시형태 부문에 제공된, 예를 들어, PBMC 또는 림프구, 예를 들어, NK 세포 또는 예시적인 실시형태에서, T 세포를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키기 위한 임의의 양태의 실시형태를 포함하며, 하나 이상의 림프증식성 요소, CAR, 슈도타이핑 요소, 제어 요소, 활성화 요소, 막-결합 사이토카인, miRNA, 코작-유형 서열, WPRE 요소, 삼중 종결 코돈 및/또는 본 명세서에 개시된 다른 요소를 포함하는 것을 포함하는 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 임의의 실시형태를 포함할 수 있으며, 패키징 세포를 사용하여 레트로바이러스 입자를 생성하는 본 명세서의 방법과 조합될 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 PBMC 또는 림프구를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키기 위한 이러한 방법은 시험관내 또는 생체외에서 수행될 수 있다. 당업자는 T 세포(들) 및/또는 NK 세포(들)와 같은 PBMC 또는 림프구를 형질도입, 유전적으로 변형 및/또는 변형시키기 위해 본 명세서에 제공된 세부사항이 이러한 단계(들)을 포함하는 임의의 양태에 적용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0271] 본 명세서에 제공된 방법에서 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 대상체로의 본 명

세서에서 투여 및 재투여로도 지칭되는 도입 또는 재도입은 당업계에 공지된 임의의 경로를 통할 수 있다. 이러한 도입 또는 재도입은 전형적으로 i) 변형된 그리고/또는 ii) 유전적으로 변형된 그리고/또는 iiia) 형질도입된 또는 iiib) 형질감염된 세포를 전달 용액에 현탁시켜 본 명세서에서 더 상세히 논의되는 바와 같이 대상체에게 도입 또는 재도입될 수 있는 세포 제형을 형성하는 것을 포함한다. 예를 들어, 도입 또는 재도입은 대상체의 혈관으로의 주입을 통해 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)는 근육내 투여 또는 예시적인 실시형태에서, 피하 투여에 의해 대상체에게 다시 도입 또는 재도입된다.

[0272] 일부 투여되는 세포는 림프증식성 요소를 암호화하는 핵산으로 변형된다. 이론에 제한되지 않고, 비제한적인 예시적인 방법에서, 림프증식성 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 T 세포 또는 NK 세포의 게놈에 통합될 수 있는 생체의 휴지기 T 세포 및/또는 NK 세포로의 전달은 숙주의 림프구를 제거할 필요 없이 생체내 증식을 위한 유발인자를 세포에 제공한다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 대상체는 접촉을 수행한 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 14일, 21일 또는 28일 이내 또는 1개월, 2개월, 3개월 또는 6개월 이내, 접촉 중 및/또는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 대상체에게 다시 재도입된 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 14일, 21일 또는 28일 이내 또는 1개월, 2개월, 3개월 또는 6개월 이내에 림프구 제거제에 노출되지 않는다. 또한, 비제한적인 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 대상체의 휴지기 T 세포 및/또는 휴지기 NK 세포와 접촉하는 단계 동안 및/또는 전체 생체의 방법 동안 림프구 제거제에 대상체를 노출시키지 않고 수행될 수 있다. 그러므로, 생체내에서 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에서 증식시키는 방법은 본 개시내용의 일부 실시형태의 특징이다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 방법은 생체의 증식이 없거나 또는 실질적으로 증식이 없다.

[0273] 본 명세서에 제공된 임의의 양태의 비제한적인 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 후 대상체로부터 혈액을 채취하고 대상체로 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구를 재도입하기까지 이러한 전체 방법/과정은 48시간 미만, 36시간 미만, 24시간 미만, 12시간 미만, 11시간 미만, 10시간 미만, 9시간 미만, 8시간 미만, 7시간 미만, 6시간 미만, 5시간 미만, 4시간 미만, 3시간 미만, 2시간 또는 2시간 미만의 기간에 걸쳐 일어날 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 변형된 림프구의 도입 또는 재도입은 정맥내 주사, 피하 투여 또는 근육내 투여에 의해 수행될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 명세서의 비제한적인 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 후 대상체로부터 혈액을 채취/수집하고 대상체로 변형된 림프구를 재도입하기까지 전체 방법/과정은 1시간 내지 12시간, 2시간 내지 8시간, 1시간 내지 3시간, 2시간 내지 4시간, 2시간 내지 6시간, 4시간 내지 12시간, 4시간 내지 24시간, 8시간 내지 24시간, 8시간 내지 36시간, 8시간 내지 48시간, 12시간 내지 24시간, 12시간 내지 36시간 또는 12시간 내지 48시간의 기간에 걸쳐, 또는 범위의 하한에서 15분, 30분, 60분, 90분, 120분, 180분 및 240분 및 범위의 상한에서 120분, 180 및 240분, 300분, 360분, 420분 및 480분의 기간에 걸쳐 일어난다. 다른 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 후 대상체로부터 혈액을 채취/수집하고 대상체로 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구를 재도입하기까지 전체 방법/과정은 범위의 하한에서 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간 및 12시간 및 범위의 상한에서 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 14시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 48시간의 기간에 걸쳐 일어난다. 일부 실시형태에서, 변형된 및 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 접촉이 발생한 기간 후에 비-관련 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자로부터 분리된다.

[0274] 변형 림프구를 변형시키기 위한 본 명세서에 제공된 방법 및 입양 세포 요법을 수행하기 위한 관련 방법이 선행 방법보다 훨씬 더 짧은 시간에 수행될 수 있기 때문에, 환자 치료 및 안전성뿐만 아니라 제품 제조 가능성의 근본적인 개선이 가능해진다. 따라서, 이러한 과정은 치료적 목적으로 생체내에서 수행될 때 이러한 과정을 승인하는 책임이 있는 규제 기관의 관점에서 유리할 것으로 예상된다. 예를 들어, 대상체를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태의 비제한적인 예에서, 대상체는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 환자에게 재도입되기 전 샘플이 처리되는 전체 시간 동안 혈액 또는 샘플을 처리하는 기기와 동일한 건물(예를 들어, 주입 클리닉) 또는 방에 남아 있을 수 있다. 비제한적인 예시적인 실시형태에서, 대상체는 T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 후 대상체로부터의 혈액 채취/수집에서 대상체로의 혈액의 재도입까지의 전체 방법/과정 동안 처리 중인 혈액 또는 세포의 가시선(line of site) 내에 그리고/또는 100피트, 50피트, 25피트 또는 12피트 내에 또는 거리를 두고 남아 있다. 다른 비제한적인 예시적인 실시형태에서, 대상체는 깨어 있고/있거나 적어도 한 사람이 T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 대상체로부터의 혈액 채취/수집에서 대상체로의 혈액의 재도입까지의 전체 방법/과정 동안 및/또는 지속적으로 처리 중인 대상체의 혈액 또는 세포를 계속 모니터링할 수 있다. 본 명세서에 제공된 개선으로 인해, 입양 세포 요법을 위한 그리고/또는 T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도

입 후 대상체로부터의 혈액 채취/수집에서 대상체로의 혈액의 재도입까지 휴지기 T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입시키기 위한 전체 방법/과정은 인간에 의한 지속적인 모니터링으로 수행될 수 있다. 다른 비제한적인 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 후 대상체로부터의 혈액 채취/수집에서 대상체로의 혈액의 재도입까지의 전체 방법/과정의 어떤 단계에서도 혈액 세포가 사람이 없는 방에서 인큐베이션 되지 않는다. 다른 비제한적인 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 생체의 형질도입 후 대상체로부터의 혈액 채취/수집에서 대상체로의 혈액의 재도입까지의 전체 방법/과정은 대상체의 옆에서 그리고/또는 대상체와 같은 방에서 그리고/또는 대상체의 침대나 의자 옆에서 수행된다. 따라서, 며칠 또는 몇 주에 걸친 길고 값비싼 인큐베이션뿐만 아니라 샘플 식별 혼동을 피할 수 있다. 이는 본 명세서에 제공된 방법이 폐쇄형 및 자동화된 혈액 처리 시스템에 쉽게 적용될 수 있다는 사실에 의해 추가로 제공되며, 여기서 혈액 샘플 및 대상체에게 재도입될 이의 성분은 일회용, 일회용 성분과만 접촉한다.

[0275] 본 명세서에 제공된 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법은 입양 세포 요법을 수행하는 방법의 일부일 수 있다. 전형적으로, 입양 세포 요법을 수행하는 방법은 대상체로부터 혈액을 수집하는 단계 및 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 대상체로 되돌리는 단계를 포함한다. 본 개시내용은 CAR을 사용한 다양한 치료 방법을 제공한다. T 림프구 또는 NK 세포에 존재할 때 본 개시내용의 CAR은 표적 세포에 대한 세포 독성을 매개할 수 있다. 본 개시내용의 CAR은 표적 세포 상에 존재하는 항원에 결합하여, CAR을 생성하도록 유전적으로 변형된 T 림프구 또는 NK 세포에 의한 표적 세포의 살해를 매개한다. CAR의 ASTR은 표적 세포의 표면 상에 존재하는 항원에 결합한다. 본 개시내용은 표적 세포를 살해하거나 또는 이의 성장을 저해하는 방법을 제공하며, 방법은 T 림프구 또는 NK 세포가 표적 세포의 표면 상에 존재하는 항원을 인식하고 표적 세포의 살해를 매개하도록 대상 CAR을 생성하도록 유전적으로 변형된 세포독성 면역 효과기 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포 또는 NK 세포)를 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 표적 세포는 암세포일 수 있고, 예를 들어, 본 명세서의 자가 세포 요법 방법은 일부 예시적인 실시형태에서 암을 치료하는 방법일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 대상체는 암에 걸린 것으로 의심되는 동물 또는 인간, 또는 보다 전형적으로, 암에 걸린 것으로 알려진 대상체일 수 있다.

[0276] 일부 예시적인 실시형태에서, 투여되는 세포 제형 내 세포의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 또는 세포의 1% 내지 90%, 1% 내지 75%, 1% 내지 50%, 1% 내지 25%, 1% 내지 20%, 1% 내지 10%, 5% 내지 90%, 5% 내지 75%, 5% 내지 50%, 5% 내지 25%, 5% 내지 20%, 5% 내지 10%, 10% 내지 90%, 10% 내지 75%, 10% 내지 50%, 10% 내지 25% 또는 10% 내지 20%가 호중구인 실시형태의 경우, 세포는 특히 레트로바이러스 입자와 접촉하여 재도입될 준비가 된 림프구 제제에 호중구가 존재하지 않는 경우 정맥 또는 동맥으로의 주입에 의해, 또는 피하 또는 근육내 투여에 의해 대상체에게 도입 또는 재도입된다. 이러한 실시형태는 본 명세서에서 추가로 상세히 논의되는 바와 같이 하이알루로니데이스와의 공동 투여 또는 순차적 투여를 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포 제형에 존재하며 선택적으로 대상체에게 재주입되거나 또는 피하로 전달되는 림프구 및 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 수는 범위의 하한에서 1×10^3 , 2.5×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 및 1×10^7 개 세포/kg과 범위의 상한에서 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 및 1×10^8 개 세포/kg 사이일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 세포 제형에 존재하며 선택적으로 대상체에게 재주입되거나 또는 그렇지 않으면 전달되는 림프구 및 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 수는 범위의 하한에서 1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 및 1×10^5 개 세포/kg과 범위의 상한에서 2.5×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 및 1×10^6 개 세포/kg 사이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 세포 제형에 존재하며 선택적으로 대상체에게 재주입되거나 또는 그렇지 않으면 전달되는 림프구 및 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 수는 범위의 하한에서 5×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 및 1×10^8 개 세포 및 범위의 상한에서 2.5×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2.5×10^8 , 5×10^8 및 1×10^9 개 세포 사이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 세포 제형에 존재하며 70kg의 대상체 또는 환자로의 주입, 재주입 또는 다른 전달 수단(예를 들어, 피하 전달)에 이용 가능한 림프구 및 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 수는 7×10^5 개 내지 2.5×10^8 개 세포이다. 다른 실시형태에서, 본 명세서의 세포 제형에 존재하며 형질도입에 이용 가능한 림프구 및 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 수는 대략 7×10^6 플러스 또는 마이너스 10%이다.

[0277] T 세포, NK 세포, B 세포 또는 줄기 세포를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 실시형태 및 양태에서, 세포는 자가 세포 또는 동종이계 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포는 유전적으로 조작된 동종이계 세포일 수 있다. 동종이계 T 세포와 같은 동종이계 세포 및 동종이계 세포를 유전적으로 조작하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포가 T 세포인 경우, T 세포는 TCR 복합체의 적어도 하나의 성분이 기능적으로 손상되고/되거나 적어도 부분적으로 결실되도록 유전적으로 조작되었다. 일부 실시형태에서, T 세포는 TCR 복합체의 적어도 하나의 성분의 발현이 감소되거나 또는 제거되도록 유전적으로 조작되었다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포는 B2 마이크로글로불린 유전자의 전부 또는 일부가 누락되도록 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포는 본 명세서에 개시된 임의의 림프증식성 요소 및/또는 CLE를 포함할 수 있다. 림프증식성 요소 및 CLE를 사용하면 필요한 세포의 수를 감소시킬 수 있고, T 세포, NK 세포, B 세포 또는 줄기 세포의 세포 제조를 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포는 불멸화된 세포일 수 있다. 동종이계 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태 또는 실시형태에서, 혈액을 수집하는 단계 또는 접촉 세포를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 단계는 제거될 수 있다. 예를 들어, 대상체를 동종이계 CAR-T 세포로 치료하기 위해, T 세포는 이전에 유전적으로 변형되었을 수 있고, 유전적으로 변형된 동종이계 CAR-T 세포는 대상체로부터 혈액을 수집하지 않고 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포는 피하로 투여된다. 일부 실시형태에서, 동종이계 세포는 정맥내로 투여된다.

[0278] 변형 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 변형시키기 위한 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 대상체의 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도에 관한 양태의 일부 실시형태에서, 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포) 또는 이의 집단이 대상체에게 도입 또는 재도입된다. 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구를 대상체로 도입 또는 재도입하는 것은 당업계에 공지된 임의의 경로를 통할 수 있다. 예를 들어, 도입 또는 재도입은 대상체의 혈관으로 주입을 통해 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포) 또는 이의 집단은 대상체에게 도입 또는 재도입되기 전에 생체외에서 4회 이하의 세포 분열을 겪는다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법에 사용되는 림프구(들)는 1시간 내지 12시간 동안 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉하는 휴지기 T 세포 및/또는 휴지기 NK 세포이다. 일부 실시형태에서, 대상체로부터 혈액이 수집된 시간과 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 전달을 위해 제형화되고/되거나 대상체에게 재도입된 시간 사이에 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 2시간 또는 1시간을 넘지 않는다. 일부 실시형태에서, 혈액이 수집된 후와 혈액이 재도입되기 전 모든 단계는 사람이 처리 전반에 걸쳐 폐쇄형 시스템을 모니터링하는 폐쇄형 시스템에서 수행된다.

[0279] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 일부 실시형태에서, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 추가적인 생체외 조작, 예컨대, T 세포 및/또는 NK의 자극 및/또는 활성화 없이 대상체에게 다시 도입, 재도입, 재주입 또는 그렇지 않으면 전달된다. 선행 방법에서, 생체외 조작은 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 도입하기 전에 T 세포 및/또는 NK 세포의 자극/활성화 및 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식을 위해 사용된다. 선행 방법에서, 이는 일반적으로 며칠 또는 몇 주가 걸리며, 초기 채혈 후 며칠 또는 몇 주에 혈액 주입을 위해 대상체가 클리닉에 방문할 필요가 있다. 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에, 예를 들어, 용액 중 또는, 예를 들어, 항-CD3/항-CD28로 코팅된 비드와 같은 고체 지지체에 부착된 항-CD28에 의한 공동-자극과 조합하여 항-CD3 단독 또는 항-CD3에 대한 노출에 의해 생체외에서 자극되지 않는다. 이와 같이, 생체외 증식이 없는 방법이 본 명세서에 제공된다. 다른 실시형태에서, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 생체외에서 증식되지 않거나 또는 소수의 세포 분열(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5라운드의 세포 분열) 동안에만 증식되지만, 오히려 생체내에서, 즉, 대상체 내에서 증식되거나 또는 우세하게 증식된다. 일부 실시형태에서, 세포의 추가 증식을 허용하는 추가적인 배지가 추가되지 않는다. 일부 실시형태에서, PBL이 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉되는 동안에는 일차 혈액 림프구(PBL)의 세포 제조가 일어나지 않는다. 예시적인 실시형태에서, PBL이 생체외에 있는 동안에는 PBL의 세포 제조가 일어나지 않는다. 입양 세포 요법의 전통적인 방법에서, 대상체는 유전적으로 변형된 T 세포 및 또는 NK 세포로 재주입하기 전에 림프구가 제거된다. 일부 실시형태에서, 환자 또는 대상체는 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 및 또는 NK 세포를 주입 또는 재주입하기 전에 림프구가 제거되지 않는다. 그러나, 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 실시형태는 사전-활성화되거나 또는 사전-자극된 T 세포 및/또는 NK 세포에도 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키기 전에 항-CD28 고체 지지체를 사용하

거나 하지 않고 항-CD3에 노출시킴으로써 생체외에서 자극될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전에 노출을 포함하지 않고, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간 또는 24시간 미만 동안 항-CD3/항-CD28 고체 지지체에 노출될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉되기 전에 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간 또는 8시간 미만 동안 항-CD3/항-CD28 고체 지지체에 노출될 수 있다.

[0280] 양성 선택에 의한 T 세포 및/또는 NK 세포의 농축

[0281] 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 하나 이상의 세포 집단과 같은 입양 세포 요법에 유용한 세포 혼합물의 임의의 세포는 전달을 위한 제형화 전에 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉되기 전에 양성 선택에 의해 농축될 수 있다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은 세포 혼합물이 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉된 후 양성 선택에 의해 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단을 농축시키는 것은 본 명세서에 개시된 임의의 유전적 변형 및 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자를 이용한 유전적 변형의 방법과 동시에 수행될 수 있다.

[0282] 단핵 세포(예컨대, PBMC) 또는 TNC는 본 명세서에 보다 상세히 기재되는 바와 같이 각각 밀도-구배 원심분리 또는 백혈구감소 필터 어셈블리의 역관류에 의해 전혈과 같은 보다 복잡한 세포 혼합물로부터 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 미경험, 효과기, 기억, 억제 T-세포 및/또는 조절 T 세포를 비롯한 NK 세포, T 세포 및/또는 T 세포 서브세트와 같은 특정 세포 계통은 하나 이상의 표면 분자를 발현하는 세포의 선택을 통해 강화될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 표면 분자는 CD4, CD8, CD16, CD25, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CCR7, KIRs, FoxP3 및/또는 TCR 성분, 예컨대, CD3을 포함할 수 있다. 하나 이상의 표면 분자에 대해 지시된 항체에 접합된 비드를 사용하는 방법이 자성, 밀도 및 크기-기반 분리를 사용하여 목적하는 세포를 농축하는데 사용될 수 있다.

[0283] 이러한 항체-기반 양성 선택 방법의 과정에서, 하나 이상의 세포 표면 분자의 결합은 신호 전달 및 결합 세포의 생물학의 변경을 초래할 수 있다. 예를 들어, CD3에 대한 항체가 부착된 비드를 사용한 T 세포의 선택은 CD3 신호 전달 및 T 세포 활성화로 이어질 수 있다. 다른 예에서, 결합 및 신호 전달은 미경험 또는 기억 T 세포와 같은 세포의 추가 세포 분화로 이어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 양성 선택은 목적하는 세포가 접촉되지 않고 오히려 그대로 유지되는 것이 바람직한 경우와 같이 목적하는 세포를 농축시키는데 사용되지 않는다.

[0284] 원치 않는 세포의 제거에 의한 목적하는 세포의 농축

[0285] 전혈, 분리된 TNC 또는 분리된 PBMC로부터의 세포 혼합물은 세포 혼합물에서 목적하는 세포가 농축되도록 고갈된 하나 이상의 원치 않는 세포 집단을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은, 예를 들어, 본 명세서에 제공된 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법에서 제공되는 바와 같이 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉되기 전에 음성 선택에 의해 고갈될 수 있다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은, 예를 들어, 본 명세서에 제공된 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법에서 제공되는 바와 같이 세포 혼합물이 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉된 후 음성 선택에 의해 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단을 고갈시키는 것은 본 명세서에 개시된 유전적 변형 및 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자를 이용한 유전적 변형의 임의의 방법과 동시에 수행될 수 있다.

[0286] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 임의의 비-T 또는 비-NK 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 조절 T 세포 또는 억제 T 세포와 같은 T 세포 또는 NK 세포 서브세트를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 단핵구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 과립구를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 원치 않는 세포는 전달을 위해 제형화된 세포의 집단에서 발현되거나 또는 발현될 CAR에 대한 동족 항원을 발현하는 세포를 포함한다.

[0287] 추가의 예시적인 실시형태에서, 원치 않는 세포는 암세포를 포함한다. 많은 유형의 암으로부터의 암세포는 혈액으로 들어갈 수 있으며, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 림프구와 함께 낮은 빈도로 의도하지 않게 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 암세포는 다음을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 암으로부터 유래될 수 있다: 신세포 암종, 위암, 육종, 유방암, B 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 B-세포 림프종(B-NHL), 신경아세포종, 신경교종, 교아종, 수모세포종, 결장직장암, 난소암, 전립선암, 중피종, 폐암(예를 들어, 소세포

폐암), 흑색종, 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 또는 만성 골수성 백혈병. 예시적인 실시 형태에서, CAR-암세포는 B-세포 림프종으로부터 유래될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 자신의 세포 표면에 발현된 항원에 결합하는 ASTR을 갖는 CAR을 발현하는 암세포, 즉, CAR-발현 암세포는 그 자체가 표적 세포(CAR-암세포)이며, 에피토프 차폐로도 알려진 CAR-T 세포가 항원에 결합하는 것을 차단하여 CAR-암세포의 살해를 방지할 수 있다. CAR-암세포는 CAR-T를 이용한 초기의 성공적인 치료 후에도 CAR-T에 대한 면역으로 암의 재발을 초래할 수 있다(예를 들어, 문헌[Ruella et al. Nat Med. 2018 Oct;24(10):1499-1503 참조]. 원치 않는 암세포를 고갈시키기 위해 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물은 암 환자로부터 분리된 혈액 세포 또는 PBMC와 같은 세포를 유전적으로 변형시킴으로써 야기되는 이러한 위험을 극복한다.

[0288] 단핵구는 표준 플라스틱 조직 배양 플레이트, 나일론 또는 유리솜 또는 세파텍스 수지와 같은 고정된 단핵구-결합 기질과 세포 혼합물의 인큐베이션에 의해 고갈될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 단핵구 더 낮은 빈도 또는 강도로 부착되거나 또는 전혀 부착되지 않는 세포 혼합물 내 다른 세포에 비해 고정된 단핵구-결합 기질에 우선적으로 부착된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 37°C에서 적어도 1시간 동안 수행되거나 또는 세포 혼합물을 수지에 통과시킴으로써 수행될 수 있다. 인큐베이션 후, 현탁액에 있는 목적하는 비-부착 세포는 추가 처리를 위해 수집된다. 림프구 본 명세서에 제공된 림프구의 신속한 생체외 처리의 예시적인 실시형태에서, 전혈, TNC 또는 PBMC는 고정된 단핵구-결합 기질과 함께 적어도 8시간, 7시간, 6시간, 5시간, 4시간, 3시간, 2시간 또는 1시간 동안 인큐베이션 되지 않으며, 단핵구는 이러한 인큐베이션에 의해 고갈되지 않는다.

[0289] 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 방법은 이러한 세포를 제거하기 위해 당업계에서 공지된 방법을 사용하여 하나 이상의 표면 분자를 발현하는 세포의 음성 선택에 의해 원치 않는 세포를 고갈시키는 단계를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 표면 분자는 종양-관련 항원, 종양-특이적 항원이거나, 또는 그렇지 않으면 암세포에서 발현된다. 이러한 표면 분자는 Ax1, ROR1, ROR2, Her2, 전립선 줄기 세포 항원(prostate stem cell antigen: PSCA), PSMA(전립선-특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(B cell maturation antigen: BCMA), 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein: AFP), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen: CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, MUC-1, 상피 막 단백질(epithelial membrane protein: EMA), 상피 종양 항원(epithelial tumor antigen: ETA), 흑색종-관련 항원(epithelial tumor antigen: MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 태반 알칼리 포스파테이스, 사이토글로블린, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EphA2, CSPG4, CD138, FAP(섬유아세포 활성화 단백질), CD171, 카파, 람다, 5T4, α v β 6 인테그린, 인테그린 α v β 3(CD61), 갈락틴, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, EGFR, EpCAM, 태아 AchR, FR α , GD3, HLA-A1+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 루이스-Y, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, TAG72, TEM, VEGFR2, EGFRvIII(표피 성장 인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, TARP(T 세포 수용체 감마 대체 리딩 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선 1의 6개-막관통 상피 항원)을 포함한다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 표면 분자는 CD19, CD20, CD22, CD25, CD32, CD34, CD38, CD123, BCMA 또는 TIM3과 같은 혈액 암 항원이다.

[0290] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 비드 또는 칼럼-기반 분리에 의해 전혈, PBMC 또는 TNC와 같은 세포 혼합물로부터 고갈될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 세포 표면 분자에 대한 리간드 또는 항체는 비드 또는 칼럼에 부착된다. 일부 실시형태에서, 비드에 부착된 항체는 원치 않는 세포가 제거되는 방법에서, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포에 의해 발현되는 사용되는 CAR과 동일한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드에 부착된 항체는 나중에 환자에서 발현될 CAR과 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 비드에 부착된 항체는 CAR과 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 원치 않는 세포의 표면 상의 항원에 결합하는 하나 이상의 부착된 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 서로 다른 항체가 부착된 비드는 조합하여 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 자성 비드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 세포 혼합물과 부착된 항체가 있는 자성 비드의 인큐베이션 후 자성 분리에 의해 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 자성이 아니다.

[0291] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 표면 분자를 발현하는 원치 않는 세포는 항체 코팅된 비드에 의해 전혈, PBMC 또는 TNC와 같은 세포 혼합물로부터 고갈되고, 크기에 의해 분리된다. 일부 실시형태에서, 비드는 폴리스타이렌이다. 예시적인 실시형태에서, 비드는 직경이 적어도 약 30 μ m, 약 35 μ m, 약 40 μ m, 약 50 μ m, 약 60 μ m, 약 70 μ m 또는 약 80 μ m이다. 일부 실시형태에서, 항체 코팅된 비드는 예시적인 실시형태에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터가 세포 혼합물과 인큐베이션되는 시간 동안 세포 혼합물에 첨가된다. 이러한 실시형태에서, 다음을 포함하는 반응 혼합물이 형성된다: (A) 전혈, 농축된 TNC 또는 농축된 PBMC와 같은 세포 혼합물; (B) CAR과 같은 관심 이식 유전자를 암호화하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터; 및 (C) 원치 않는 세포의 표면에 발현되는 하나 이상의 표면 분자 또는 항원에 결합하는 항체 코팅

된 비드. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 또는 45분 미만 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 미만 동안 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 후, 밀도-구배 원심분리-기반 세포 농축 절차는 펠릿이 될 항체 코팅된 비드에 복합체화된 원치 않는 세포가 고갈된 총 단핵 세포를 농축시키기 위해 수행될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 항체 코팅된 비드에 복합체화된 원치 않는 세포를 고갈시키기 위해 더 큰 직경의 메시의 사전-필터를 통과할 수 있다. 일부 실시형태에서, 필터는 비드의 직경보다 더 작거나 또는 약 5 μ m, 10 μ m 또는 15 μ m 더 작은 공극 직경을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 비드는 자성 비드일 수 있고, 사전-필터는 자석일 수 있다. 이러한 필터는 비드에 결합된 원치 않는 세포를 포획하여 목적하는 세포가 하류를 통해 더 작은 공극 직경을 갖는 백혈구감소 필터 어셈블리로 흐르도록 할 수 있다.

[0292] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 적혈구 항체 로세팅(EA-로세팅)에 의해 전혈과 같은 림프구 및 적혈구를 포함하는 세포 조성물로부터 고갈되거나 또는 제거된다. EA-로세팅에서, 원치 않는 세포의 세포 표면 상의 항원에 결합하는 항체는 세포 혼합물과 인큐베이션하여 원치 않는 세포를 적혈구에 가교시킨 다음, RosetteSep™ 키트(스텔셀 테크놀로지스)에 제공되는 것과 같은 밀도 구배 원심분리에 의해 목적하는 세포로부터 분리된다. 일부 실시형태에서, EA-로세팅을 매개하는 항체는 예시적인 실시형태에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터가 세포 혼합물과 함께 인큐베이션되는 시간 동안 세포 혼합물에 첨가된다. 예시적인 실시형태에서, 다음을 포함하는 반응 혼합물이 형성된다: (A) 전혈과 같은 림프구와 적혈구의 세포 혼합물; (B) 관심 이식 유전자, 추가의 예시적인 실시형태에서, CAR을 암호화하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자; (C) 원치 않는 세포의 표면 상의 항원, 예를 들어, 혈액 암 항원 CD19, CD20, CD22, CD25, CD32, CD34, CD38, CD123, BCMA 또는 TIM3과 같은 종양 항원에 대한 제1 항체; (D) 글리코포린 A와 같은 적혈구의 표면 상의 항원에 대한 제2 항체; 및 (E) 제1 항체와 제2 항체를 가교하는 제3 항체. 추가의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 원치 않는 세포의 표면 상의 하나 이상의 항원에 대한 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 CAR과 동일한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 반응 혼합물은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 또는 45분 미만 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 미만 동안 인큐베이션된다. 예시적인 실시형태에서, 인큐베이션 후, 밀도-구배 원심분리-기반 PBMC 농축 절차는 적혈구와 함께 펠릿이 될 EA-로세팅에 의해 고갈되거나 또는 제거되는 집단을 뺀 총 PBMC를 분리하기 위해 수행된다.

[0293] 위에 논의된 바와 같이, CAR을 암호화하는 재조합 핵산 벡터를 사용한 암세포의 유전적 변형은 제형화 및/또는 대상체에 대한 전달 전에, 본 명세서에 제공된 방법에 세포 혼합물로부터 음성 선택에 의한 암세포의 양성 선택 또는 제거의 단계를 포함시킴으로써 T 세포 및/또는 NK 세포의 농축에 의한 세포 처리 동안 최소화될 수 있다. 암세포 CAR 작제물로 유전적으로 변형된 암세포의 잠재적 효과를 감소시키는 몇 가지 추가적인 방법이 본 명세서에 개시된다. 예를 들어, T 세포-특이적 프로모터(본 명세서의 다른 곳에 개시됨)는 CAR을 발현시키는데 사용될 수 있으며, CAR을 암호화하는 외인성 핵산(들)을 포함하는 비-T 세포가 CAR을 실제로 발현하는 것을 방지하는데 도움이 될 수 있다. 따라서, 항원은 시스로(in cis) 발현된 CAR에 의해 차폐되지 않을 것이고, CAR-T 세포는 CAR을 암호화하는 외인성 핵산(들)을 포함하는 표적 세포에 결합하여 이를 죽일 수 있다.

[0294] CAR-암세포의 잠재적 효과를 감소시키는 또 다른 방법은 에피토프 중 하나를 차폐할 수 있는 표적 세포를 죽이기 위해 2개 이상의 별개의 CAR 및 예시적인 실시형태에서, 2개의 세포 집단에서 발현된 2개의 CAR을 사용하는 것이다. 혈액 세포 또는 PBMC와 같은 세포 집단은 별도로 유전적으로 변형되어 각 집단이 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현한다. 예시적인 실시형태에서, 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현하는 표적 세포는 제2 CAR 및 제1 CAR이 각각 결합하는 에피토프를 차폐하지 않는다. 따라서, 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현하는 표적 세포는 제2 CAR 또는 제1 CAR을 각각 발현하는 효과기 T 세포 또는 NK 세포에 의해 살해될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 표적 세포 상에서 발현된 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 항원을 포함하는 동일한 표적 세포 상에서 발현된 상이한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 CD19, CD20, CD22, CD25, CD32, CD34, CD38, CD123, BCMA, TACI 또는 TIM3으로부터 선택되는 상이한 항원 또는 이의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 제1 CAR은 CD19에 결합할 수 있고, 제2 CAR은 CD22에 결합할 수 있으며, 둘 다 B 세포에서 발현된다. 다른 실시형태에서, CAR은 암 항원의 세포외 리간드일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 세포 집단은 별도로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 별개의 세포 제형이 신체의 상이한 부위에서 대상체에게 다시 도입 또는 재도입된다. 일부 실시형태에서, 별개의 세포 제형이 동일한 부위에서 대상체에게 다시 별도로 도입 또는 재도입된다. 다른 실시형태에서, 변형된 세포 집단은 동일한 부위에서 함께 대상체에게 다시 선택적으로 도입 또는 재도입되는 하나의 제형으로 조합된다. 세포 집단이 조합되는 예시적인 실시형태에

서, 세포 집단은 재조합 핵산 벡터로부터 세척되는 세척 단계 이후까지 조합되지 않는다. 2개 이상의 별개의 CAR을 사용하는 이러한 방법에 의해, 시스로 동족 에피토프에 결합하여 이를 차폐하는 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현하는 CAR-암세포는 각각 제2 CAR 또는 제1 CAR을 발현하는 CAR-T 세포에 의해 살해될 것이다.

[0295] 조작된 신호전달 폴리펩타이드(들)

[0296] 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포를 접촉시키는데 사용되는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 하나 이상의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하는 하나 이상의 전사 단위를 갖는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산을 갖는다. 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 하나 이상의 세포내 활성화 도메인, 선택적으로 하나 이상의 조절 도메인(예컨대, 공동-자극 도메인) 및 선택적으로 하나 이상의 T 세포 생존 모티프와 조합된 세포의 도메인(예를 들어, 항원-특이적 표적화 영역 또는 ASTR), 줄기 및 막관통 도메인의 임의의 조합을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 적어도 하나, 둘 또는 모두는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 키메라 림프증식성 요소(CLE)와 같은 림프증식성 요소(LE)이다. 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 적어도 하나, 둘 또는 모두는 조작된 T 세포 수용체(TCR)이다. 일부 실시형태에서, 2개의 신호전달 폴리펩타이드가 이용될 때, 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 다른 하나는 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화한다. 본 명세서에 개시된 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 임의의 도메인에 대해, 예시적인 서열은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 W02019/055946에서 찾을 수 있다. 당업자는 이러한 조작된 폴리펩타이드는 또한 재조합 폴리펩타이드로도 지칭될 수 있음을 인식할 것이다. CAR, 조작된 TCR, LE 및 CLE와 같은 본 명세서에 제공된 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 전형적으로 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물을 사용하여 이러한 신호전달 폴리펩타이드를 발현하도록 조작된 림프구, 특히 T 세포 및 NK 세포, 가장 특히 T 세포 및/또는 NK 세포에 대한 이식 유전자이다.

[0297] 세포의 도메인

[0298] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 특정 결합 쌍의 구성원인 세포의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 세포의 도메인은 사이토카인 수용체 또는 이의 돌연변이체, 또는 호르몬 수용체 또는 이의 돌연변이체의 세포의 도메인일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 돌연변이체 세포의 도메인은 적어도 일부 세포 유형에서 발현될 때 구성적으로 활성화된 것으로 보고되었다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 세포의 및 막관통 도메인은 리간드 결합 영역을 포함하지 않는다. 이러한 도메인은 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 존재하며 B 세포, T 세포 및/또는 NK 세포에서 발현되는 경우 리간드에 결합하지 않는 것으로 여겨진다. 이러한 수용체 돌연변이체의 돌연변이는 세포의 막근접 영역에서 발생할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 본 명세서에 제공된 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 적어도 일부 세포의 도메인(및 일부 세포의- 막관통 도메인)의 돌연변이는 일반적으로 함께 있지 않은 활성화 사슬을 제공함으로써 리간드의 부재하에 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 신호전달을 담당한다. 세포의 도메인의 돌연변이를 포함하는 세포의 도메인에 관한 추가의 실시형태는, 예를 들어, 본 명세서의 림프증식성 요소 부문에서 찾을 수 있다.

[0299] 소정의 예시적인 실시형태에서, 세포의 도메인은 이량체화 모티프를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 이량체화 모티프는 류신 지퍼를 포함한다. 일부 실시형태에서, 류신 지퍼는 jun 폴리펩타이드, 예를 들어, c-jun으로부터 유래된다. 이량체화 모티프를 포함하는 세포의 도메인에 관한 추가의 실시형태는, 예를 들어, 본 명세서의 림프증식성 요소 부문에서 찾을 수 있다.

[0300] 소정의 실시형태에서, 세포의 도메인은 때때로 본 명세서에서 항원 결합 도메인으로 지칭되는 항원-특이적 표적화 영역(ASTR)이다. 특정 결합 쌍은 항원-항체 결합 쌍; 리간드-수용체 결합 쌍; 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 따라서, 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 특정 결합 쌍의 구성원은 항체인 ASTR, 항원, 리간드, 리간드의 수용체 결합 도메인, 수용체, 수용체의 리간드 결합 도메인 및 어피타드를 포함한다.

[0301] 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 ASTR은 임의의 항원-결합 폴리펩타이드일 수 있다. 소정의 실시형태에서, ASTR은 전장 항체, 단일-쇄 항체, Fab 단편, Fab' 단편, (Fab')₂ 단편, Fv 단편 및 2가 단일-쇄 항체 또는 다이어바디와 같은 항체이다.

[0302] 일부 실시형태에서, ASTR은 단일쇄 Fv(scFv)이다. 일부 실시형태에서, 중쇄는 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 경쇄의 N-말단에 위치한다. 다른 실시형태에서, 경쇄는 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 중쇄의 N-말단에 위치한다. 임의의 개시된 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄는 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같은 링커에 의

해 분리될 수 있다. 임의의 개시된 실시형태에서, 중쇄 또는 경쇄는 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 N-말단에 있을 수 있고, 전형적으로 신호 서열 또는 펩타이드와 같은 또 다른 도메인의 C-말단이다.

[0303] 다른 항체-기반 인식 도메인(cAb VHH(낙타과 항체 가변성 도메인) 및 인간화된 버전, IgNAR VH(상어 항체 가변성 도메인) 및 인간화된 버전, sdAb VH(단일 도메인 항체 가변성 도메인) 및 "낙타화된" 항체 가변성 도메인은 조작된 신호전달 폴리펩타이드 및 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 사용하는 방법과 사용하기에 적합하다. 일부 예에서, T 세포 수용체(TCR)는 인식 도메인에 기초한다.

[0304] 자연 발생 T 세포 수용체는 T 세포의 계통에서 고유한 재조합 이벤트에 의해 별도로 생성되는 α -서브유닛 및 β -서브유닛을 포함한다. TCR의 라이브러리는 표적 항원, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 임의의 항원에 대한 선택성에 대해 스크리닝 될 수 있다. 천연 및/또는 조작된 TCR의 스크리닝은 표적 항원에 대한 높은 결합력 및/또는 반응성을 갖는 TCR을 식별할 수 있다. 이러한 TCR이 선택되고, 클로닝 될 수 있으며, 이러한 TCR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 림프구가 조작된 TCR을 발현하도록 림프구 또는 예시적인 실시형태에서, T 세포 또는 K 세포를 유전적으로 변형시키기 위해 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, TCR은 단일쇄 TCR(scTv, $V\alpha V\beta$ 를 포함하는 단일쇄 2개-도메인 TCR)일 수 있다.

[0305] CAR을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태 또는 실시형태에 대한 소정의 실시형태는 내인성 TCR 신호전달 복합체 및 CD3Z 신호전달 경로를 선택(co-opt)하도록 조작된 세포의 도메인을 갖는 CAR을 포함한다. 한 실시형태에서, 키메라 항원 수용체 ASTR은 TCR 복합체 내로의 혼입 및 내인성 CD3Z 사슬을 통한 신호전달을 촉진하기 위해 내인성 TCR 복합체 사슬(예를 들어, TCR 알파, CD3E 등) 중 하나에 융합된다. 다른 실시형태에서, CAR은 TCR 복합체에 결합하는 제1 scFv 또는 단백질 및 표적 항원(예를 들어, 종양 항원)에 결합하는 제2 scFv 또는 단백질을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, TCR은 단일쇄 TCR(scTv, $V\alpha V\beta$ 를 포함하는 단일쇄 2개-도메인 TCR)일 수 있다. 마지막으로, scFv는 또한 특정 MHC/펩타이드 복합체를 인식하기 위해 생성되어 대리 TCR로 작용할 수 있다. 이러한 펩타이드/MHC scFv-결합체는 CAR과 유사한 많은 구성으로 사용될 수 있다.

[0306] 일부 실시형태에서, ASTR은 다중특이성, 예를 들어, 이중특이성 항체일 수 있다. 다중특이성 항체는 적어도 2개의 상이한 부위에 대해 결합 특이성을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 결합 특이성 중 하나는 하나의 표적 항원에 대한 것이고, 다른 하나는 또 다른 표적 항원에 대한 것이다. 소정의 실시형태에서, 이중특이성 항체는 표적 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이중특이성 항체는 또한 표적 항원을 발현하는 세포에 세포독성제를 국재화시키는데 사용될 수 있다. 이중특이성 항체는 전장 항체 또는 항체 단편으로 제조될 수 있다.

[0307] 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드 또는 조작된 TCR에 사용하기에 적합한 ASTR은 다양한 항원-결합 특이성을 가질 수 있다. 일부 경우에, 항원-결합 도메인은 표적 세포에 의해 발현되는(합성되는) 항원에 존재하는 에피토프에 대해 특이적이다. 일례에서, 표적 세포는 암세포 관련 항원이다. 암세포 관련 항원은, 예를 들어, 유방암세포, B 세포 림프종, 예전대, 미만성 큰 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma: DLBCL), 호지킨 림프종 세포, 난소암 세포, 전립선암 세포, 중피종, 폐암 세포(예를 들어, 소세포 폐암 세포), 비-호지킨 B-세포 림프종(B-NHL) 세포, 난소암 세포, 전립선암 세포, 중피종 세포, 폐암 세포(예를 들어, 소세포 폐암 세포), 흑색종 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 만성 림프구성 백혈병 세포, 급성 림프구성 백혈병 세포, 신경아세포종 세포, 신경교종, 교아종, 수모세포종, 결장직장암 세포 등과 관련된 항원일 수 있다. 암세포 관련 항원은 또한 비-암성 세포에 의해 발현될 수 있다.

[0308] 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 ASTR이 결합할 수 있거나 또는 조작된 T 세포 수용체가 결합할 수 있는 항원의 비제한적인 예는, 예를 들어, CD19, CD20, CD38, CD30, ERBB2, CA125, MUC-1, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), CD44 표면 부착 분자, 메소텔린, 암배아 항원(CEA), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), EGFRvIII, 혈관 내피 성장 인자 수용체-2(VEGFR2), 고분자량-흑색종 관련 항원(high molecular weight-melanoma associated antigen: HMW-MAA), MAGE-A1, IL-13R-a2, GD2, Ax1, Ror2, 뉴욕 식도 편평 세포 암종 항원(NYESO1) 등을 포함한다.

[0309] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 특정 결합 쌍의 구성원은 수용체에 대한 리간드인 ASTR이다. 리간드는 호르몬(예를 들어, 에리트로포이에틴, 성장 호르몬, 렙틴 등); 사이토카인(예를 들어, 인터페론, 인터루킨, 소정의 호르몬 등); 성장 인자(예를 들어, 헤레굴린; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 등); 인테그린-결합 펩타이드(예를 들어, 서열 Arg-Gly-Asp(서열번호 1)를 포함하는 펩타이드); 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0310] 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 특정 결합 쌍의 구성원이 리간드인 경우, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 특정 결합 쌍의 제2 구성원의 존재하에 활성화될 수 있되, 특정 결합 쌍의 제2 구성원은 리간드에 대한 수용체이

다. 예를 들어, 리간드가 VEGF인 경우, 특정 결합 쌍의 제2 구성원은 가용성 VEGF 수용체를 포함하는 VEGF 수용체일 수 있다.

[0311] 위에 언급된 바와 같이, 일부 경우에, 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 포함되는 특정 결합 쌍의 구성원은 수용체, 예를 들어, 리간드에 대한 수용체, 공-수용체 등인 ASTR이다. 수용체는 수용체의 리간드-결합 단편일 수 있다. 적합한 수용체는 성장 인자 수용체(예를 들어, VEGF 수용체); 살해 세포 렉틴-유사 수용체 서브패밀리 K, 구성원 1(NKG2D) 폴리펩타이드(MICA, MICB 및 ULB6에 대한 수용체); 사이토카인 수용체(예를 들어, IL-13 수용체; IL-2 수용체; 등); CD27; 천연 세포독성 수용체(natural cytotoxicity receptor: NCR)(예를 들어, NKP30(NCR3/CD337) 폴리펩타이드(HLA-B-관련 전사체 3(BAT3) 및 B7-H6에 대한 수용체); 등); 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0312] ASTR을 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, ASTR은 ASTR을 표적 세포에서 발현되는 표적 분자와 연결하는 중간 단백질로 지시될 수 있다. 중간 단백질은 내인성으로 발현되거나 또는 외인성으로 도입될 수 있고, 천연, 조작 또는 화학적으로 변형될 수 있다. 소정의 실시형태에서, ASTR은 ASTR에 의해 인식되는 태그와 표적 세포에서 발현되는 표적 분자, 전형적으로 단백질 표적 사이에 적어도 하나의 태그된 중간체, 전형적으로 항체-태그 접합체가 포함되도록 하는 항-태그 ASTR일 수 있다. 따라서, 이러한 실시형태에서, ASTR은 태그에 결합하고, 태그는 암세포와 같은 표적 세포 상의 항원에 대해 지시된 항체에 접합된다. 태그의 비제한적인 예는 플루오레세인 아이소티오시아나이트(fluorescein isothiocyanate: FITC), 스트렙타비딘, 바이오틴, 히스티딘, 다이나이트로페놀, 페리딘인 클로로필 단백질 복합체, 녹색 형광 단백질, 피코에리트린(phycoerythrin: PE), 서양고추냉이 퍼옥시테이스, 팔미토일화, 나이트로실화, 알칼리 포스파테이스, 글루코스 옥시테이스 및 말토스 결합 단백질을 포함한다. 이와 같이, ASTR은 태그에 결합하는 분자를 포함한다.

[0313] 줄기

[0314] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 세포 외부에 있으며 ASTR과 막관통 도메인 사이에 개재된 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 부분에 위치하는 줄기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 줄기는 야생형 CD8 줄기 영역(TTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFA(서열번호 2)에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖거나, 야생형 CD28 줄기 영역(FCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKP(서열번호 3))에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖거나 또는 야생형 면역글로불린 중쇄 줄기 영역에 대해 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 조작된 신호전달 폴리펩타이드에서, 사용된 줄기는 항원-특이적 표적화 영역 및 전형적으로 전체 조작된 신호전달 폴리펩타이드가 표적 항원에 대한 증가된 결합을 유지하도록 한다.

[0315] 줄기 영역은 약 4개 아미노산 내지 약 50개의 아미노산, 예를 들어, 약 4개 aa 내지 약 10개 aa, 약 10개 aa 내지 약 15개 aa, 약 15개 aa 내지 약 20개 aa, 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30개 aa, 약 30개 aa 내지 약 40개 aa 또는 약 40개 aa 내지 약 50 aa의 길이를 가질 수 있다.

[0316] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 줄기는 적어도 하나의 시스테인을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 줄기는 서열 Cys-Pro-Pro-Cys(서열번호 4)를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 줄기에 있는 시스테인은 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 줄기와 이황화 결합을 형성하는데 이용될 수 있다.

[0317] 줄기는 당업계에 공지된 면역글로불린 힌지 영역 아미노산 서열을 포함할 수 있으며; 예를 들어, 문헌[Tan et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:162; 및 Huck et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:1779]를 참조한다. 비제한적인 예로서, 면역글로불린 힌지 영역은 임의의 하기 아미노산 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: DKTHT(서열번호 5); CPPC(서열번호 4); CPEPKSCDTPPCPR(서열번호 6)(예를 들어, 문헌[Glaser et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280:41494] 참조); ELKTPGLDTHHT(서열번호 7); KSCDKHTCP(서열번호 8); KCCVDCP(서열번호 9); KYGPCCP(서열번호 10); EPKSCDKHTCPPCP(서열번호 11)(인간 IgG1 힌지); ERKCCVECP(서열번호 12)(인간 IgG2 힌지); ELKTPGLDTHHTCP(서열번호 13)(인간 IgG3 힌지); SPNMVPHAHHAQ(서열번호 14)(인간 IgG4 힌지); 등. 줄기는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열을 갖는 힌지 영역을 포함할 수 있다. 줄기는 야생형(자연 발생) 힌지 영역과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 IgG 1 힌지의 His229는 줄기가 서열 EPKSCDKTYTCPPCP(서열번호 15)를 포함하도록 Tyr로 치환될 수 있다(예를 들어, 문헌[Yan et al. (2012) *J. Biol. Chem.* 287:5891] 참조). 줄기는 인간 CD8로부터 유래

된 아미노산 서열을 포함할 수 있으며; 예를 들어, 줄기는 아미노산 서열: TTTTAPRPPTAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열번호 16) 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0318] 막관통 도메인

[0319] 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 진핵생물 세포막으로의 삽입을 위한 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 ASTR과 공동-자극 도메인 사이에 삽입될 수 있다. 막관통 도메인은 키메라 항원 수용체가 아미노 말단(N-말단)에서 카복실 말단(C-말단)으로 순서대로 ASTR; 줄기; 막관통 도메인; 및 활성화 도메인을 포함하도록 줄기와 공동-자극 도메인 사이에 삽입될 수 있다.

[0320] 진핵생물(예를 들어, 포유동물) 세포의 세포막 내로의 폴리펩타이드의 삽입을 제공하는 임의의 막관통(TM) 도메인은 본 명세서에 개시된 양태 및 실시형태에서 사용하기에 적합하다.

[0321] 본 명세서에 제공된 임의의 양태 또는 실시형태에 적합한 TM 도메인의 비제한적인 예는 임의의 하기 TM 도메인 또는 결합된 줄기 및 TM 도메인의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함한다: a) CD8 알파 TM(서열번호 17); b) CD8 베타 TM(서열번호 18); c) CD4 줄기(서열번호 19); d) CD3Z TM(서열번호 20); e) CD28 TM(서열번호 21); f) CD134(OX40) TM: (서열번호 22); g) CD7 TM(서열번호 23); h) CD8 줄기 및 TM(서열번호 24); 및 i) CD28 줄기 및 TM(서열번호 25).

[0322] 비제한적인 예로서, 본 발명의 양태의 막관통 도메인은 서열번호 17 막관통 도메인에 대해 적어도 80%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 가지거나 또는 이에 대해 100%의 서열 동일성을 가질 수 있거나, 또는 각각 하기의 유전자로부터의 임의의 막관통 도메인에 대해 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다: CD8 베타 막관통 도메인, CD4 개의 막관통 도메인, CD3 제타 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인, CD134개의 막관통 도메인 또는 CD7 막관통 도메인.

[0323] 세포내 활성화 도메인

[0324] 활성화될 때, 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 세포내 활성화 도메인은 전형적으로 하나 이상의 사이토카인의 생산을 유도하고; 세포 사멸을 증가시키며; 그리고/또는 $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포, NKT 세포, $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 호중구의 증식을 증가시킨다. 활성화 도메인은 또한 본 명세서에서 활성화 도메인으로도 지칭된다. 활성화 도메인은 본 명세서에 제공된 CAR 또는 림프증식성 요소에서 사용될 수 있다.

[0325] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인 아래에 기재된 바와 같은 적어도 하나의(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 등) ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 양태의 세포내 활성화 도메인은 CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C, DAP10/CD28 또는 ZAP70 도메인에 대해 적어도 80%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 가질 수 있거나, 또는 이에 대해 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0326] 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 세포내 활성화 도메인은 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)-함유 세포내 신호전달 폴리펩타이드를 포함한다. ITAM 모티프는 YX_1X_2L/I 이되, X_1 및 X_2 는 독립적으로 임의의 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 세포내 활성화 도메인은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, ITAM 모티프는 세포내 활성화 도메인에서 두 번 반복되되, ITAM 모티프의 첫 번째 및 두 번째 경우는 6개 내지 8개의 아미노산, 예를 들어, $(YX_1X_2L/I)(X_3)_n(YX_1X_2L/I)$ 에 의해 서로 분리되고, 여기서 n 은 6 내지 8의 정수이고, 6 내지 8 X_3 각각은 임의의 아미노산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 세포내 활성화 도메인은 3개의 ITAM 모티프를 포함한다.

[0327] 적합한 세포내 활성화 도메인은 ITAM 모티프를 포함하는 폴리펩타이드로부터 유래되는 ITAM 모티프-함유 부분일 수 있다. 예를 들어, 적합한 세포내 활성화 도메인은 임의의 ITAM 모티프-함유 단백질로부터의 ITAM 모티프-함유 도메인일 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 이것이 유래되는 전체 단백질의 전체 서열을 포함할 필요는 없다. 적합한 ITAM 모티프-함유 폴리펩타이드의 예는 CD3Z(CD3 제타); CD3D(CD3 델타); CD3E(CD3 엡실론); CD3G(CD3 감마); CD79A(항원 수용체 복합체-관련 단백질 알파 사슬); CD79B(항원 수용체 복합체-관련 단백질 베타 사슬); DAP12; 및 FCER1G(Fc 엡실론 수용체 I 감마 사슬)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0328] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 T 세포 표면 당단백질 CD3 제타 사슬(CD3Z, T 세포 수용체 T3 제타 사슬, CD247, CD3-제타, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열(2개의 동형 단백질) 중 하나의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성 갖는 도메인을 포함할 수 있고: MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR(서열번호 26) 또는 MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR(서열번호 27), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.
- [0329] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 제타 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열 중 하나의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: RVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR(서열번호 28); RVKFSRSADAPAYQQGQNQL[YNELNLGRREEYDVL]DKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG[YNELQKDKMAEAYSEI]GMKGERRRGKGDGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQALPPR(서열번호 29); NQL[YNELNLGRREEYDVL]DKR(서열번호 30); EGL[YNELQKDKMAEAYSEI]GMK(서열번호 31); 또는 DGL[YQGLSTATKDTYDAL]HMQ(서열번호 32), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.
- [0330] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 T 세포 표면 당단백질 CD3 델타 사슬(CD3D; CD3-델타; T3D; CD3 항원, 델타 서브유닛; CD3 델타; CD3d 항원, 델타 폴리펩타이드(TiT3 복합체); OKT3, 델타 사슬; T 세포 수용체 T3 델타 사슬; T 세포 표면 당단백질 CD3 델타 사슬; 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열 중 하나의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDPGRIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPA TVAGIIVTDVIATLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGNWARNK(서열번호 33) 또는 MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDVRFVNCNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDPGRIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRTADTQALLRNDQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGNWARNK(서열번호 34), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.
- [0331] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 델타 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: DQV[YQPLRDRDDAQYSHL]GGN(서열번호 35), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.
- [0332] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 T 세포 표면 당단백질 CD3 엡실론 사슬(CD3e, T 세포 표면 항원 T3/Leu-4 엡실론 사슬, T 세포 표면 당단백질 CD3 엡실론 사슬, AI504783, CD3, CD3엡실론, T3e 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다:

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRG
SKPEDANFYLYLRARVCENMEMDMSVATIVVDICITGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERPPVPNPDP[YEPIRKQGRDLYSGL]N
QRRI(서열번호 36), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0333] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 엡실론 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: NPD[YEPIRKQGRDLYSGL]NQR(서열번호 37), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0334] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 T 세포 표면 당단백질 CD3 감마 사슬(CD3G, T 세포 수용체 T3 감마 사슬, CD3-감마, T3G, 감마 폴리펩타이드(TiT3 복합체) 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: MEQGGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASRSDKQTLTPNDQL[YQPLKDREDDQYSHL]QGNQLRRN(서열번호 38), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0335] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 CD3 감마 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: DQL[YQPLKDREDDQYSHL]QGN(서열번호 39), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0336] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 CD79A(B-세포 항원 수용체 복합체-관련 단백질 알파 사슬; CD79a 항원(면역글로불린-관련 알파); MB-1 막 당단백질; Ig-알파; 막-결합 면역글로불린-관련 단백질; 표면 IgM-관련 단백질; 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열 중 하나의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTPWPEFLGPGEDPNGTLIIQNVNKS HGGIYVCRVQEGNESYQQSCGYLRVRQPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGILLFCVAVPGTLLLFKRQWQNEKLGLDAGDEYEDENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRGLQGTQYQDVGSLNIGDVQLEKP(서열번호 40) 또는 MPGGPGVLQALPATIFLLFLLSAVYLGPGCQALWMHKVPASLMVSLGEDAHFQCPHNSSNNANVTWWRVLHGNYTPWPEFLGPGEDPNEPPRPFLDMGEGTKNRIITAEGILLFCVAVPGTLLLFKRQWQNEKLGLDAGDEYEDENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRGLQGTQYQDVGSLNIGDVQLEKP(서열번호 41), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0337] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 CD79A 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: ENL[YEGLNLDDCSMYEDI]SRG(서열번호 42), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0338] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 DAP12(TYROBP; TYRO 단백질 타이로신 카이네이스 결합 단백질; KARAP; PLOSL; DNAX-활성화 단백질 12; KAR-관련 단백질; TYRO 단백질 타이로신 카이네이스-결합 단백질; 살해 활성화 수용체 관련 단백질; 살해-활성화 수용체-관련 단백질; 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열 중 하나(4개의 동형 단백질)의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa

내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa 또는 약 150개 aa 내지 약 160개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다:

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQRPYYK(서열번호 43),

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQ(서열번호 44),

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQRPYYK(서열번호 45) 또는

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQRPYYK(서열번호 46), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0339] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 DAP12 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: ESP[YQELQGQRSDVYSDL]NTQ(서열번호 47), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0340] 일부 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 FCER1G(FCRG; Fc 엡실론 수용체 I 감마 사슬; Fc 수용체 감마-사슬; fc-엡실론 RI-감마; fcR감마; fceRI 감마; 높은 친화성 면역글로불린 엡실론 수용체 서브유닛 감마; 면역글로불린 E 수용체, 높은 친화성, 감마 사슬; 등으로도 알려져 있음)로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 아미노산 서열의 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 약 50개 아미노산 내지 약 60개의 아미노산(aa), 약 60개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 80개 aa 또는 약 80개 aa 내지 약 88개의 aa의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: MIPAVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGLVLTLLYCRKIQVRKAAITSYEKSDGV[YTGLSTRNQETETL]KHEKPPQ(서열번호 48), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0341] 마찬가지로, 적합한 세포내 활성화 도메인 폴리펩타이드는 전장 FCER1G 아미노산 서열의 ITAM 모티프-함유 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 하기 서열의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다: DGV[YTGLSTRNQETETL]KHE(서열번호 49), 여기서 ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다.

[0342] 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 세포내 활성화 도메인은 DAP10/CD28 유형 신호전달 사슬을 포함한다. DAP10 신호전달 사슬의 예는 아미노산 서열번호 50이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 활성화 도메인은 서열번호 50의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함한다.

[0343] CD28 신호전달 사슬의 예는 서열번호 51의 아미노산 서열이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 51의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함한다.

[0344] 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 세포내 활성화 도메인은 ZAP70 폴리펩타이드를 포함하며, 예를 들어, 적합한 세포내 활성화 도메인은 서열번호 52의 하기 서열에서 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 또는 서열번호 52의 약 300개 아미노산 내지 약 400개 아미노산, 약 400개 아미노산 내지 약 500개 아미노산 또는 약 500개 아미노산 내지 619개 아미노산의 연속 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다.

[0345] 조절 도메인

[0346] 조절 도메인은 활성화 도메인의 하류 효과를 향상 또는 약화시키거나 또는 반응의 특성을 변경하는 것을 포함하여 조작된 신호전달 폴리펩타이드에서 세포내 활성화 도메인의 효과를 변경할 수 있다. 본 개시내용의 조작된

신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 조절 도메인은 공동-자극 도메인을 포함한다. 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 포함시키기에 적합한 조절 도메인은 약 30개 아미노산 내지 약 70개의 아미노산(aa) 길이를 가질 수 있고, 예를 들어, 조절 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa의 길이를 가질 수 있다. 다른 경우에, 조절 도메인은 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 200개 aa 또는 200개 초과 aa 길이를 가질 수 있다.

[0347] 공동-자극 도메인은 전형적으로 활성화 도메인에 대한 반응의 특성을 향상시키고/시키거나 변경한다. 본 개시내용의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 공동-자극 도메인은 일반적으로 수용체로부터 유래되는 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 동종이량체화된다. 대상 공동-자극 도메인은 막관통 단백질의 세포내 부분일 수 있다(즉, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질로부터 유래될 수 있음). 적합한 공동-자극 폴리펩타이드의 비제한적인 예는 4-1BB(CD137), CD27, CD28, Lck 결합(ICΔ)이 결실된 CD28, ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR 및 HVEM을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 양태의 공동-자극 도메인은 4-1BB(CD137), CD27, CD28, Lck 결합(ICΔ)이 결실된 CD28, ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR 또는 HVEM을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 양태의 공동-자극 도메인은 4-1BB(CD137), CD27, CD28, Lck 결합(ICΔ)이 결실된 CD28, ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR 및 HVEM을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 적합한 공동-자극 폴리펩타이드의 비제한적인 예의 공동-자극 도메인에 대해 적어도 80%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 가질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 양태의 공동-자극 도메인은 4-1BB(CD137), CD27, CD28, Lck 결합(ICΔ)이 결실된 CD28, ICOS, OX40, BTLA, CD27, CD30, GITR 또는 HVEM의 공동-자극 도메인에 대해 적어도 80%, 90% 또는 95%의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0348] 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 포함시키기에 적합한 공동-자극 도메인은 약 30개 아미노산 내지 약 70개의 아미노산(aa) 길이를 가질 수 있고, 예를 들어, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa의 길이를 가질 수 있다. 다른 경우에, 공동-자극 도메인은 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 200 aa 또는 200개 초과 aa의 길이를 가질 수 있다.

[0349] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 CD137(TNFRSF9; CD137; 4-1BB; CDw137; ILA; 등으로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 53의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.

[0350] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 CD28(Tp44로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 54의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.

[0351] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 Lck 결합(ICΔ)이 결실된 막관통 단백질 CD28의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 55의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.

- [0352] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 ICOS(AILIM, CD278 및 CVID1로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 56의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.
- [0353] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 OX40(TNFRSF4, RP5-902P8.3, ACT35, CD134, OX-40, TXGPIL로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. OX40은 각각 (표 1의) 서열번호 296의 잔기 34번 내지 57번 잔기의 p85 PI3K 결합 모티프 및 76번 내지 102번 잔기의 TRAF 결합 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 OX40의 p85 PI3K 결합 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 OX40의 TRAF 결합 모티프를 포함할 수 있다. 서열번호 296의 17번 및 41번 아미노산에 해당하는 라이신은 유비퀴틴 표적화 모티프의 일부로 기능하는 잠재적으로 음성인 조절 부위이다. 일부 실시형태에서, OX40의 공동-자극 도메인에 있는 이러한 라이신 중 하나 또는 둘 모두는 돌연변이된 아르기닌 또는 또 다른 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 57의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30개 aa, 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa 또는 약 45개 aa 내지 약 50개 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 약 20개 aa 내지 약 50개의 aa, 예를 들어, 20개 aa 내지 45개 aa 또는 20개 aa 내지 42개의 aa 길이를 갖는다.
- [0354] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 CD27(S 152, T 14, TNFRSF7 및 Tp55로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 58의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa 또는 약 45개 aa 내지 약 50개의 aa 길이를 갖는다.
- [0355] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 BTLA(BTLA1 및 CD272로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 59의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다.
- [0356] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 CD30(TNFRSF8, DIS166E 및 Ki-1로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 60에서 약 100개 아미노산 내지 약 110개의 아미노산(aa), 약 110개 aa 내지 약 115개 aa, 약 115개 aa 내지 약 120개 aa, 약 120개 aa 내지 약 130개 aa, 약 130개 aa 내지 약 140개 aa, 약 140개 aa 내지 약 150개 aa, 약 150개 aa 내지 약 160개 aa 또는 약 160개 aa 내지 약 185개의 aa의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다.
- [0357] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 막관통 단백질 GITR(TNFRSF18, RP5-902P8.2, AITR, CD357 및 GITR-D로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 61의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.
- [0358] 일부 실시형태에서, 공동-자극 도메인 막관통 단백질 HVEM(TNFRSF14, RP3-395M20.6, ATAR, CD270, HVEA, HVEM, LIGHTR 및 TR2로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. 예를 들어, 적합한 공동-자극 도메인은 서열번호 62의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 둘 다의 공동-자극 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa

내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.

[0359] 링커

[0360] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 임의의 2개의 인접 도메인 사이에 링커를 포함한다. 예를 들어, 링커는 막관통 도메인과 제1 공동-자극 도메인 사이에 있을 수 있다. 또 다른 예로서, ASTR은 항체일 수 있고, 링커는 중쇄와 경쇄 사이에 있을 수 있다. 또 다른 예로서, 링커는 ASTR과 막관통 도메인과 공동-자극 도메인 사이에 있을 수 있다. 또 다른 예로서, 링커는 공동-자극 도메인과 제2 폴리펩타이드의 세포내 활성화 도메인 사이에 있을 수 있다. 또 다른 예로서, 링커는 ASTR과 세포내 신호전달 도메인 사이에 있을 수 있다.

[0361] 링커 펩타이드는 임의의 다양한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 다른 화학 연결이 배제되지는 않지만, 단백질은 일반적으로 가요성 성질의 스페이서 펩타이드에 의해 연결될 수 있다. 링커는 약 1개 내지 약 100개 아미노산 길이 또는 약 1개 내지 약 25개의 아미노산 길이의 펩타이드일 수 있다. 이러한 링커는 합성, 링커-암호화 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 단백질을 커플링함으로써 생성될 수 있다. 어느 정도 가요성이 있는 펩타이드 링커가 사용될 수 있다. 연결 펩타이드는 적합한 링커가 일반적으로 가요성 펩타이드를 생성하는 서열을 가질 것이라는 점을 염두에 두고 사실상 임의의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 글리신 및 알라닌과 같은 작은 아미노산의 사용은 가요성 펩타이드를 생성하는데 유용하다. 이러한 서열의 생성은 당업자에게 일상적이다.

[0362] 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고, 임의의 적합한 상이한 길이, 예컨대, 4개 아미노산 내지 10개 아미노산, 5개 아미노산 내지 9개 아미노산, 6개 아미노산 내지 8개 아미노산 또는 7개 아미노산 내지 8개 아미노산을 포함하여 1개 아미노산(예를 들어, Gly) 내지 20개 아미노산, 2개 아미노산 내지 15개 아미노산, 3개 아미노산 내지 12개 아미노산일 수 있고, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개의 아미노산일 수 있다.

[0363] 예시적인 가요성 링커는 글리신 중합체($(G)_n$), 글리신-세린 중합체(예를 들어, $(GS)_n$), $GSGGS_n$, GGS_n 및 $GGGGS_n$ 을 포함하고, 여기서 n 은 적어도 하나의 정수임), 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체 및 당업계에 공지된 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 이러한 아미노산 모두가 상대적으로 구조화되지 않아서 성분 사이의 중성 테더(tether) 역할을 할 수 있기 때문에 흥미롭다. 글리신 중합체는 글리신이 심지어 알라닌보다 훨씬 더 많은 파이-싸이(phi-psi) 공간에 접근하며 더 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 덜 제한되기 때문에 특히 흥미롭다(문헌[Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)] 참조). 예시적인 가요성 링커는 $GGGGSGGGSGGGGS$ (서열번호 63), $GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS$ (서열번호 64), $GGGSGGGSGGGGS$ (서열번호 65), $GGSG$ (서열번호 66), $GGSGG$ (서열번호 67), $GSGSG$ (서열번호 68), $GSGGG$ (서열번호 69), $GGGSG$ (서열번호 70), $GSSSG$ (서열번호 71) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 당업자는 위에 기재된 임의의 요소에 접합된 펩타이드의 설계는 링커가 가요성 링커뿐만 아니라 가요성이 덜한 구조를 부여하는 하나 이상의 부분을 포함할 수 있도록 전부 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있음을 인식할 것이다.

[0364] 조합

[0365] 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 제공되는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 소정의 조합을 암호화하는 하나 이상의 전사 단위를 갖는다. 본 명세서에 제공된 일부 방법 및 조성물에서, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 T 세포의 형질도입 후 하나 이상의 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 조합을 포함한다. 제1 폴리펩타이드, 제2 폴리펩타이드, 제3 폴리펩타이드 등의 언급은 편의를 위한 것이며, "제1 폴리펩타이드"에 대한 요소 및 "제2 폴리펩타이드"에 대한 요소는 요소가 전형적으로 해당 특정 폴리펩타이드에 대한 추가의 요소 또는 단계에서 단지 참조 및 관계를 위해 제1 또는 제2로 언급되는 상이한 폴리펩타이드에 있다는 것을 의미함이 이해될 것이다.

[0366] 일부 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 결합 항원에 결합할 수 있는 세포의 항원 결합 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 또한 T 세포 생존 모티프 및/또는 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 공동-자극 도메인을 포함하지 않는 반면, 다른 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 공동-자극 도메인을 포함한다.

[0367] 일부 실시형태에서, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 림프증식성 유전자 산물 및 선택적으로 세포의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 또한 다음 중 하나 이상을 포함한다: T 세포 생존 모티프, 세포내 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공동-자극 도메인. 다른 실시형태에서,

2개의 조작된 신호전달 폴리펩타이드가 사용되는 경우, 적어도 하나는 CAR이다.

- [0368] 한 실시형태에서, 하나 이상의 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 T 세포 특이적 프로모터 또는 동일한 전사체 하의 일반적인 프로모터하에 발현되되, 전사체에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 하나 이상의 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosomal entry site: IRE) 또는 하나 이상의 프로테이스 절단 펩타이드를 암호화하는 핵산에 의해 분리된다.
- [0369] 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 2개의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하되, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 제1 항원에 결합할 수 있는 제1 세포외 항원 결합 도메인 및 공동-자극 도메인이 아닌 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 VEGF에 결합할 수 있는 제2 세포외 항원 결합 도메인 및, 예를 들어, 공동-자극 분자의 신호전달 도메인과 같은 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제1 항원은 PSCA, PSMA 또는 BCMA이다. 소정의 실시형태에서, 제1 세포외 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 단편(예를 들어, scFv), 예를 들어, PSCA, PSMA 또는 BCMA에 특이적인 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 소정의 실시형태에서, VEGF에 결합하는 제2 세포외 항원 결합 도메인은 VEGF에 대한 수용체, 즉, VEGFR이다. 소정의 실시형태에서, VEGFR은 VEGFR1, VEGFR2 또는 VEGFR3이다. 소정의 실시형태에서, VEGFR은 VEGFR2이다.
- [0370] 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 2개의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하되, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 세포외 종양 항원 결합 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 항원-결합 도메인을 포함하며, 항원은 혈관형성(angiogenic) 인자 또는 맥관형성(vasculogenic) 인자 및 하나 이상의 공동-자극 분자 신호전달 도메인이다. 혈관형성 인자는, 예를 들어, VEGF 일 수 있다. 하나 이상의 공동-자극 분자 신호전달 모티프는, 예를 들어, CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0371] 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 2개의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하되, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 세포외 종양 항원-결합 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 VEGF에 결합할 수 있는 항원-결합 도메인 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 제1 신호전달 폴리펩타이드 또는 제2 신호전달 폴리펩타이드는 또한 T 세포 생존 모티프를 갖는다. 일부 실시형태에서, T 세포 생존 모티프는 IL-7 수용체(IL-7R)의 세포내 신호전달 도메인, IL-12 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-15 수용체의 세포내 신호전달 도메인, IL-21 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 또는 형질전환 성장 인자 β (TGF β) 수용체 또는 TGF β 유인 수용체(TGF- β -우성-음성 수용체 II(DNRII))의 세포내 신호전달 도메인이거나 또는 이로부터 유래된다.
- [0372] 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 2개의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하되, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 세포외 종양 항원-결합 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하고, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 VEGF에 결합할 수 있는 항원-결합 도메인, IL-7 수용체 세포내 T 세포 생존 모티프 및 CD27, CD28, OX40, ICOS 및 4-1BB 각각으로부터의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0373] 일부 실시형태에서, 신호전달 폴리펩타이드 중 2개 이상이 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화된다. 소정의 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드 중 하나만이 종양-관련 항원 또는 종양-특이적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하고; 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 나머지 각각은 종양-관련 항원 또는 종양-특이적 항원이 아닌 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드 중 2개 이상은 하나 이상의 종양-관련 항원 또는 종양-특이적 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하되, 조작된 신호전달 폴리펩타이드 중 적어도 하나는 종양-관련 항원 또는 종양-특이적 항원에 결합하지 않는 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0374] 일부 실시형태에서, 종양-관련 항원 또는 종양-특이적 항원은 Axl, ROR1, ROR2, Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), PSMA(전립선-특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(BCMA), 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), 암항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), 타이로시네이스, 흑색종-관련 항원(MAGE), CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP), 육안적 낭포증 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란-A(T 림프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육-특이적 액틴(muscle-specific actin: MSA), 신경미세섬유, 뉴런-특이적 에놀레이스(neuron-specific enolase: NSE), 태반 알칼리 포스파테이스, 시냅토피신, 사이로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 피루베이트 카이네이스 동위효소 유형 M2(종양 M2-PK)의 이량체 형태, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EphA2, CSPG4, CD138, FAP(섬유아세포 활성화 단백질), CD171, 카파, 람다,

5T4, α v β 6 인테그린, 인테그린 α v β 3(CD61), 갈락틴, K-Ras(V-Ki-ras2 키르스텐 래트 육종 바이러스 종양 유전자), Ral-B, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, EGFR, EGP2, EGP40, EpCAM, 태아 AchR, FR α , GD3, HLA-A1+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, IL-11R α , IL-13R α 2, 루이스-Y, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, ROR1, 서바이빈, TAG72, TEM, VEGFR2, EGFRvIII(표피 성장 인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파테이스), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 감마 대체 리딩 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선 1의 6개-막관통 상피 항원), 비정상적인 ras 단백질 또는 비정상적인 p53 단백질이다.

[0375] 일부 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 제1 항원에 결합하는 제1 세포의 항원 결합 도메인 및 제1 세포내 신호전달 도메인을 포함하고; 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 제2 항원에 결합하는 제2 세포의 항원 결합 도메인 또는 제2 항원에 결합하는 수용체; 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하되, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 공동-자극 도메인을 포함하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 제1 항원-결합 도메인 및 제2 항원-결합 도메인은 독립적으로 수용체의 항원-결합 부분 또는 항체의 항원-결합 부분이다. 소정의 실시형태에서, 제1 항원 결합 도메인 또는 제2 항원 결합 도메인 중 하나 또는 둘 모두는 scFv 항체 단편이다. 소정의 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드 및/또는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 막관통 도메인을 추가적으로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드 또는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 T 세포 생존 모티프, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 T 세포 생존 모티프를 포함한다.

[0376] 또 다른 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 HER2에 결합하는 제1 세포의 항원 결합 도메인을 포함하고, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 MUC-1에 결합하는 제2 세포의 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0377] 또 다른 실시형태에서, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 제2 세포의 항원 결합 도메인은 인터류킨에 결합한다.

[0378] 또 다른 실시형태에서, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 제2 세포의 항원 결합 도메인은 손상 관련 분자 패턴 분자(damage associated molecular pattern molecule: DAMP; 알라민으로도 알려져 있음)에 결합한다. 다른 실시형태에서, DAMP는 열 충격 단백질, 크로마틴-관련 단백질 고 이동성 그룹 박스 1(chromatin-associated protein high mobility group box 1: HMGB1), S100A8(MRP8 또는 칼그라눌린 A로도 알려져 있음), S100A9(MRP14 또는 칼그라눌린 B로도 알려져 있음), 혈청 아밀로이드 A(serum amyloid A: SAA), 데옥시리보핵산, 아테노신 트라이포스페이트, 요산 또는 헤파린 설페이트이다.

[0379] 소정의 실시형태에서, 상기 제2 항원은 종양 세포에 의해 제시되는 항원에 결합하는 항체 상의 항원이다.

[0380] 일부 실시형태에서, 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 통한 신호 전달 활성화는 비-항원성이지만, 저산소증과 관련이 있다. 소정의 실시형태에서, 저산소증은 저산소증-유도성 인자-1 α (HIF-1 α), HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α 또는 HIF-3 β 의 활성화에 의해 유도된다.

[0381] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 피하 주사에 의해 도입 또는 재도입될 림프구를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키기 위해, 하나 이상의 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 발현은 본 명세서에서 보다 상세히 개시되어 있는 제어 요소에 의해 조절된다.

[0382] 추가적인 서열

[0383] CAR과 같은 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 하나 이상의 추가적인 폴리펩타이드 도메인을 더 포함할 수 있되, 이러한 도메인은 신호 서열; 에피토프 태그; 친화성 도메인; 및, 예를 들어, 항체 검정에 의해 또는 검출 가능한 신호를 생성하는 폴리펩타이드이기 때문에 그 존재 또는 활성이 검출될 수 있는 폴리펩타이드(검출 가능한 마커)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에 제공된 임의의 양태 또는 실시형태에 대한 추가적인 도메인의 비제한적인 예는 하기 기재된 바와 같은 임의의 하기 서열에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인: 신호 서열, 에피토프 태그, 친화성 도메인 또는 검출 가능한 신호를 생성하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0384] 대상 CAR, 예를 들어, 대상 CAR의 제1 폴리펩타이드에서 사용하기에 적합한 신호 서열은 자연 발생 신호 서열, 합성(예를 들어, 인공(man-made)) 신호 서열 등을 비롯한 임의의 진핵생물 신호 서열이다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 신호 서열은 CD8 신호 서열 MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열번호 72)일 수 있다.

[0385] 적합한 에피토프 태그는 헤마글루티닌(HA; 예를 들어, YPYDVPDYA; 서열번호 73); FLAG(예를 들어, DYKDDDDK; 서열번호 74); c-myc(예를 들어, EQKLISEEDL; 서열번호 75) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0386] 친화성 도메인은 결합 파트너, 예를 들어, 식별 또는 정제에 유용한 고체 지지체에 고정된 것과 같이 이와 상호 작용할 수 있는 펩타이드 서열을 포함한다. 히스티딘과 같은 다중 연속 단일 아미노산을 암호화하는 DNA 서열은, 발현된 단백질에 융합될 때, 니켈 세파로스와 같은 수지 칼럼에 높은 친화성 결합에 의해 재조합 단백질의 1단계 정제에 사용될 수 있다. 예시적인 친화성 도메인은 His5(HHHHH; 서열번호 76), HisX6(HHHHHH; 서열번호 77), c-myc(EQKLISEEDL; 서열번호 75), Flag(DYKDDDDK; 서열번호 74), Strep Tag(WSHPQFEK; 서열번호 78), 헤마글루티닌, 예를 들어, HA Tag(YPYDVPDYA; 서열번호 73), GST, 티오레독신, 셀룰로스 결합 도메인, RYIRS(서열번호 79), Phe-His-His-Thr(서열번호 80), 키틴 결합 도메인, S-펩타이드, T7 펩타이드, SH2 도메인, C-말단 RNA 태그, WEAAAREACCRECCARA(서열번호 81), 금속 결합 도메인, 예를 들어, 아연 결합 도메인 또는 칼슘-결합 단백질과 같은 칼슘 결합 도메인, 예를 들어, 칼모둘린, 트로포닌 C, 칼시뉴린 B, 미오신 경쇄, 리커퍼린, S-모둘린, 비시닌, VILIP, 뉴로칼신, 히포칼신, 프리퀀틴, 칼트랙틴, 칼페인 큰-서브유닛, S100단백질, 프브알부민, 칼빈딘 D9K, 칼빈딘 D28K 및 칼레티닌, 인테인, 바이오틴, 스트렙타비딘, MyoD, Id, 류신 지퍼 서열 및 말토스 결합 단백질을 포함한다.
- [0387] 적합한 검출 가능한 신호-생성 단백질은, 예를 들어, 형광 단백질; 생성물로서 검출 가능한 신호를 생성하는 반응을 촉매하는 효소; 등을 포함한다.
- [0388] 적합한 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein: GFP) 또는 이의 변이체, GFP의 청색 형광 변이체(BFP), GFP의 청록색 형광 변이체(CFP), GFP의 황색 형광 변이체(YFP), 향상된 GFP(enhanced GFP: EGFP), 향상된 CFP(ECFP), 향상된 YFP(EYFP), GFPS65T, Emerald, Topaz(TYFP), Venus, Citrine, mCitrine, GFPuv, 불안정화된 EGFP(destabilized ECFP: dEGFP), 불안정화된 ECFP(dECFP), 불안정화된 EYFP(dEYFP), mCFPm, Cerulean, T-Sapphire, CyPet, YPet, mKO, HcRed, t-HcRed, DsRed, DsRed2, DsRed-단량체, J-Red, 이량체2, t-이량체2(12), mRFP1, 포실로포린, 레닐라 GFP, 몬스터 GFP, paGFP, 카에테 단백질 및 킨들링 단백질, 피코빌리단백질 및 B-피코에리트린, R-피코에리트린 및 알로피코사이아닌을 비롯한 피코빌리단백질 접합체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다른 형광 단백질의 다른 예는 mHoneydew, mBanana, mOrange, dTomato, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry, mGrapel, mRaspberry, mGrape2, mPlum(문헌[Shaner et al. (2005) *Nat. Methods* 2:905-909]) 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Matz et al. (1999) *Nature Biotechnol.* 17:969-973]에 기술된 바와 같이 산호충류 종(Anthozoan species)으로부터의 임의의 다양한 형광 및 유색 단백질이 사용하기에 적합하다.
- [0389] 적합한 효소는 서양고추냉이 퍼옥시데이스(HRP), 알칼리 포스파테이스(AP), 베타-갈락토시데이스(GAL), 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게네이스, 베타-N-아세틸글루코사미니데이스, β -글루쿠로니데이스, 인버테이스, 잔틴 옥시데이스, 반딧불이 루시페레이스, 글루코스 옥시데이스(GO) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0390] 안전 스위치(인식 및/또는 제거 도메인)
- [0391] 유해 사례의 경우 주입된 세포의 감소 또는 제거에 영향을 미치기 위해 세포 요법과 함께 사용하기 위한 안전 스위치가 개발되었다. 본 명세서에 제공된 임의의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 본 명세서에 제공된 임의의 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 일부로서 또는 이와 별개로 안전 스위치를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 제공된 임의의 조작된 신호전달 폴리펩타이드, 예를 들어, 피하 주사에 의해 도입 또는 재도입되는 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구의 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 안전 스위치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 임의의 조작된 T 세포는 안전 스위치를 포함할 수 있다.
- [0392] 안전 스위치 기술은 작동 메커니즘에 기초하여 크게 세 그룹으로 분류될 수 있다; 대사(유전자-지시된 효소 전구약물 요법, GDEPT(gene-directed enzyme prodrug therapy)), 이량체화 유도성 세포자멸 신호 및 항체 매개성 세포독성.
- [0393] 일 양태에서, 안전 스위치는 GDEPT이다. 일부 실시형태에서, GDEPT는 단순 포진 바이러스(HSV-TK)로부터 유래된 것과 같은 바이러스 티미딘 카이네이스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. HSV-TK는 서열번호 368의 서열을 갖는 376개 아미노산 단백질이다. 일부 실시형태에서, GDEPT는 무독성 약물 간시클로버(ganciclovir: GCV)를 GCV-트라이포스페이트로 전환하고, DNA 복제를 중단함으로써 세포 사멸을 유도할 수 있는 HSK-TV의 단편이다. 다른 실시형태에서, GDEPT는 사이토신 데아미네이스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 사이토신 데아미네이스는 5-플루오로사이토신(5-FC)을 세포독성 5-플루오로우라실(5-FU)로 전환한다.
- [0394] 일 양태에서, 안전 스위치는 이량체화 유도성 세포자멸 신호를 기반으로 한다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치

는 이량체화의 세포-투과성 화학적 유도인자(chemical inducer of dimerization: CID)의 결합에 의해 매개된 조건부 이량체화가 세포의 세포자멸사를 초래하도록 세포자멸 경로의 성분과 인프레임(in frame) 연결된 유도성 이량체화 도메인으로 구성된 키메라 단백질이다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 Fas 수용체의 세포질 꼬리에 융합되고 미리스토일기에 의해 막에 국재화된 하나 이상의 유도성 이량체화 도메인으로 구성된 유도성 FAS(iFAS)이다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 카스페이스-1 또는 카스페이스-9와 같은 카스페이스에 융합된 하나 이상의 유도성 이량체화 도메인으로 구성된 유도성 카스페이스이다. 일부 실시형태에서, 유도성 이량체화 도메인은 사이클로필린이고, CID는 사이클로스포린 또는 사이클로스포린 유도체이다. 일부 실시형태에서, 유도성 이량체화 도메인은 FKBP이고, CID는 AP1903와 같은 FK-506 이량체 또는 이의 유도체이다.

[0395] 일 양태에서, 안전 스위치는 세포 표면에 발현된 재조합 폴리펩타이드(본 명세서에서 세포 태그로도 지칭됨)에 항체가 결합할 때 항체 매개성 세포독성을 기반으로 한다. 일부 실시형태에서, 항체는 세포 태그에 결합하고, 보체-의존적 세포독성(complement-dependent cytotoxicity: CDC) 및/또는 항체-의존적 세포-매개성 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC)을 유도한다. 일부 실시형태에서, 세포 태그는 myc 또는 FLAG 태그이다. 바람직한 실시형태에서, 세포 태그 폴리펩타이드는 비-면역원성이다.

[0396] 일부 실시형태에서, 세포 태그는 내인성 세포-표면 분자 또는 변형된 내인성 세포-표면 분자를 포함한다. 내인성 세포-표면 분자는 임의의 세포-표면 수용체, 리간드, 당단백질, 세포 부착 분자, 항원, 인테그린 또는 분화 클러스터일 수 있다. 내인성 세포-표면 분자에 대한 변형은 동족 리간드 또는 수용체에 결합하는 세포-표면 분자의 능력을 감소시키는 세포의 도메인에 대한 변형 및/또는 내인성 세포-표면 분자의 천연 신호전달 활성을 감소시키는 세포내 도메인에 대한 변형을 포함한다. 내인성 세포-표면 분자에 대한 변형은 또한 소정의 도메인의 제거 및/또는 이중 단백질 또는 합성 도메인으로부터의 도메인의 포함을 포함한다.

[0397] 일부 실시형태에서, 변형된 내인성 세포-표면 분자는 절단된 타이로신 카이네이스 수용체이다. 일 양태에서, 절단된 타이로신 카이네이스 수용체는, 예를 들어, 미국 특허 제8,802,374호 또는 WO2018226897에 개시되어 있는 바와 같은 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 패밀리의 구성원(예를 들어, ErbB1(HER1), ErbB2, ErbB3 및 ErbB4)이다. 일부 실시형태에서, 세포 태그는 EGFR 구성원의 세포의 도메인을 인식하는 항체에 의해 인식되는 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 태그는 EGFR 패밀리의 구성원의 적어도 20개의 연속 아미노산 또는, 예를 들어, EGFR 패밀리의 구성원의 20개 내지 50개의 연속 아미노산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간 표피 성장 인자 수용체(EGFR)를 포함하는 EGFR 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 막 원위 EGF-결합 도메인 및 세포질 신호전달 꼬리를 포함하지만 항-EGFR 항체에 의해 인식되는 세포의 막 근위 에피토프를 유지하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열의 제거에 의해 구축된다. 예를 들어, 서열번호 82는 EGFR 구성원의 세포의 도메인을 인식하는 항체에 의해 인식되고 적절한 조건하에 결합되는 예시적인 폴리펩타이드이다. 이러한 절단된 EGFR 폴리펩타이드는 때때로 본 명세서에서 eTag로 지칭된다. 예시적인 실시형태에서, eTag는 마투주맙(matuzumab), 네시투무맙(necitumumab), 파니투무맙(panitumumab) 및 예시적인 실시형태에서, 세톡시맙(cetuximab)과 같은 상업적으로 입수 가능한 단일클론 항체에 의해 인식된다. 예를 들어, eTAG는 Erbitux® 매개성 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 경로를 통해 자살 유전자를 가질 가능성이 있는 것으로 입증되었다. 본 개시내용의 발명자들은 렌티바이러스 벡터를 사용하여 PBMC에서 eTag를 성공적으로 발현시켰고, 세톡시맙에 노출된 PBMC에 의한 시험관 내 eTag의 발현이 PBMC에 대한 효과적인 제거 메커니즘을 제공함을 발견하였다.

[0398] 일부 실시형태에서, 변형된 내인성 세포-표면 분자는 TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원의 절단 버전이다. 예를 들어, 저 친화성 신경 성장 인자 수용체(LNGFR 또는 TNFRSF16)의 절단 버전. 인간 LNGFR은 28개 aa의 잔기 신호 펩타이드, 4개의 시스테인이 풍부한 도메인을 포함하는 222개 aa의 세포의 도메인, 22개 aa의 막관통 도메인 및 155개 aa의 세포내 도메인을 포함하는(서열번호 369)의 아미노산 서열을 갖는 단일 통로 유형 I 막관통 당단백질이다. 일부 실시형태에서, 세포-표면 분자는 LNGFR의 전체 세포의 도메인의 아미노산 서열에 대해 또는 서열번호 369의 29번 내지 250번, 65번 내지 250번 또는 108번 내지 250번 잔기와 같은 세포의 도메인의 절단된 단편에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는 에피토프를 포함한다.

[0399] 일부 실시형태에서, 변형된 내인성 세포-표면 분자는 CD20의 버전이다. 인간 CD20 폴리펩타이드는 서열번호 370의 아미노산 서열을 갖는 막-스패닝 4-도메인 서브패밀리 구성원(membrane-spanning 4-domains subfamily A member: MS4A1) 유전자에 의해 암호화되는 다중-통로 막관통 단백질이다. 일부 실시형태에서, CD20은 57번 내지 78번, 85번 내지 105번, 121번 내지 141번 및 189번 내지 209번 아미노산을 포함하는 개의 막관통 도메인 통로를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD20은 79번 내지 84번 및 142번 내지 188번 아미노산을 포함하는 2개의 세포 외 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD20은 1번 내지 56번, 106번 내지 120번 및 210번 내지 297번 아미노산을 포함하는 3개의 세포질 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD20 폴리펩타이드는 야생형 폴리펩타이

드에 비해 다수의 도메인 또는 다수의 부분이 누락될 수 있다. 실시형태에서, CD20 폴리펩타이드는 내인성 CD20의 M1-E263, M117-N214, M1-N214, V82-N214 또는 V82-I186을 포함한다. 실시형태에서, CD20 폴리펩타이드는 서열번호 370의 K142-S185, P160-S185 또는 C167-C183으로부터 선택되는 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다. 예시적인 실시형태에서, 절단된 CD20 버전은 오크렐리주맙(ocrelizumab), 오비누투주맙(obinutuzumab), 오파투무맙(ofatumumab), 이브리투모맙 티우세탄(ibritumomab tiuxetan), 토시투모맙(tositumomab), 우빌리투스맙(ublrituximab) 및 추가의 예시적인 실시형태에서, 리투스맙(rituximab)과 같은 단일클론 항체에 의해 인식되는 에피토프의 적어도 하나의 카피를 포함한다.

[0400] 일부 실시형태에서, 변형된 내인성 세포-표면 분자는 CD52의 버전이다. CD52는 C-말단에서 GPI 앵커에 연결된 12개의 아미노산의 펩타이드로서 인간에서 내인성으로 발생한다. 일부 실시형태에서, GPI는 폴리펩타이드를 세포 표면에 고정시키는데 사용된다. 다른 실시형태에서, CD52는 이중 막관통 도메인을 사용하여 세포 표면에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 절단된 CD52 폴리펩타이드는 HI186(바이오래드(BioRad)), YTH34.5(바이오래드), YTH66.9(바이오래드) 또는 예시적인 실시형태에서, 알렘투주맙(alentuzumab)과 같은 항체에 의해 인식되는 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD52 에피토프는 서열번호 371의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%의 동일성을 갖는다.

[0401] 일부 실시형태에서, 세포 태그 자체는 미리 결정된 결합 파트너 항체에 결합하는 항체이다. 예시적인 실시형태에서, 세포 태그 항체는 항-유전자형 항체(anti-idiotypic antibody)이다. 일부 실시형태에서, 항-유전자형 항체(Ab2)는 Ab1 상의 항원 결합 부위와 구별되는 미리 결정된 결합 파트너 항체(Ab1) 상의 에피토프를 인식한다. 예시적인 실시형태에서, Ab2는 Ab1의 가변 영역에 결합한다. 다른 예시적인 실시형태에서, Ab2는 Ab1의 항원-결합 부위에 결합한다. 소정의 실시형태에서, Ab2는 인간 및 무린을 포함하는 임의의 동물 또는 항체 단편(Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 다이머바디, 이중특이성 항체 및 항체 융합 단백질)을 포함하는 인간화된 또는 키메라 항체 또는 항체 유도체로부터 유래할 수 있다. 소정의 실시형태에서, Ab2는 내인성 막관통 도메인을 통해 세포 표면과 회합된다. 다른 실시형태에서, Ab2는 이중 막관통 도메인 또는 GPI와 같은 막 부착 서열을 통해 세포 표면과 회합된다. 일부 실시형태에서, Ab1은 상업적으로 입수 가능한 단일클론 항체이다. 예시적인 실시형태에서, Ab1은 상업적으로 입수 가능한 단일클론 항체 치료제이다. 추가의 예시적인 실시형태에서, Ab1은 아래 기재되는 바와 같이 ADCC 및/또는 CDC를 매개할 수 있다. 세포주 및 ADCC와 CDC를 매개하는 동족 단일클론 Ab2 항체 상에 디스플레이된 항-유전자형 항체를 포함하는 결합 쌍의 예(및 이의 제조 방법)가 WO2013188864에 제공되어 있다.

[0402] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 또한 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드 또는 세포가 조작된 것으로 표시하거나 또는 표시하는 플래그의 기능을 한다. 이러한 안전 스위치는 PCR, 서던 블롯, RT-PCR, 노던 블롯, 웨스턴 블롯, 조직학 및 유세포 분석을 포함한 표준 실험실 기법을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 유세포 분석에 의한 eTAG의 검출은 마우스에서 T 세포 생착을 위한 생체내 추적 마커로서 본 명세서에서 사용되었다. 다른 실시형태에서, 세포 태그는 칼럼 또는 비드와 같은 고체 기질에 선택적으로 결합된 항체 또는 리간드를 사용하여 조작된 세포를 농축시키는데 사용된다. 예를 들어, 다른 것들은 항-바이오틴 마이크로비드와 함께 면역자기 선택(immunomagnetic selection)에 바이오틴화-세탁시맙을 적용하면 세포 제제에 대한 관찰 가능한 독성이 없이 모집단의 2%의 낮은 순도에서 90% 초과 순도까지 eTAG 함유 작제물로 렌티바이러스에 의해 형질도입된 T 세포를 성공적으로 농축시킨다는 것을 보여주었다.

[0403] 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 CAR도 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드의 일부로서 또는 림프증식성 요소를 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드의 일부로서 또는 CAR과 림프증식성 요소 둘 다를 암호화하는 단일 폴리뉴클레오타이드로서 발현된다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site: IRES) 또는 리보솜 스킵 서열 및/또는 절단 신호에 의해 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 림프증식성 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 분리된다. 리보솜 스킵 및/또는 절단 신호는 당업계에 공지된 임의의 리보솜 스킵 서열 및/또는 절단 신호일 수 있다. 리보솜 스킵 서열은, 예를 들어, 아미노산 서열 GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP(서열번호 83)를 갖는 T2A일 수 있다. 절단 신호 및 리보솜 스킵 서열의 다른 예는 FMDV 2A(F2A); 말 비염바이러스 2A(E2A로 약칭됨); 돼지 테스코바이러스-1 2A(P2A); 및 토세야아시그나 바이러스 2A(T2A)를 포함한다.

[0404] 일부 실시형태에서, 안전 스위치 및 예시적인 실시형태에서, 세포 태그는 CAR에 융합된 융합 폴리펩타이드의 일부로서 발현된다. 다른 실시형태에서, 안전 스위치 및 본 명세서에서 경험적으로 예시된 바와 같은 세포 태그는 림프증식성 요소에 융합되어 발현된다. 이러한 작제물은 특히 본 명세서에 제공된 다른 "공간 절약(space saving)" 요소와 조합하여 별도의 폴리펩타이드와 비교하여 RNA 계층에서 계층 공간을 덜 차지한다는 이점을 제공한다. 하나의 예시적인 실시형태에서, eTag는 c-Jun 도메인의 5' 말단(서열번호 104), CSF2RA로부터의 막관통

도메인(서열번호 129), MPL로부터의 제1 세포내 도메인(서열번호 283) 및 CD40으로부터의 제2 세포내 도메인(서열번호 208)에 융합된 융합 폴리펩타이드로 발현된다. CAR 또는 림프증식성 요소에 융합되지 않은 폴리펩타이드로서 발현되는 경우, 세포 태그는 이의 천연 막 부착 서열을 통해, 또는 GPI-앵커 또는 막관통 서열과 같은 이중 막 부착 서열을 통해 세포막과 회합될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 세포 태그는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 발현되지만, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에서는 발현되지 않는다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드 및 세포는 2개 이상의 안전 스위치를 포함한다.

[0405] 키메라 항원 수용체

[0406] 본 발명의 일부 양태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드이며, 이는 단순화를 위해 본 명세서에서 "CAR"로 지칭된다. 본 개시내용의 CAR은 다음을 포함한다: a) 적어도 하나의 항원-특이적 표적화 영역(ASTR); b) 막관통 도메인; 및 c) 세포내 활성화 도메인. 예시적인 실시형태에서, CAR의 항원-특이적 표적화 영역은 표적 항원에 대한 항체의 scFv 부분이다. 예시적인 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C, DAP10/CD28 또는 ZAP70로부터 유래하고, 일부 추가의 예시적인 실시형태는 CD3z로부터 유래한다. 예시적인 실시형태에서, CAR은 공동-자극 도메인, 예를 들어, 위의 조절 도메인 부문에서 제공된 임의의 공동-자극 도메인을 더 포함하고, 추가의 예시적인 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 4-1BB(CD137), CD28, ICOS, OX-40, BTLA, CD27, CD30, GITR 및 HVEM의 세포내 공동-자극 도메인이다. 일부 실시형태에서, CAR은 위의 막관통 도메인 부문에 열거된 임의의 막관통 도메인을 포함한다.

[0407] 본 개시내용의 CAR은 진핵생물 세포, 예를 들어, 포유동물 세포의 원형질막에 존재할 수 있되, 적합한 포유동물 세포는 세포독성 세포, T 림프구, 줄기 세포, 줄기 세포의 자손, 전구 세포, 전구 세포의 자손 및 NK 세포, NK-T 세포 및 대식세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때, 본 개시내용의 CAR은 소정의 조건에서 ASTR에 결합하는 하나 이상의 표적 항원의 존재하에 활성화된다. 표적 항원은 특정 결합 쌍의 제2 구성원이다. 특정 결합 쌍의 표적 항원은 가용성(예를 들어, 세포에 결합되지 않음) 인자; 표적 세포와 같은 세포의 표면에 존재하는 인자; 고체 표면에 존재하는 인자; 지질 이중층에 존재하는 인자; 동일 수 있다. ASTR이 항체이고, 특정 결합 쌍의 제2 구성원이 항원인 경우, 항원은 가용성(예를 들어, 세포에 결합되지 않음) 항원; 표적 세포와 같은 세포의 표면에 존재하는 항원; 고체 표면에 존재하는 항원; 지질 이중층에 존재하는 항원; 동일 수 있다.

[0408] 일부 실시형태에서, CAR의 ASTR은 세포내 신호전달 도메인과 별개의 폴리펩타이드로 발현된다. 이러한 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두는 본 명세서에 개시된 임의의 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두는 이중 신호 서열 및/또는 이중 막 부착 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 막 부착 서열은 GPI 앵커 부착 서열이다.

[0409] 일부 예에서, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 세포에서 적어도 하나의 핵산의 발현을 증가시킨다. 예를 들어, 일부 경우에, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 하나 이상의 표적 항원의 부재하에 핵산의 전사 수준과 비교하여, 세포에서 적어도 하나의 핵산의 발현을 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 2-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배 또는 10-배 초과하여 증가시킨다.

[0410] 예로서, 본 개시내용의 CAR은 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(ITAM)-함유 세포내 신호전달 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0411] 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 일부 경우에, 세포에 의한 하나 이상의 사이토카인의 생성을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 하나 이상의 표적 항원의 부재하에 세포에 의해 생성된 사이토카인의 양과 비교하여, 세포에 의한 사이토카인의 생성을 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 2-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배 또는 10-배 초과하여 증가시킬 수 있다. 생성이 증가될 수 있는 사이토카인은 인터페론 감마(IFN- γ), 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), IL-2, IL-15, IL-12, IL-4, IL-5, IL-10; 케모카인; 성장 인자; 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0412] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항

원에 의해 활성화될 때, 세포에서 핵산의 전사를 증가시키고 세포에 의한 사이토카인의 생성을 증가시킬 수 있다.

[0413] 일부 예에서, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, CAR의 제1 폴리펩타이드의 항원-결합 도메인이 결합하는 항원을 세포 표면에서 발현하는 표적 세포에 대한 세포에 의한 세포독성 활성을 초래한다. 예를 들어, 진핵생물 세포가 세포독성 세포(예를 들어, NK 세포 또는 세포독성 T 림프구)인 경우, 본 개시내용의 CAR은, 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 세포 표면에서 하나 이상의 표적 항원을 발현하는 표적 세포에 대한 세포의 세포독성 활성을 증가시킨다. 예를 들어, 진핵생물 세포가 NK 세포 또는 T 림프구인 경우, 본 개시내용의 CAR은, 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 하나 이상의 표적 항원의 부재하에 세포의 세포독성 활성과 비교하여, 세포의 세포독성 활성을 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 2-배, 적어도 약 2.5-배, 적어도 약 5-배, 적어도 약 10-배 또는 10-배 초과하여 증가시킨다.

[0414] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 증식 및 확장과 같은 다른 CAR 활성화 관련 이벤트를 초래할 수 있다(증가된 세포 분열 또는 항-세포자멸 반응으로 인해).

[0415] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 CAR은, 진핵생물 세포의 원형질막에 존재할 때 그리고 하나 이상의 표적 항원에 의해 활성화될 때, 세포내 신호전달 조절, 세포 분화 또는 세포 사멸과 같은 다른 CAR 활성화 관련 이벤트를 초래할 수 있다.

[0416] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 CAR은 미세환경 제한적이다. 이러한 특성은 전형적으로 CAR의 ASTR 도메인의 미세환경 제한적 특성의 결과이다. 따라서, 본 개시내용의 CAR은 낮은 결합 친화성을 가질 수 있거나, 또는 예시적인 실시형태에서, 정상적인 생리학적 환경의 조건하에서보다 미세환경의 조건(들)하에서 하나 이상의 표적 항원에 더 높은 결합 친화성을 가질 수 있다.

[0417] 소정의 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 CAR은 세포내 활성화 도메인 외에 공동-자극 도메인을 포함하되, 공동-자극 도메인은, 예를 들어, CLE의 세포내 도메인과 같은 림프증식성 요소(LE)에 대해 본 명세서에 제공된 임의의 세포내 신호전달 도메인이다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 CAR의 공동-자극 도메인은 CLE에 대해 본 명세서에서 확인된 제1 세포내 도메인(P3 도메인) 또는 P3 도메인의 부재하에 본 명세서에서 CLE의 효과적인 세포내 신호전달 도메인으로서 나타나는 P4 도메인이다. 또한, 소정의 예시적인 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CLE에 대해 본 명세서에서 확인된 P3 및 P4 세포내 신호전달 도메인 둘 다를 포함할 수 있다. 소정의 예시적인 하위 실시형태는 CLE에 대해 본 명세서에서 확인된 바와 같이 특히 효과적인 P3 및 P4 파트너 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 공동-자극 도메인은 공동-자극 도메인의 일부로서 또는 추가의 예시적인 실시형태에서, 유일한 공동-자극 도메인으로서 CAR의 ITAM-함유 세포내 도메인과 다르다.

[0418] 본 명세서에서 LE의 효과적인 세포내 도메인으로서 확인된 공동-자극 도메인을 갖는 CAR을 포함하는 이러한 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 본 명세서에 제공된 표 1의 임의의 세포내 신호전달 도메인일 수 있다. 표 1의 임의의 세포내 도메인의 활성 단편은 CAR의 공동-자극 도메인일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, CAR의 ASTR은 scFV를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, CLE의 c-자극성 세포내 도메인 이외에, 이러한 CAR은 예시적인 실시형태에서 CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C인 세포내 활성화 도메인을 포함한다. 또는, 추가의 예시적인 실시형태에서 DAP10/CD28 또는 ZAP70 세포내 활성화 도메인은 CD3z 세포내 활성화 도메인이다.

[0419] 이러한 예시적인 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CSF2RB, CRLF2, CSF2RA, CSF3R, EPOR, GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, LMP1, MPL, MyD88, OSMR 또는 PRLR로부터의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인 또는 이들의 기능적 신호전달 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CSF2RB, CRLF2, CSF2RA, CSF3R, EPOR, GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL13RA1, IL13RA2, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL22RA1, IL31RA, LEPR, LIFR, LMP1, MPL, MyD88, OSMR 또는 PRLR로부터의

신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인 또는 이들의 기능적 신호전달 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CSF2RB, CSF2RA, CSF3R, EPOR, IFNGR1, IFNGR2, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL2RA, IL2RG, IL5RA, IL6R, IL9R, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA2, IL15RA, IL17RD, IL21R, IL23R, IL27RA, IL31RA, LEPR, MPL, MyD88 또는 OSMR로부터의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인 또는 이들의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CSF2RB, CSF3R, IFNAR1, IFNGR1, IL2RB, IL2RG, IL6ST, IL10RA, IL12RB2, IL17RC, IL17RE, IL18R1, IL27RA, IL31RA, MPL, MyD88, OSMR 또는 PRLR로부터의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인 또는 이들의 기능적 신호전달 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CSF2RB, CSF3R, IFNGR1, IL2RB, IL2RG, IL6ST, IL10RA, IL17RE, IL31RA, MPL 또는 MyD88로부터의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인 또는 이들의 기능적 신호전달 단편을 포함할 수 있다.

[0420] 일부 실시형태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CSF3R, IL6ST, IL27RA, MPL 및 MyD88로부터의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인 또는 이들의 단편을 포함할 수 있다. 소정의 예시적인 하위 실시형태에서, CAR의 세포내 활성화 도메인은 CD3z로부터 유래된다.

[0421] 제조합 T 세포 수용체(TCR)

[0422] T 세포 수용체(TCR)는 세포내뿐만 아니라 세포의 단백질로부터 유래된 특정 단백질 단편을 인식한다. 단백질이 펩타이드 단편으로 분해되는 경우, 이는 주요 조직적합성 복합체 또는 MHC라고 하는 또 다른 단백질과 함께 세포 표면에 제시되며, 이는 인간에서 HLA(인간 백혈구 항원) 복합체라고 한다. 척추동물에서 세 가지 상이한 T 세포 항원 수용체 조합은 $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR 및 pre-TCR이다. 이러한 조합은 α TCR 서브유닛 및 β TCR 서브유닛, γ TCR 서브유닛 및 δ TCR 서브유닛, 그리고 pre-TCR의 경우, pT α 서브유닛 및 β TCR 서브유닛과 같은 이량체화 하위유형의 구성원 간의 이량체화에 의해 형성된다. TCR 서브유닛 세트는 MHC의 맥락에서 제시된 표적 펩타이드 단편을 이량체화하고 인식한다. pre-TCR은 미성숙 $\alpha\beta$ T 세포의 표면에만 발현되는 반면, $\alpha\beta$ TCR은 성숙 $\alpha\beta$ T 세포 및 NK T 세포의 표면에서 발현되고, $\gamma\delta$ TCR은 $\gamma\delta$ T 세포의 표면에서 발현된다. T 세포의 표면의 $\alpha\beta$ TCR은 MHC I 또는 MHC II에 의해 제시된 펩타이드를 인식하고, NK T 세포의 표면의 $\alpha\beta$ TCR은 CD1에 의해 제시된 지질 항원을 인식한다. $\gamma\delta$ TCR은 MHC 및 MHC-유사 분자를 인식할 수 있고, 또한 바이러스 당단백질과 같은 비-MHC 분자를 인식할 수 있다. 리간드 인식시, $\alpha\beta$ TCR 및 $\gamma\delta$ TCR은 T 세포 증식 및 사이토카인 분비를 자극하는 CD3제타 사슬을 통해 활성화 신호를 전달한다.

[0423] TCR 분자는 V 영역에 항원-특이적 존재를 갖는 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속하며, 여기서 CDR3은 CDR1 및 CDR2보다 더 많은 가변성을 가지고, TCR의 항원 결합 특이성을 직접 결정한다. MHC-항원 펩타이드 복합체가 TCR에 의해 인식될 때, CDR1 및 CDR2는 MHC 분자 항원 결합 채널의 측벽을 인식하여 결합하고, CDR3은 항원성 펩타이드에 직접 결합한다. 따라서, 제조합 TCR은 MHC에 제시된 중앙-특이적 단백질 단편을 인식하도록 조작될 수 있다.

[0424] 따라서, 공통 HLA를 갖는 특정 펩타이드를 인식하는 인간 TCR α 및 TCR β 쌍으로부터 유래되는 것과 같은 제조합 TCR은 중앙 특이적 단백질에 특이적으로 생성될 수 있다(문헌[Schmitt, TM et al., 2009]). 제조합 TCR의 표적은 본 명세서에 제공된 CAR ASTR에 대한 임의의 항원 표적으로부터 유래되는 펩타이드일 수 있지만, 보다 일반적으로 중앙태아 항원과 같은 세포내 중앙 특이적 단백질, 또는 정상적인 세포내 단백질 또는 기타 암 특이적 신생에피토프의 돌연변이된 변이체로부터 유래된다. TCR 서브유닛의 라이브러리는 표적 항원에 대한 선택성에 대해 스크리닝 될 수 있다. 천연 및/또는 제조합 TCR 서브유닛의 스크리닝은 표적 항원에 대한 높은 결합력 및/또는 반응성을 갖는 TCR 서브유닛의 세트를 식별할 수 있다. TCR 서브유닛의 이러한 세트의 구성원은 TCR 서브유닛을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 생성하도록 선택되고 클로닝 될 수 있다.

[0425] 이러한 TCR 서브유닛의 세트를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 림프구가 제조합 TCR을 발현하도록 림프구 또는 예시적인 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키기 위해 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자에 포함될 수 있다. 따라서, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 CAR인 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 또는 실시형태에서, CAR은 $\gamma\delta$ TCR 사슬 또는 예시적인 실시형태에서, $\alpha\beta$ TCR 사슬의 세트로 대체될 수 있다. 세트를 형성하는 TCR 사슬은 CAR 및 림프증식성 요소와 같은 2개 이상의 다른 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 발현하기 위해 본 명세서에 개시된 바와 같이 2개의 TCR

사슬을 공동-발현시키기 위해 다수의 상이한 기법을 사용하여 공동-발현될 수 있다. 예를 들어, 2A 프로테이스, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 및 별도의 프로모터와 같은 프로테이스 절단 에피토프가 사용될 수 있다.

[0426] 혼합된 TCR 이량체 형성의 가능성을 줄이기 위해 여러 전략이 사용되었다. 일반적으로, 이는 TCR α 및 TCR β 사슬의 불변(C) 도메인을 변형시켜 서로 도입된 TCR 사슬의 우선적인 페어링을 촉진하는 동시에 내인성 TCR 사슬과 성공적으로 페어링될 가능성을 낮추는 것을 포함한다. 시험관내에서 일부 가능성을 보여준 한 가지 접근법은 인간 TCR α 및 TCR β 사슬의 C 도메인을 마우스 대응물로 대체하는 것을 포함한다. 또 다른 접근법은 자가-페어링 또는 바이러스 유전자 작체물 내에서 내인성 TCR 알파 및 TCR 베타 miRNA의 발현을 촉진하기 위해 인간 TCR α 공통 도메인 및 TCR β 사슬 공통 영역의 돌연변이를 포함한다. 따라서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드로서 TCR 사슬의 하나 이상의 세트를 포함하는 본 명세서에 제공된 일부 실시형태에서, TCR 사슬의 세트의 각 구성원, 예시적인 실시형태에서, $\alpha\beta$ TCR 사슬은 서로 우선적인 페어링을 촉진하는 변형된 불변 도메인을 포함한다. 일부 하위 실시형태에서, TCR 사슬의 세트의 각 구성원, 예시적인 실시형태에서, $\alpha\beta$ TCR 사슬은 TCR 사슬의 세트의 서로에 대한 이량체화가 인간 TCR 사슬을 이용한 이량체화보다 선호되거나 또는 이를 제외하고 발생하도록 동일한 TCR 사슬 유형으로부터의 마우스 불변 도메인 또는 동일한 TCR 사슬 하위유형의 마우스 불변 도메인으로부터 유래되는 충분한 서열을 갖는 동일한 TCR 사슬 하위유형으로부터의 불변 도메인을 포함한다. 다른 하위 실시형태에서, TCR 사슬의 세트의 각 구성원, 예시적인 실시형태에서, $\alpha\beta$ TCR 사슬은 TCR 사슬의 세트의 서로에 대한 이량체화가 인간 불변 도메인을 갖는 TCR 사슬을 사용한 이량체화보다 선호되거나 또는 이를 제외하고 발생하도록 불변 도메인에 상응하는 돌연변이를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 선호되거나 또는 배타적인 이량체화는 생리학적 조건하에 있다.

[0427] 조작된 신호전달 폴리펩타이드로서 TCR 사슬의 하나 이상의 세트를 포함하는 본 명세서에 제공된 일부 실시형태에서, TCR 사슬의 하나 이상의 세트 각각의 구성원의 불변 영역이 교환된다(swapped). 따라서, 세트의 α TCR 서브유닛은 β TCR 불변 영역을 갖고, 세트의 β TCR 서브유닛은 α TCR 불변 영역을 갖는다. 이론에 제한되지 않고, 이러한 교환은 내인성 대응물과의 잘못된 페어링을 방지할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0428] 림프증식성 요소

[0429] 말초 T 림프구 수는 계속되는 세포 추가에도 불구하고, 항원 조우에 대한 반응으로 흉선으로부터의 이동과 증식 및 항원 제거 후 항원-특이적 효과기의 제거로 인한 세포의 손실로 인해 성년기 전면에 걸쳐 현저하게 안정적인 수준으로 유지된다(문헌[Marrak, P. et al. 2000. *Nat Immunol* 1:107-111; Freitas, A.A. et al. 2000. *Annu Rev Immunol* 18:83-111]). 말초 T 세포 구획의 크기는 증식과 생존 모두에 영향을 미치는 여러 요인에 의해 조절된다. 그러나, 림프구감소 환경에서, T 림프구는 말초 T 세포 구획의 크기를 유지하는 "급성 항상성 증식" 메커니즘으로 인해 동족 항원과 독립적으로 분열한다. 림프구감소를 위한 조건은 T 세포 시험관내에서 T 세포를 증식시키고, 이를 림프구가 제거된 대상체에게 도입하여 이식된 T 세포의 향상된 생착 및 항종양 기능을 초래함으로써 입양 세포 요법 동안 대상체 또는 환자에서 확립된다. 그러나, 대상체의 림프구 제거는 면역 기능장애 및 사멸을 비롯한 심각한 부작용을 유발할 수 있으므로 바람직하지 않다.

[0430] 연구는 림프구 제거가 항상성 사이토카인에 대한 세포 싱크(sink) 역할을 하는 내인성 림프구를 제거하고, 이에 의해 사이토카인이 유리되어 입양으로 이식된 세포의 생존 및 증식을 유도함을 보여준다. 예를 들어, IL-7 및 IL-15와 같은 일부 사이토카인은 T 세포의 항원-비의존적 증식을 매개하는 것으로 알려져 있으므로, 비-림프구 감소 환경에서 항상성 증식을 유도할 있다. 그러나, 이러한 사이토카인 및 이의 수용체는 항상성에서 림프증식성 장애를 예방하는 고유한 제어 메커니즘을 갖는다.

[0431] 본 명세서에 제공된 많은 실시형태는 전형적으로 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 일부로서 림프증식성 요소 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 피하 주사에 의해 도입 또는 재도입될 림프구를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키기 위한 본 발명의 일부 양태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 키메라 림프증식성 요소(CLE)와 같은 림프증식성 요소(LE)이다. 전형적으로, LE는 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 증식을 유도하는 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인, 예시적인 실시형태에서, 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0432] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 제1 및/또는 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 세포내 신호전달 도메인은 CD2, CD3D, CD3E, CD3G, CD4, CD8A, CD8B, CD27, 돌연변이된 델타 Lck CD28, CD28, CD40, CD79A, CD79B, CRLF2, CSF2RB, CSF2RA, CSF3R, EPOR, FCER1G, FCGR2C, FCGR2A, GHR, ICOS, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2,

IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, LMP1, MPL, MYD88, OSMR, PRLR, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 제1 세포내 신호전달 도메인은 MyD88, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 제1 세포내 신호전달 도메인은 MyD88, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있고, 제2 세포내 신호전달 도메인은 ICOS, TNFRSF4 또는 TNFRSF18, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 세포내 도메인은 MyD88이고, 제2 세포내 도메인은 ITAM-함유 세포내 도메인, 예를 들어, CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C, DAP10/CD28 또는 ZAP70으로부터의 세포내 도메인이다. 일부 실시형태에서, 제2 세포내 신호전달 도메인은 TNFRSF18, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다.

[0433] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외 도메인과 막관통 도메인의 융합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 도메인과 막관통 도메인의 융합은 eTAG IL7RA Ins PPCL(인터류킨 7 수용체), Myc LMP1, LMP1, eTAG CRLF2, eTAG CSF2RB, eTAG CSF3R, eTAG EPOR, eTAG GHR, Fn F523C IL27RA 이후 절단된 eTAG 또는 Fn S505N MPL 이후 절단된 eTAG, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 도메인은 카복시 말단에 0개, 1개, 2개, 3개 또는 4개의 추가적인 알라닌이 있는 세포 태그를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포외 도메인은 카복시 말단에 0개, 1개, 2개, 3개 또는 4개의 추가적인 알라닌이 있는 Myc 또는 eTAG, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 세포 태그를 포함하는 본 명세서에 개시된 림프증식성 요소의 임의의 실시형태에 대해, 동일하지만 세포 태그가 결여되어 있고, 선택적으로 세포 태그를 림프증식성 요소에 연결시킨 임의의 링커 서열이 결여된 상응하는 실시형태가 있다.

[0434] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD2, CD3D, CD3E, CD3G, CD3Z CD247, CD4, CD8A, CD8B, CD27, CD28, CD40, CD79A, CD79B, CRLF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, EPOR, FCER1G, FCGR2C, FCGR2A, GHR, ICOS, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL7RA Ins PPCL, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, MPL, OSMR, PRLR, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다.

[0435] 본 명세서의 임의의 양태 또는 실시형태에 사용하기 위한 CLE는 W02019/055946(그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 인용됨)에 개시된 임의의 CLE를 포함할 수 있고, 이 중 대다수는 구성적으로 활성이 되도록 설계되었으며 구성적으로 활성인 것으로 여겨진다. 일부 실시형태에서, 구성적으로 활성인 신호전달 경로는 Jak1, Jak2, Jak3 및 Tyk2를 포함하는 Jak/Stat 경로 및 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, STAT6 및 예시적인 실시형태에서, STAT3 및/또는 STAT5와 같은 STAT의 활성화를 포함한다. 일부 실시형태에서, CLE는 하나 이상의 STAT-활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CLE는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 STAT-활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 STAT-활성화 도메인 중 적어도 하나는 당업계에서 공지되어 있는 바와 같은 BLNK, IL2RG, EGFR, EpoR, GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNAR1/2, IFNLR1, IL10R1, IL12Rb1, IL12Rb2, IL21R, IL2Rb, IL2small, IL7R, IL7Ra, IL9R, IL15R 및 IL21R이거나 또는 이들로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 STAT-활성화 도메인은 2개 이상의 상이한 수용체이거나 또는 이로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 구성적으로 활성인 신호전달 경로는 TRAF3, TRAF4, TRAF7 및 예시적인 실시형태에서, TRAF1, TRAF2, TRAF5 및/또는 TRAF6과 같은 TNF 수용체 관련 인자의 활성화를 통한 TRAF 경로의 활성화를 포함한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 본 명세서의 임의의 키트, 방법, 용도 또는 조성물에 사용하기 위한 림프증식성 요소는 구성적으로 활성이며, Jak/Stat 경로 및/또는 TRAF 경로를 활성화하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 본 명세서에 예시된 바와 같이, CLE의 제1 및 제2 세포내 신호전달 도메인이 있는 경우, 제1 세포내 신호전달 도메인은 막 관련 모티프와 제2 세포내 도메인 사이에 위치한다.

[0436] 또 다른 실시형태에서, LE는 생체내에서 T 세포 증식을 유도하는 특성을 제공하고/하거나 가질 수 있다(또는 LE로 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이러한 특성을 제공할 수 있고, 이에 대해 적합화되고, 이를 가지고/가지거나 이를 위해 변형됨).

[0437] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 표 1에 열거된 임의의 서열(서열번호 84 내지 302)을 포함할 수 있다. 표 1은 CLE에서 테스트된 도메인의 일부, 명칭(유전자명 포함) 및 아미노산 서열을 보여준다. CLE는 소정의 예

시적인 실시형태에서, 세포의 도메인(P1로 표시됨), 막관통 도메인(P2로 표시됨), 제1 세포내 도메인(P3으로 표시됨) 및 제2 세포내 도메인(P4로 표시됨)을 포함할 수 있다. 전형적으로, 림프증식성 요소는 제1 세포내 도메인을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 제1 세포내 도메인은 S036 내지 S0216으로 또는 표 1에 열거된 임의의 부분, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 제2 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 제2 세포내 도메인은 S036 내지 S0216으로 또는 표 1에 열거된 임의의 부분, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포의 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 세포의 도메인은 표 1에서 M001 내지 M049 또는 E006 내지 E015로 열거된 부분의 임의의 서열, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 막관통 도메인은 표 1에서 M001 내지 M049 또는 T001 내지 T082로 열거된 임의의 부분, 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외/막관통 도메인(표 1에서 M001 내지 M049), 제1 세포내 도메인(표 1에서 S036 내지 S0216) 및 제2 세포내 도메인(표 1에서 S036 내지 S216)의 융합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외 도메인(표 1에서 E006 내지 E015), 막관통 도메인(표 1에서 T001 내지 T082), 제1 세포내 도메인(표 1에서 S036 내지 S0216) 및 제2 세포내 도메인(표 1에서 S036 내지 S0216)의 융합일 수 있다. 예를 들어, 림프증식성 요소는 E006, T001, S036 및 S216의 융합(E006-T001-S036-S216로도 기재됨)일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 융합 E010-T072-S192-S212, E007-T054-S197-S212, E006-T006-S194-S211, E009-T073-S062-S053, E008-T001-S121-S212, E006-T044-S186-S053 또는 E006-T016-S186-S050일 수 있다.

[0438] 예시적인 실시형태에서, LE의 세포내 도메인 또는 2개 이상의 세포내 도메인을 갖는 LE의 제1 세포내 도메인은 ITAM-함유 세포내 도메인, 예를 들어, CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C, DAP10/CD28 또는 ZAP70 및 추가의 예시적인 하위 실시형태에서, CD3z로부터의 세포내 도메인으로부터의 기능적 세포내 활성화 도메인과 다르다. 예시적인 실시형태에서, LE의 제2 세포내 도메인은 4-1BB(CD137), CD28, ICOS, OX-40, BTLA, CD27, CD30, GITR 및 HVEM의 공동-자극 도메인과 다르다. 예시적인 실시형태에서, LE의 세포외 도메인은 단일-쇄 가변성 단편(scFv)을 포함하지 않는다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 결합 파트너에 결합시 LE를 활성화하는 LE의 세포외 도메인은 단일-쇄 가변성 단편(scFv)을 포함하지 않는다.

[0439] CLE는 ASTR, 및 CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C, DAP10/CD28 또는 ZAP70로부터의 활성화 도메인을 모두 포함하지 않는다. 이론에 제한되지 않고, 세포외 도메인 및 막관통 도메인은 LE에서 지원 역할을 하는 것으로 여겨지며, 이는 세포내 신호전달 도메인(들)이 증식을 유도하기 위한 효과적인 형태/배향/국재화에 있음을 보장한다. 따라서, 증식을 유도하는 LE의 능력은 LE의 세포내 도메인(들)에 의해 제공되는 것으로 여겨지며, 세포외 및 막관통 도메인은 세포내 도메인(들)에 비해 2차 역할을 하는 것으로 여겨진다. 림프증식성 요소는 막-관련 모티프(예를 들어, 막관통 도메인)를 통해 막과 회합된 T 세포 또는 NK 세포의 증식을 유도할 수 있으며 활성화 형태로 지향되거나 또는 지향될 수 있는 신호전달 폴리펩타이드인 세포내 도메인을 포함한다. 예시적인 실시형태에서 LE의 ASTR은 scFv를 포함하지 않는다. 세포내 도메인을, 예컨대, 막관통 도메인, GPI 앵커, 미리스토일화 영역, 팔미토일화 영역 및/또는 프레닐화 영역을 포함시킴으로써 막과 회합시키기 위한 전략이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외 도메인을 포함하지 않는다.

[0440] LE의 세포외 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 도메인은 각각의 아미노산 길이가 다를 수 있다. 예를 들어, 복제 불능 레트로바이러스 입자를 포함하는 실시형태의 경우, 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 길이에 제한이 있으므로 보다 짧은 아미노산 서열을 갖는 LE가 소정의 예시적인 실시형태에서 유리할 수 있다. 일부 실시형태에서, LE의 전체 길이는 3개 내지 4000개의 아미노산, 예를 들어, 10개 내지 3000개, 10개 내지 2000개, 50개 내지 2000개, 250개 내지 2000개의 아미노산, 예시적인 실시형태에서, 50개 내지 1000개, 100개 내지 1000개 또는 250개 내지 1000개의 아미노산일 수 있다. 세포외 및 막관통 도메인을 형성하기 위해 존재할 때 세포외 도메인은 1개 내지 1000개의 아미노산이고, 전형적으로 4개 내지 400개, 4개 내지 200개, 4개 내지 100개, 4개 내지 50개, 4개 내지 25개 또는 4개 내지 20개의 아미노산일 수 있다. 한 실시형태에서, 세포외 영역은 본 발명의 이러한 양태의 세포외 및 막관통 도메인에 대한 GGGG이다. 세포외 및 막관통 도메인의 막관통 도메인 또는 막관통 영역은 10개 내지 250개의 아미노산이고, 보다 전형적으로 적어도 15개의 아미노산 길이일 수 있으며, 예를 들어, 15개 내지 100개, 15개 내지 75개, 15개 내지 50개, 15개 내지 40개 또는 15개 내지 30개의 아미노산 길이일 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은, 예를 들어, 10개 내지 1000개, 10개 내지 750개, 10개 내지 500개, 10개 내지 250개 또는 10개 내지 100개의 아미노산일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 30개 또는 30개 내지 500개, 30개 내지 250개, 30개 내지 150개, 30개

내지 100개, 50개 내지 500개, 50개 내지 250개, 50개 내지 150개 또는 50개 내지 100개의 아미노산일 수 있다. 일부 실시형태에서, 특정 유전자에 대한 세포내 신호전달 도메인은 전체 세포내 도메인 서열의 크기까지 해당 세포내 도메인에 대해 본 명세서에 제공된 서열과 같은 해당 세포내 신호전달 도메인의 서열로부터의 적어도 10개, 25개, 30개, 40개 또는 50개의 아미노산과 적어도 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100% 동일하고, 예를 들어, 최대 추가적인 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 20개 또는 25개까지의 아미노산을 포함할 수 있되, 단, 이러한 서열은 여전히 본 명세서에 개시된 LE의 임의의 특성을 제공할 수 있다.

[0441] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소 및 예시적인 실시형태에서, CLE는 사이토카인에 공유적으로 부착되지 않는다. 일부 양태에서, 림프증식성 요소 및 예시적인 실시형태에서, CLE는 동족 수용체에 공유적으로 연결된 사이토카인 폴리펩타이드를 포함한다. 이러한 실시형태 중 하나에서, CLE는 구성적으로 활성일 수 있고, 전형적으로 상응하는 활성화된 야생형 사이토카인 수용체와 동일한 Jak/STAT 및/또는 TRAF 경로를 구성적으로 활성화한다. 일부 실시형태에서, 키메라 사이토카인 수용체는 인터류킨이다. 일부 실시형태에서, CLE는 IL7RA에 공유적으로 연결된 IL-7이다. 다른 실시형태에서, CLE는 IL15RA에 공유적으로 연결된 IL-15이다. 다른 실시형태에서, CLE는 IL15RA에 공유적으로 연결된 IL-15가 아니다. 다른 양태에서, CLE는 사이토카인 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 세포의 도메인의 기능적 부분을 포함하는 동족 수용체의 일부에만 공유적으로 연결되는 사이토카인 폴리펩타이드를 포함하고, 막관통 도메인 및/또는 세포내 도메인은 이중 폴리펩타이드로부터 유래하며, CLE는 구성적으로 활성이다. 한 실시형태에서, CLE는 IL7RA의 세포외 및 막관통 도메인 및 IL2RB로부터의 세포내 도메인에 공유적으로 연결된 IL-7이다. 또 다른 실시형태에서, CLE는 본 명세서에 제공된 사이토카인 폴리펩타이드, 이중 막관통 도메인 및 림프증식성 요소 세포내 도메인에 결합할 수 있는 세포의 도메인의 기능적 부분을 포함하는 동족 수용체의 일부에 공유적으로 연결되는 사이토카인 폴리펩타이드이다. 세포가 동족 수용체 외에 사이토카인 폴리펩타이드를 발현하도록 세포를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키는 것은 세포에 도입될 폴리뉴클레오타이드에서 둘 모두에 대한 아미노산 서열을 암호화하는 것을 필요로 한다. 폴리뉴클레오타이드의 길이는 선택된 백터에 의해 제한될 수 있으며, 때때로 폴리뉴클레오타이드가 더 짧아지도록 함께 테더링된 사이토카인 및 이의 동족 사이토카인 수용체 둘 다를 포함하지 않는 구성적 림프증식성 요소를 사용하는 것이 유리하다. 따라서, 다른 양태에서, 림프증식성 요소는 사이토카인에 테더링되지 않은 사이토카인 수용체이다. 일부 실시형태에서, CLE는 IL15RA에 공유적으로 연결된 IL-15가 아니다.

[0442] 일부 양태에서, 림프증식성 요소는 가용성 사이토카인 또는 성장 인자에 결합할 수 있으며, 이러한 결합은 활성화에 필요하다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 구성적으로 활성이므로, 활성을 위해 가용성 성장 인자 또는 사이토카인에 결합할 필요가 없다. 전형적으로, 구성적으로 활성인 림프증식성 요소는 가용성 사이토카인 또는 성장 인자에 결합하지 않는다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 하나의 수용체로부터의 세포외 결합 도메인 및 상이한 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라이다. 일부 실시형태에서, CLE는 이의 천연 수용체에 결합될 때 증식 및/또는 생존을 저해하지만 대신 CLE 활성화시 증식 및/또는 생존을 유도하는 리간드의 결합시 활성화되는 역 수용체이다. 일부 실시형태에서, 역 수용체는 IL4Ra로부터의 세포외 리간드 결합 도메인 및 IL7Ra 또는 IL21로부터의 세포내 도메인을 포함하는 키메라를 포함한다. 역 사이토카인 수용체의 다른 실시형태는 IL-4, IL-10, IL-13 또는 TGFβ에 대한 수용체와 같은 천연 리간드에 결합할 때 증식 및/또는 생존을 저해하는 수용체로부터의 세포외 리간드 결합 도메인 및 본 명세서에 개시된 임의의 림프증식성 요소 세포내 도메인을 포함하는 키메라를 포함한다. 예시적인 양태에서, 림프증식성 요소는 사이토카인에 결합하지 않는다. 추가의 예시적인 양태에서, 림프증식성 요소는 임의의 리간드에 결합하지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 임의의 리간드에 결합하지 않는 림프증식성 요소는 구성적으로 이량체화되거나 또는 그렇지 않으면 다량체화되고, 구성적으로 활성이다.

[0443] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 단백질 IL7RA의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL7RA의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에서 공지되어 있고, 당업자는 IL7RA 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있으며, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. IL7RA 단백질은 세린 잔기가 풍부한 S 영역(전장 IL7RA의 359 내지 394, 서열번호 248의 96번 내지 133번 잔기에 상응함), 3개의 타이로신 잔기를 갖는 T 영역(전장 IL7RA의 잔기 Y401, Y449 및 Y456, 서열번호 248의 잔기 Y138, Y18 및 Y193에 상응함) 및 신호전달 카이네이스 Jak1에 결합할 수 있는 박스1 모티프(서열번호 248 및 249의 9번 내지 17번 잔기에 상응하는 전장 IL7RA의 272번 내지 280번 잔기)를 갖는다(문헌[Jiang, Qiong et al. Mol. and Cell. Biol. Vol. 24(14):6501-13 (2004)]). 일부 실시형태에서, 본 명세서의 림프증식성 요소는 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 것으로 알려진 IL7RA의 하나 이상의, 예를 들어, 모든 도메인 및 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 248 또는 249의 적어도 10개, 15개,

20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL7RA로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa 또는 약 175개 aa 내지 약 200개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, IL7RA로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 200개의 aa 길이를 갖는다. IL7RA로부터 유래되는 제1 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소의 예시적인 실시형태에서, 제2 세포내 도메인은 TNFRSF8로부터 유래될 수 있다.

[0444]

림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 단백질 IL12RB의 단백질의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL12RB의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있고, 당업자는 IL12RB 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있으며, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL12RB는 적어도 하나의 박스1 모티프 PXXP(서열번호 306)를 포함하되, 각각의 X는 임의의 아미노산(서열번호 254 및 255의 10번 내지 12번 잔기; 및 서열번호 256의 107번 내지 110번 및 139번 내지 142번 잔기)일 수 있다(문헌[Presky DH et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Nov 26;93(24)]). 일부 실시형태에서, IL12RB 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 것으로 알려진 IL12RB의 위의 박스1 모티프 또는 다른 모티프, 도메인 또는 돌연변이 중 하나 이상을 포함할 수 있다. IL12RB의 박스1 모티프는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 IL12RB 폴리펩타이드에서 상응하는 모티프를 확인할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 254 내지 256의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL12RB로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa 또는 약 200개 aa 내지 약 219개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, IL12RB로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 219개 aa, 예를 들어, 30개 aa 내지 92개 aa 또는 30개 aa 내지 90개의 aa 길이를 갖는다.

[0445]

림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 단백질 IL31RA의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL31RA의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 IL31RA 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL31RA는 박스1 모티프 PXXP(서열번호 306)를 포함하되, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 275 및 276의 12번 내지 15번 잔기에 상응함)일 수 있다(문헌[Cornelissen C et al. Eur J Cell Biol. 2012 Jun-Jul;91(6-7):552-66]). 일부 실시형태에서, IL31RA 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 박스1 모티프를 포함할 수 있다. 전장 IL31RA는 또한 하류 신호전달에 중요한 3개의 인산화 가능 타이로신 잔기, Y652, Y683 및 Y721을 포함한다(서열번호 275의 잔기 Y96, Y237 및 Y165에 상응함; 이러한 타이로신 잔기는 서열번호 276에 존재하지 않음)(문헌[Cornelissen C et al. Eur J Cell Biol. 2012 Jun-Jul;91(6-7):552-66]). 3개의 타이로신 잔기 모두 STAT1의 활성화에 기여하는 반면, Y652는 STAT5 활성화에 필요하고, Y721은 STAT3을 동원한다. 일부 실시형태에서, IL31RA 세포내 도메인을 갖는 림프증식성 요소는 박스1 모티프 및/또는 본 명세서에 개시된 공지된 인산화 부위를 포함한다. IL31RA의 박스1 모티프 및 인산화 가능 타이로신은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 유사한 IL31RA 폴리펩타이드에서 상응하는 모티프 및 인산화 가능 타이로신을 확인할 수 있을 것이다. 다른 실시형태에서, IL31RA 세포내 도메인을 갖는 림프증식성 요소는 본 명세서에 개시된 공지된 인산화 부위를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 275 또는 276의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL31RA로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa 또는 약 175개 aa 내지 약 189개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서,

IL31RA로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 200개 aa, 예를 들어, 30개 aa 내지 189개 aa, 30개 aa 내지 106개의 aa 길이를 갖는다.

[0446] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 TNF 수용체 패밀리를, CD40의 막관통 단백질의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CD40의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CD40 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. CD40 단백질은 TRAF 단백질에 대한 여러 결합 부위를 포함한다. 이론에 제한되지 않고, TRAF1, TRAF2 및 TRAF3에 대한 결합 부위는 CD40의 세포내 부분의 막 원위 도메인에 위치하고, 아미노산 서열 PXQXT(서열번호 303)를 포함하되, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 208의 35번 내지 39번 아미노산에 상응함)일 수 있다(문헌[Elgueta et al. Immunol Rev. 2009 May; 229(1):152-72]). TRAF2는 또한 컨센서스 서열 SXXE(서열번호 304)에 결합하는 것으로 나타났으며, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 208의 57번 내지 60번 아미노산에 상응함)일 수 있다(Elgueta et al. Immunol Rev. 2009 May; 229(1):152-72). TRAF6에 대한 별개의 결합 부위는 CD40의 세포내 부분의 막 근위 도메인에 위치하고, 컨센서스 서열 QXPXEX(서열번호 305)를 포함하되, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 208의 16번 내지 21번 아미노산에 상응함)일 수 있다(문헌[Lu et al. J Biol Chem. 2003 Nov 14; 278(46):45414-8]). 예시적인 실시형태에서, 막관통 단백질 CD40의 세포내 부분은 TRAF 단백질에 대한 모든 결합 부위를 포함할 수 있다. TRAF 결합 부위는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 유사한 CD40 폴리펩타이드에서 상응하는 TRAF 결합 부위를 확인할 수 있을 것이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 208 또는 서열번호 209의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD40으로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 아미노산(aa) 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa 또는 약 60개 aa 내지 약 65 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, CD40으로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 66개 aa, 예를 들어, 30개 aa 내지 65개 aa 또는 50개 aa 내지 66개의 aa 길이를 갖는다. CD40으로부터 유래되는 제1 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소의 예시적인 실시형태에서, 제2 세포내 도메인은 MyD88, CD28 패밀리를 구성원(예를 들어, CD28, ICOS), 패턴 인식 수용체, C-반응성 단백질 수용체(즉, Nod1, Nod2, PtX3-R), TNF 수용체, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, 4-1BB), HSP 수용체(Lox-1 및 CD91) 또는 CD28로부터 유래되는 세포내 도메인이 아닐 수 있다. 패턴 인식 수용체는 식작용 패턴-인식 수용체(즉, 만노스 수용체, 스캐빈저 수용체(즉, Mac-1, LRP, 펩타이드글리칸, 테이코산, 독소, CD11c/CR4)); 외부 신호 패턴-인식 수용체(톨-유사 수용체(TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10), 펩타이드글리칸 인식 단백질, (PGRP는 세균 펩타이드글리칸 및 CD14에 결합함)); 내부 신호 패턴-인식 수용체(즉, NOD-수용체 1 및 2) 및 RIG1을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0447] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 CD27의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CD27의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CD27 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 CD27의 219번 아미노산에 있는 세린(서열번호 205의 6번 아미노산의 세린에 상응함)은 인산화된 것으로 나타났다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 205의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD27로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 아미노산(aa) 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa 또는 약 45개 aa 내지 약 50개의 aa 길이를 갖는다.

[0448] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 CSF2RB의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CSF2RB의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CSF2RB 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 CSF2RB는 474번 내지 482번 아미노산(서열번호 213의 14번 내지 22번 아미노산에 상응함)에 박스1 모티프를 포함한다. 전장 CSF2RB의 766번 아미노산에 있는 타이로신(서열번호 213의 306번 아미노산에 있는 타이로신에 상응함)은 인산화된 것으로 나타났다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 213의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CSF2RB로부터 유래되는 세포내 도

메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 aa 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa, 약 200개 aa 내지 약 250개 aa, 약 250개 aa 내지 300개 aa, 약 300개 aa 내지 350개 aa, 약 350개 aa 내지 약 400개 aa 또는 약 400개 aa 내지 약 450개의 aa 길이를 갖는다.

[0449] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IL2RB의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL2RB의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에서 공지되어 있으며, 당업자는 IL2RB 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL2RB는 아미노산 278번 내지 286번 아미노산(서열번호 240의 13번 내지 21번 아미노산에 상응함)에 박스1 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 240의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL2RB로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa, 약 200개 aa 내지 약 250개 aa 또는 약 250개 aa 내지 300개의 aa 길이를 갖는다.

[0450] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IL6ST의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL6ST의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에서 공지되어 있으며, 당업자는 IL6ST 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL6ST는 651번 내지 659번 아미노산(서열번호 247의 10번 내지 18번 아미노산에 상응함)에 박스1 모티프를 포함한다. 아미노산 전장 IL6ST의 661번, 667번, 782번, 789번, 829번 및 839번 아미노산에 있는 세린(각각 서열번호 247의 20번, 26번, 141번, 148번, 188번 및 198번 아미노산에 있는 세린에 상응함)은 인산화된 것으로 나타났다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 246 또는 서열번호 247의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL6ST로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa, 약 200개 aa 내지 약 250개 aa 또는 약 250개 aa 내지 300개의 aa 길이를 갖는다.

[0451] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IL17RE의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL17RE의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에서 공지되어 있으며, 당업자는 IL17RE 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL17RE는 372번 내지 495번 아미노산(서열번호 265의 13번 내지 136번 아미노산에 상응함)에 TIR 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 265의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL17RE로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa 또는 약 175개 aa 내지 약 200개의 aa 길이를 갖는다.

[0452] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IL2RG의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL2RG의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에서 공지되어 있으며, 당업자는 IL2RG 폴리펩타이드에서 상응하

는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL2RG는 286번 내지 294번 아미노산(서열번호 241의 3번 내지 11번 아미노산에 상응함)에 박스1 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 241의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL2RG로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa 또는 약 70개 aa 내지 약 100개 aa 길이를 갖는다.

[0453] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IL18R1의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL18R1의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 IL18R1 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL18R1은 222번 내지 364번 아미노산(서열번호 266의 28번 내지 170번 아미노산에 상응함)에 TIR 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 266의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL18R1로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa 또는 약 70개 aa 내지 약 100개 aa 길이를 갖는다.

[0454] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IL27RA의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IL27RA의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 IL27RA 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IL27RA는 554번 내지 562번 아미노산(서열번호 273의 17번 내지 25번 아미노산에 상응함)에 박스1 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 273 또는 서열번호 274의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL27RA로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa 또는 약 70개 aa 내지 약 100개 aa 길이를 갖는다.

[0455] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 IFNGR2의 세포내 부분으로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IFNGR2의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 IFNGR2 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IFNGR2는 276번 내지 277번 아미노산(서열번호 230의 8번 내지 9번 아미노산에 상응함)에 다이류신 국제화 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 230의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, IFNGR2로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa 또는 약 65개 aa 내지 약 70개의 aa 길이를 갖는다.

[0456] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 단백질 MyD88의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 MyD88의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 MyD88 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. MyD88 단백질은 다른 사멸 도메인-함유 단백질과의 상호작용을 매개하는 N-말단 사멸 도메인(서열번호 284의 29번 내지 106번 아미노산에 상응함), IL-1R 관련 카이네이스와 상호작용하는 중간 도메인(서열번호 284의 107번 내지 156번 아미노산에 상응함) 및 TLR-TIR 도메인과 회합하는 C-말단 TIR 도메인(서열번호 284의 160번 내지 304번 아미노산에 상응함)을 갖는다(문헌[Biol Res. 2007; 40(2):97-112]). MyD88은 또한 표준적 핵 국제화 및 방출 모티프

(방출 motif)를 갖는다. 점 돌연변이는 MyD88에서 확인되었으며, 기능 상실 돌연변이 L93P 및 R193C(서열번호 284의 L93P 및 R196C에 상응함) 및 기능 획득 돌연변이 L265P(서열번호 284의 L260P에 상응함)를 포함한다(문헌 [Deguine and Barton. F1000Prime Rep. 2014 Nov 4;6:97]). 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 림프증식성 요소는 본 명세서에 개시된 MyD88의 하나 이상, 예를 들어, 모든 도메인 및 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 284 내지 293의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있고, 예시적인 실시형태에서, 다음 MyD88 도메인/모티프 중 하나 이상, 예시적인 실시형태에서, 전부를 포함한다: 사멸 도메인, 중간 도메인, TIR 도메인, 핵 국재화 및 방출 모티프, L93, R193 및 L265 또는 P265 위치에 상응하는 아미노산. 일부 실시형태에서, MyD88로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa, 약 200개 aa 내지 약 250개 aa, 약 250개 aa 내지 300개 aa 또는 약 300개 aa 내지 350개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, MyD88로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 350 aa, 예를 들어, 50개 aa 내지 350개 aa 또는 100개 aa 내지 350개 aa, 100개 aa 내지 304개 aa, 100개 aa 내지 296개 aa, 100개 aa 내지 251개 aa, 100개 aa 내지 191개 aa, 100개 aa 내지 172개 aa, 100개 aa 내지 146개 aa 또는 100개 aa 내지 127개의 aa 길이를 갖는다. MyD88로부터 유래되는 제1 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소의 예시적인 실시형태에서, 제2 세포내 도메인은 TNFRSF4 또는 TNFRSF8로부터 유래될 수 있다. MyD88로부터 유래되는 제1 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소의 다른 예시적인 실시형태에서, 제2 세포내 도메인은 CD28 패밀리의 구성원(예를 들어, CD28, ICOS), 패턴 인식 수용체, C-반응성 단백질 수용체(즉, Nodi, Nod2, PtX3-R), TNF 수용체(즉, CD40, RANK/TRANCE-R, OX40, 4-1BB), HSP 수용체(Lox-1 및 CD91) 또는 CD28로부터 유래되는 세포내 도메인이 아닐 수 있다.

[0457] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 막관통 단백질 MPL의 일부로부터 유래될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 MPL을 포함하거나, 또는 MPL 또는 MPL의 막관통 및/또는 세포외 도메인을 포함하거나 포함하지 않고 MPL의 세포내 도메인의 적어도 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%를 포함하는 변이체 및/또는 단편을 포함하는 이들의 변이체 및/또는 단편일 수 있되, 변이체 및/또는 단편은 PBMC 및 일부 실시형태에서, T 세포의 세포 증식을 촉진하는 능력을 유지한다. 일부 실시형태에서, MPL의 세포내 및 막관통 도메인을 포함하는 림프증식성 요소를 발현하는 세포는 엘트롬보팩(eltrombopag)과 접촉하거나, 이에 노출되거나 또는 이로 처리될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 엘트롬보팩은 MPL의 막관통 도메인에 결합하여 MPL의 세포내 도메인의 활성화를 유도한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 조성물 및 방법에 포함되는 MPL 단편은 JAK-2 결합 도메인을 갖고/가거나 보유한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 포함되는 MPL 단편은 STAT를 활성화하는 능력을 갖거나 또는 보유한다. MPL의 전체 세포내 도메인은 서열번호 283(WO2019/055946에 예시된 S186 부분)이다. MPL은 트롬보포이에틴에 대한 수용체이다. 트롬보포이에틴 및 EPO와 같은 여러 사이토카인은 문헌 및 본 명세서에서 호르몬 또는 사이토카인으로 지칭된다.

[0458] T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 MPL의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 MPL 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 막관통 MPL 단백질은 박스1 모티프 PXXP(서열번호 306)를 포함하되, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 283의 17번 내지 20번 아미노산에 상응함) 및 세린과 글루탐산 함량이 증가된 영역인 박스2 모티프(서열번호 283의 46번 내지 64번 아미노산에 상응함)일 수 있다(문헌[Drachman and Kaushansky. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94(6):2350-5]). 박스1 모티프 및 박스2 모티프는 JAK에 대한 결합 및 신호 전달에 관여하지만, 박스2 모티프의 존재가 증식 신호에 항상 필요한 것은 아니다(문헌[Murakami et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Dec 15; 88(24):11349-53; Fukunaga et al. EMBO J. 1991 Oct; 10(10):2855-65; 및 O'Neal and Lee. Lymphokine Cytokine Res. 1993 Oct; 12(5):309-12]). 많은 사이토카인 수용체는 박스1 모티프에 대해 -1, -2 및 -6 위치(각각 서열번호 283의 16번, 15번 및 11번 아미노산에 상응함)에 "스위치 모티프"를 형성하는 소수성 잔기를 가지며, 이는 사이토카인-유도성 JAK2 활성화에는 필요하지만 JAK2 결합에는 필요하지 않다(문헌[Constantinescu et al. Mol Cell. 2001 Feb; 7(2):377-85; 및 Huang et al. Mol Cell. 2001 Dec; 8(6):1327-38]). 서열번호 283의 70번 내지 95번 아미노산을 포함하는 영역의 결실은 v-mpl의 맥락에서 바이러스 형질전환을 지원하는 것으로 나타났으며(문헌[Benit et al. J Virol. 1994 Aug; 68(8):5270-4]), 따라서 이 영역은 이러한 맥락에서 mpl의 기능에 필요하지 않음을 나타낸다. 문헌[Morello et

al. Blood 1995 July; 86(8):557-71]은 동일한 결실을 사용하여 이 영역이 헤마토포이에틴 수용체-반응성 CAT 리포터 유전자 작제물에 대한 전사를 자극하는데 필요하지 않음을 보여주었으며, 또한 이 결실이 Drachman 및 Kaushansky에 의해 제안된 바와 같이 이 영역에서 비필수적이고 음성인 요소의 제거에 대해 예상되는 전사를 약간 향상시켰음을 확인하였다. 따라서, 일부 실시형태에서, MPL 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 283의 70번 내지 95번 아미노산을 포함하는 영역을 포함하지 않는다. 전장 MPL에서, 라이신 K553(서열번호 283의 K40에 상응함) 및 K573(서열번호 283의 K60에 상응함)은 유비퀴틴화 표적화 모티프의 일부로 기능하는 음성 조절 부위인 것으로 나타났다(문헌[Saur et al. Blood 2010 Feb 11;115(6):1254-63]). 따라서, 본 명세서의 일부 실시형태에서, MPL 세포내 신호전달 도메인은 이러한 유비퀴틴화 표적화 모티프 잔기를 포함하지 않는다. 전장 MPL에서, 타이로신 Y521(서열번호 283의 Y8에 상응함), Y542(서열번호 283의 Y29에 상응함), Y591(서열번호 283의 Y78에 상응함), Y626(서열번호 283의 Y113에 상응함) 및 Y631(서열번호 283의 Y118에 상응함)은 인산화된 것으로 나타났다(문헌[Varghese et al. Front Endocrinol (Lausanne). 2017 Mar 31; 8:59]). 전장 MPL의 Y521 및 Y591은 리소솜 표적화 모티프(Y521)의 일부로서 또는 어댑터 단백질 AP2(Y591)과의 상호작용을 통해 기능하는 음성 조절 부위이다(문헌[Drachman and Kaushansky. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94(6):2350-5; 및 Hitchcock et al. Blood. 2008 Sep 15; 112(6):2222-31]). 전장 MPL의 Y626 및 Y631은 양성 조절 부위이고(문헌[Drachman and Kaushansky. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94(6):2350-5]), Y626의 뮤린 동족체는 세포 분화 및 Shc의 인산화에 필요하며(문헌[Alexander et al. EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6531-40]), Y626은 또한 아래 기재된 W515A 돌연변이가 있는 MPL의 구성적 신호전달에도 필요하다(문헌[Pecquet et al. Blood. 2010 Feb 4;115(5):1037-48]). MPL은 Shc 포스포타이로신-결합 결합 모티프 NXXY(서열번호 307)를 포함하되, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 283의 110번 내지 113번 아미노산에 상응함)일 수 있고, 이 타이로신은 인산화되고, 이는 Shc, SHIP 및 STAT3의 TPO-의존적 인산화에 중요하다(문헌[Lamiet et al. J Biol Chem. 1996 Jan 5; 271(1):264-9; 및 van der Geer et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Feb 6; 93(3):963-8]). MPL은 또한 STAT3 컨센서스 결합 서열 YXXQ(서열번호 308)를 포함하되, 각 X는 임의의 아미노산(서열번호 283의 118번 내지 121번 아미노산에 상응함)일 수 있다(문헌[Stahl et al. Science. 1995 Mar 3; 267(5202):1349-53]). 이 서열의 타이로신은 인산화될 수 있고, MPL은 부분적 STAT3 동원이 가능하다(문헌[Drachman and Kaushansky. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18; 94(6):2350-5]). MPL은 또한 STAT5 동원 pYXL(서열번호 310)에 대한 컨센서스 결합 부위와 유사한 서열 YLPL(서열번호 309)(서열번호 283의 113번 내지 116번 아미노산에 상응함)을 포함하되, pY는 포스포타이로신이고, X는 임의의 아미노산일 수 있다(문헌[May et al. FEBS Lett. 1996 Sep 30; 394(2):221-6]). 컴퓨터 시뮬레이션을 사용하여, Lee 등은 MPL의 막관통 도메인에서 임상적으로 관련된 돌연변이는 다음과 같은 활성화 효과의 순서로 MPL을 활성화하여야 함을 발견하였다: W515K(서열번호 283의 아미노산 치환 W2K에 상응함) > S505A(서열번호 187의 아미노산 치환 S14A에 상응함) > W515I(서열번호 283의 아미노산 치환 W2I에 상응함) > S505N(서열번호 187의 아미노산 치환 S14N에 상응함)이며, 이는 T075(서열번호 188)의 일부로서 테스트되었음(문헌[Lee et al. PLoS One. 2011; 6(8):e23396]). 시뮬레이션은 이러한 돌연변이가 JAK2, MPL의 카이네이스 파트너인 JAK2의 구성적 활성화를 유발할 수 있음을 예측하였다. 일부 실시형태에서, MPL의 세포내 부분은 서열번호 283에 존재하는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 또는 모든 도메인 및 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, MPL의 막관통 부분은 서열번호 187에 존재하는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 또는 모든 도메인 및 모티프를 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 MPL의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 예시적인 실시형태에서 본 명세서의 MPL 세포내 신호전달 도메인이 증식 활성을 촉진하는 것으로 나타난 하나 이상의 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 포함할 것이고, MPL 증식 활성을 저해하는 것으로 나타난 것은 포함하지 않을 것임을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 283의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, MPL로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 aa 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa, 약 200개 aa 내지 약 250개 aa, 약 250개 aa 내지 300개 aa, 약 300개 aa 내지 350개 aa, 약 350개 aa 내지 약 400개 aa, 약 400개 aa 내지 약 450개 aa, 약 450개 aa 내지 약 500개 aa, 약 500개 aa 내지 약 550개 aa, 약 550개 aa 내지 약 600개 aa 또는 약 600개 aa 내지 약 635개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, MPL로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 200개 aa, 예를 들어, 30개 aa 내지 150개 aa, 30개 aa 내지 119개 aa, 30개 aa 내지 121개 aa, 30개 aa 내지 122개 aa 또는 50개 aa 내지 125개의 aa 길이를 갖는다. MPL로부터 유래되는 제1 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소의 예시적인 실시형태에

서, 제2 세포내 도메인은 CD79B로부터 유래될 수 있다.

[0459] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 B29; IGB; AGM6으로도 알려져 있는 막관통 단백질 CD79B의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CD79B의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CD79B 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. CD79B는 잔기 193번 내지 212번 잔기(서열번호 211의 16번 내지 30번 아미노산에 상응함)에 ITAM 모티프를 포함한다. CD79B는 인산화되는 것으로 알려진 2개의 타이로신, Y196 및 Y207(서열번호 211의 Y16 및 Y27에 상응함)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 막관통 단백질 CD79B의 세포내 부분은 ITAM 모티프 및/또는 본 명세서에 개시된 공지된 인산화 부위를 포함한다. CD79B의 모티프 및 인산화 가능 타이로신은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 유사한 CD79B 폴리펩타이드에서 상응하는 모티프 및 인산화 가능 타이로신을 확인할 수 있을 것이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 211의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD79B로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa 또는 약 45개 aa 내지 약 50개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, CD79B로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 50개의 aa 길이를 갖는다. 예를 들어, 적합한 CD79B 세포내 활성화 도메인은 하기 서열: LDKDDSKAGMEEDHT[YEGLDIDQTATYEDI]VTLRTGEVKWSVGEHPGQE(서열번호 211)의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있되, ITAM 모티프는 괄호 안에 표시된다. CD79B로부터 유래되는 제2 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소의 예시적인 실시형태에서, 제1 세포내 도메인은 CSF3R로부터 유래될 수 있다.

[0460] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 막관통 단백질 OSMR의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 OSMR의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 OSMR 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. OSMR은 동형 단백질 3의 771번 내지 779번 아미노산(서열번호 294의 16번 내지 30번 아미노산에 상응함)에 박스1 모티프를 포함한다. OSMR은 인산화되는 것으로 알려진 동형 단백질 3의 829번 및 890번 아미노산에 2개의 세린(서열번호 294의 65번 및 128번 아미노산에 있는 세린)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 단백질 OSMR의 세포내 부분은 박스1 모티프 및 본 명세서에 개시된 공지된 인산화 부위를 포함할 수 있다. OSMR의 모티프 및 인산화 가능 세린은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 유사한 OSMR 폴리펩타이드에서 상응하는 모티프 및 인산화 가능 세린을 확인할 수 있을 것이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 294에서 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대한 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, OSMR로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa 또는 약 200개 aa 내지 약 250개의 aa 길이를 갖는다.

[0461] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 막관통 단백질 PRLR의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 PRLR의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 PRLR 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. PRLR은 동형 단백질 6의 185번 내지 261번 아미노산(서열번호 295의 28번 내지 104번 아미노산에 상응함)에 성장 호르몬 수용체 결합 도메인을 포함한다. PRLR의 성장 호르몬 수용체 결합 도메인은 당업계에 공지되어 있고, 당업자는 유사한 PRLR 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인을 확인할 수 있을 것이다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 295의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, PRLR로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100

개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa, 약 200개 aa 내지 약 250개 aa, 약 250개 aa 내지 300개 aa, 약 300개 aa 내지 350개 aa 또는 약 350개 aa 내지 약 400개의 aa 길이를 갖는다.

[0462] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 세포내 도메인은 막관통 단백질 CD30(TNFRSF8, DIS166E 및 Ki-1로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다.

[0463] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 단백질 CD28의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CD28의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CD28 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 CD28은 서열번호 206 및 207의 12번 내지 15번 잔기에 상응하는 PI3-K- 및 Grb2-결합 모티프를 포함한다(문헌[Harada et al. J Exp Med. 2003 Jan 20;197(2):257-62]). 일부 실시형태에서, CD28 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 PI3-K- 및 Grb2-결합 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 206 또는 207의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD28로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 5개 aa 내지 약 10개 aa, 약 10개 aa 내지 약 15개 aa, 약 15개 aa 내지 약 20개 aa, 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30개 aa, 약 30개 aa 내지 약 35개 aa 또는 약 35개 aa 내지 약 42개의 aa 길이를 갖는다.

[0464] 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 및 조성물의 예시적인 실시형태에서, 세포내 도메인은 단백질 ICOS의 일부로부터 유래될 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 ICOS의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 ICOS 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. CD28과 달리, ICOS는 PI3-K에 결합하고, Grb2에는 결합하지 않는다. 전장 ICOS의 PI3-K-결합 모티프는 서열번호 225의 19번 내지 22번 잔기에 해당한다. 이 모티프에서 단일 아미노산 치환은 ICOS에 의한 Grb2 결합 및 IL-2 생성의 증가로 이어질 수 있다(문헌[Harada et al. J Exp Med. 2003 Jan 20;197(2):257-62]). 이 돌연변이는 서열번호 225의 페닐알라닌 21을 아스파라긴으로 돌연변이시키는 것에 해당한다. 당업자는 서열번호 225에서 이 잔기를 돌연변이시키고, PI3-K에 더하여 Grb2에 결합하는 ICOS 세포내 도메인을 생성하는 방법을 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, ICOS 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 PI3-K-결합 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, ICOS 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 Grb2에 추가적으로 결합하도록 돌연변이된 PI3-K-결합 모티프를 포함할 수 있다. ICOS는 또한 ICOS-보조 칼슘 신호전달에 필수적인 세포질 꼬리의 막 근위 모티프를 포함한다(문헌[Leconte et al. Mol Immunol. 2016 Nov; 79:38-46]). 이 칼슘 신호전달-모티프는 서열번호 225의 5번 내지 8번 잔기에 해당한다. 일부 실시형태에서, ICOS 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 칼슘-신호전달 모티프를 포함할 수 있다. 2개의 다른 보존된 모티프가 전장 ICOS에서 확인되었다. 170번 내지 179번 잔기(서열번호 225의 9번 내지 18번 잔기에 상응함)의 제1 보존된 모티프 및 185번 내지 191번 잔기(서열번호 225의 24번 내지 30번 잔기에 상응함)의 제2 보존된 모티프(문헌[Pedros et al. Nat Immunol. 2016 Jul;17(7):825-33]). 이러한 2개의 보존된 모티프는 하류 ICOS 신호전달을 매개하는데 중요한 기능(들)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, ICOS 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 제1 또는 제2 보존된 모티프 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, ICOS 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 제1 보존된 모티프를 포함하지 않거나, 제2 보존된 모티프를 포함하지 않거나 또는 제1 및 제2 보존된 모티프를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 적합한 세포내 도메인은 서열번호 225의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, ICOS로부터 유래되는 세포내 도메인은 약 5개 aa 내지 약 10개 aa, 약 10개 aa 내지 약 15개 aa, 약 15개 aa 내지 약 20개 aa, 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30개 aa, 약 30개 aa 내지 약 35개 aa 또는 약 35개 aa 내지 약 38개의 aa 길이를 갖는다.

[0465] 일부 실시형태에서, 키메라 림프증식성 요소의 세포내 도메인은 막관통 단백질 OX40(TNFRSF4, RP5-902P8.3, ACT35, CD134, OX-40, TXGPIL로도 알려져 있음)의 세포내 부분으로부터 유래된다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 OX40의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 OX40 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. OX40은 TRAF1, TRAF2, TRAF3 및 TRAF5를 결합하는데 중요한 전장 OX40의 256번 내지 263번 잔기

(서열번호 296의 20번 내지 27번 잔기에 상응함)에 TRAF 결합 모티프를 포함한다(문헌[Kawamata, S, et al. J Biol Chem. 1998 Mar 6;273(10):5808-14; Hori, T. Int J Hematol. 2006 Jan;83(1):17-22]). 전장 OX40는 또한 잔기 34번 내지 57번 잔기에 p85 PI3K 결합 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, OX40이 림프증식성 요소의 세포내 도메인에 존재하는 경우, 이는 OX40의 p85 PI3K 결합 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, OX40의 세포내 도메인은 OX40의 TRAF 결합 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, OX40의 세포내 도메인은 TRAF1, TRAF2, TRAF3 및 TRAF5에 결합할 수 있다. 서열번호 296의 17번 및 41번 아미노산에 해당하는 라이신은 유비퀴틴 표적화 모티프의 일부로서 기능하는 잠재적으로 음성인 조절 부위이다. 일부 실시형태에서, OX40의 세포내 도메인의 이러한 라이신 중 하나 또는 둘 모두는 돌연변이된 아르기닌 또는 또 다른 아미노산이다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 적합한 세포내 도메인은 서열번호 57의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, OX40의 세포내 도메인은 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30 aa, 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa 또는 약 45개 aa 내지 약 50개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, OX40의 세포내 도메인은 약 20개 aa 내지 약 50 aa, 예를 들어, 20개 aa 내지 45개 aa 또는 20개 aa 내지 42개의 aa 길이를 갖는다.

[0466]

일부 실시형태에서, 키메라 림프증식성 요소의 세포내 도메인은 막관통 단백질 IFNAR2의 세포내 부분으로부터 유래된다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 IFNAR2의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에서 공지되어 있으며, 당업자는 IFNAR2 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 IFNAR2는 박스1 모티프 및 2개의 박스2 모티프(박스2A 및 박스2B로도 알려져 있음)를 포함한다(문헌[Usacheva A et al. J Biol Chem. 2002 Dec 13;277(50):48220-6]). 일부 실시형태에서, IFNAR2 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 박스1 또는 박스2 모티프 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, IFNAR2 세포내 도메인은 박스1, 박스2A 또는 박스2B 모티프 중 하나 이상을 포함할 수 있다. IFNAR2는 JAK1-결합 부위를 포함한다(문헌[Gauzzi MC et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Oct 28;94(22):11839-44; Schindler et al. J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20059-63]). 일부 실시형태에서, IFNAR2 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 JAK1-결합 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 적합한 세포내 도메인은 서열번호 227 또는 228의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, IFNAR2의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 약 150개 aa, 약 150개 aa 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa 또는 약 200개 aa 내지 약 251개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, OX40의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 251개 aa, 예를 들어, 30개 aa 내지 67개의 aa 길이를 갖는다.

[0467]

일부 실시형태에서, 키메라 림프증식성 요소의 세포내 도메인은 막관통 단백질 CSF3R의 세포내 부분으로부터 유래된다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CSF3R의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CSF3R 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 CSF3R은 박스1 및 박스2 모티프뿐만 아니라 박스3 모티프를 포함한다(문헌[Nguyen-Jackson HT et al. G-CSF Receptor Structure, Function, and Intracellular Signal Transduction. Twenty Years of G-CSF, (2011) 83-105]). 일부 실시형태에서, CSF3R 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 박스1, 박스2 또는 박스3 모티프 중 하나 이상을 포함할 수 있다. CSF3R은 STAT3(Y704 및 Y744), SOCS3(Y729) 및 Grb2 및 p21Ras(Y764)를 결합하는데 중요한 전장 CSF3R에 4개의 타이로신 잔기, Y704, Y729, Y744 및 Y764를 포함한다. 일부 실시형태에서, CSF3R 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 전장 CSF3R의 Y704, Y729, Y744 및 Y764에 해당하는 타이로신 잔기의 1개, 2개, 3개 또는 모두를 포함할 수 있다. CSF3R은 전장 CSF3R에 2개의 트레오닌 잔기, T615 및 T618를 포함하며, 이는 각각 알라닌 및 아이소류신으로 돌연변이될 때(T615A 및 T618I) 수용체 이량체화 및 활성을 증가시킬 수 있다(문헌[Maxson et al. J Biol Chem. 2014 Feb 28;289(9):5820-7]). 일부 실시형태에서, CSF3R 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 T615A 및 T618I에 해당하는 돌연변이 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 적합한 세포내 도메인은 서열번호 216, 217 또는 218의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인

을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, CSF3R의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa 또는 약 200개 aa 내지 약 213개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, CSF3R의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 213 aa, 예를 들어, 약 30개 aa 내지 약 186개 aa 또는 약 30개 aa 내지 약 133개의 aa 길이를 갖는다.

[0468] 일부 실시형태에서, 키메라 림프증식성 요소의 세포내 도메인은 막관통 단백질 EPOR의 세포내 부분으로부터 유래된다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 EPOR의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당 업계에 공지되어 있으며, 당업자는 EPOR 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. EPOR은 박스1(전장 EPOR의 257번 내지 264번 잔기) 및 박스2(전장 EPOR의 303번 내지 313번 잔기) 모티프를 포함한다(문헌[Constantinescu SN. Trends Endocrinol Metab. 1999 Dec;10(1):18-23]). EPOR은 또한 타이로신 카이네이스 수용체 KIT를 결합하는데 중요한 확장된 박스2 모티프(329번 내지 372번 잔기)를 포함한다(문헌[Constantinescu SN. Trends Endocrinol Metab. 1999 Dec;10(1):18-23]). 일부 실시형태에서, EPOR 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 박스1, 박스2 또는 확장된 박스2 모티프 중 하나 이상을 포함할 수 있다. EPOR은 또한 EPOR 국제화에 중요한 짧은 분절(전장 EPOR의 267번 내지 276번 잔기)을 포함한다. 일부 실시형태에서, EPOR 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 국제화 분절을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 적합한 세포내 도메인은 서열번호 219 또는 220의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, EPOR의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa, 약 40개 aa 내지 약 45개 aa, 약 45개 aa 내지 약 50개 aa, 약 50개 aa 내지 약 55개 aa, 약 55개 aa 내지 약 60개 aa, 약 60개 aa 내지 약 65개 aa, 약 65개 aa 내지 약 70개 aa, 약 70개 aa 내지 약 100개 aa, 약 100개 aa 내지 약 125개 aa, 약 125개 aa 내지 150개 aa, 약 150개 내지 약 175개 aa, 약 175개 aa 내지 약 200개 aa 또는 약 200개 aa 내지 약 235개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, EPOR의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 235개의 aa 길이를 갖는다.

[0469] 일부 실시형태에서, 키메라 림프증식성 요소의 세포내 도메인은 막관통 단백질 CD3G의 세포내 부분으로부터 유래된다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 CD3G의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당 업계에 공지되어 있으며, 당업자는 CD3G 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 전장 CD3G의 2개의 세린 잔기, S123 및 S126은 아이오노마이신에 대한 반응으로 T 세포에서 인산화되는 것으로 나타났다(문헌[Davies et al. J Biol Chem. 1987 Aug 15;262(23):10918-21]). 일부 실시형태에서, CD3G 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 전장 S123 및 S126에 해당하는 세린 잔기 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, S123이 아닌 S126에서의 인산화는 PKC-매개성 하향-조절에 필요한 것으로 나타났다(문헌[Dietrich J et al. EMBO J. 1994 May 1;13(9):2156-66]). 일부 실시형태에서, CD3G 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 전장 S123에 해당하는 세린 잔기를 포함할 수 있고, 전장 S126에 해당하는 세린 잔기는 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, CD3G 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 전장 S126에 해당하는 세린 잔기에 비-인산화 가능 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 아미노산 치환은 세린에서 알라닌으로의 돌연변이일 수 있다. 추가적으로, 전장 CD3G의 다이-류신 모티프인 L131 및 L132의 류신의 류신에서 알라닌으로의 돌연변이는 PKC-매개성 하향-조절을 방지하는 것으로 나타났다(문헌[Dietrich J et al. EMBO J. 1994 May 1;13(9):2156-66]). 일부 실시형태에서, CD3G 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 전장 CD3G L131 또는 L132에 해당하는 류신 잔기에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 아미노산 치환은 류신에서 알라닌으로의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 적합한 세포내 도메인은 서열번호 199의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 모든 아미노산의 신장부에 대해 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태의 일부에서, CD3G의 세포내 도메인은 약 20개 aa 내지 약 25개 aa, 약 25개 aa 내지 약 30개 aa, 약 30개 aa 내지 약 35개 aa, 약 35개 aa 내지 약 40개 aa 또는 약 40개 aa 내지 약 45개의 aa 길이를 갖는다. 예시적인 실시형태에서, CD3G의 세포내 도메인은 약 30개 aa 내지 약 45개의 aa 길이를 갖는다.

[0470] 예시적인 실시형태에서, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18일 수 있는 TNF 수용체(TNFR)의 세포질 도메인은 TRAF(TNF 수용체-관련 인자) 및/또는 "사멸 도메인"(DD) 분자를 포함하는 신호전달 분자를 동

원할 수 있다. T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 TNFR의 도메인, 모티프 및 점 돌연변이는 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 TNFR 폴리펩타이드에서 상응하는 도메인, 모티프 및 점 돌연변이를 확인할 수 있고, 이들 중 일부는 이 단락에서 논의된다. 포유동물에서, 적어도 6개의 TRAF 분자 및 다수의 비수용체 DD 분자가 있다. TRAF에 결합하는 수용체 및 어댑터 단백질은 당업계에 공지된 짧은 컨센서스 TRAF-결합 모티프를 공유한다(문헌[Meads et al. J Immunol. 2010 Aug 1;185(3):1606-15]). DD-결합 모티프는 당업계에 공지된 6개의 보존된 α -나선의 대략 60개의 아미노산 구형 다발이다(문헌[Locksley RM et al. Cell. 2001 Feb 23;104(4):487-501]). 당업자는, 예를 들어, 공지된 결합 모티프에 대한 서열 정렬을 사용하여 상이한 TNFR 패밀리에서 TRAF- 및/또는 DD-결합 모티프를 확인할 수 있을 것이다. TNFR은 TRADD 및 TRAF2를 동원하여 NF- κ B, MAPK 및 JNK를 활성화할 수 있다(문헌[Sedger and McDermott. Cytokine Growth Factor Rev. 2014 Aug;25(4):453-72]). 일부 실시형태에서, TNFR 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 하나 이상의 TRAF-결합 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, TNFR 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 DD-결합 모티프를 포함하지 않거나, 또는 세포내 도메인 내에서 하나 이상의 DD-결합 모티프 결실되거나 또는 돌연변이된다. 일부 실시형태에서, TNFR 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 TRADD 및/또는 TRAF2를 동원할 수 있다. TNFR은 또한 리간드 결합에 중요한 시스테인-풍부 도메인(CRD)을 포함한다(문헌[Locksley RM et al. Cell. 2001 Feb 23;104(4):487-501]). 일부 실시형태에서, TNFR 세포내 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 TNFR CRD를 포함하지 않는다.

[0471] 본 명세서에 개시된 임의의 양태에 포함할 수 있는 림프증식성 요소 및 CLE는 WO2019/055946에 개시되어 있는 임의의 LE 또는 CLE일 수 있다. 형질도입 후 제7일 및 제21일, 제28일, 제35일 및/또는 제42일 사이에 CLE를 암호화하는 렌티바이러스 입자로 형질도입된 PBMC의 세포 배양에서 증식을 촉진하는 CLE가 여기에 개시되어 있다. 또한, CLE는 CLE 및 CAR 중 하나를 발현하는 T 세포가 마우스에 도입된 CAR에 의해 인식되는 항원의 존재 또는 부재하에 마우스에서 생체내 증식을 촉진하는 CLE가 여기에서 확인되었다. 여기에 예시되어 있는 바와 같은 테스트 및/또는 기준은 LE를 포함하는 임의의 테스트 폴리펩타이드, 또는 제1 세포내 도메인, 또는 제2 세포내 도메인 또는 제1 및 제2 세포내 도메인 모두와 같은 LE의 테스트 도메인이 실제로 LE인지, 또는 LE의 효과적인 세포내 도메인인지, 또는 특히 효과적인 LE 또는 LE의 세포내 도메인인지 여부를 확인하는데 사용될 수 있다. 따라서, 소정의 실시형태에서, LE 또는 LE를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산을 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 또는 다른 실시형태는 LE가 본 명세서에 제공된 LE를 식별하기 위한 테스트 또는 기준 중 임의의 하나 이상을 충족하거나, 또는 이의 특성을 제공하거나, 또는 이의 특성을 제공 및/또는 보유할 수 있거나, 또는 LE를 암호화하는 렌티바이러스 입자로 형질도입된 세포와 같은 재조합 핵산 벡터로 유전적으로 변형된, 형질도입된 및/또는 안정적으로 형질감염된 세포가 하나 이상의 언급된 테스트의 결과를 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 이를 달성하기 위해 변형될 수 있음을 언급할 수 있다. 한 실시형태에서, LE는 동일한 조건하에서 대조군 레트로바이러스 입자, 예를 들어, 렌티바이러스 입자와 비교하여 외인성으로 첨가된 사이토카인의 부재하에 형질도입 후 시험관내 배양의 제7일 및 제21일, 제28일, 제35일 및/또는 제42일 사이에 LE를 암호화하는 핵산 및 CD3 제타 세포내 활성화 도메인을 포함하지만 공동-자극 도메인은 포함하지 않는 항-CD19 CAR을 포함하는 렌티바이러스로 형질도입된 사전-활성화된 PBMC에 대한 개선된 증식을 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유할 수 있다(또는 LE를 암호화하는 레트로바이러스 입자로 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이를 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 변형됨). 일부 실시형태에서, 추정상의 LE(테스트 세포)를 암호화하는 테스트 작제물을 암호화하는 계놈을 갖는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)로 형질도입된 세포의 개선된 또는 향상된 생존, 확장 및/또는 증식에 대한 림프증식성 요소 테스트는, 예를 들어, 형질도입되지 않은 세포, 또는 림프증식성 요소를 암호화하는 핵산을 포함하지만 림프증식성 요소가 결여되어 있거나, 또는 테스트 폴리펩타이드 작제물의 세포내 도메인 또는 도메인들이 결여되어 있지만 각각의 테스트 폴리펩타이드 작제물의 동일한 세포의 도메인(존재하는 경우) 및 동일한 막관통 영역 또는 막 표적화 영역을 포함하는 렌티바이러스 입자와 동일한 대조군 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스)로 형질도입된 세포일 수 있는 대조군 세포와의 비교를 기반으로 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 대조군 세포는 림프증식성 요소를 예시하는 것으로서 본 명세서에서 확인된 림프증식성 요소 또는 이의 세포내 도메인(들)을 암호화하는 계놈을 갖는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)로 형질도입된다. 이러한 실시형태에서, 테스트 기준은 테스트가 대조군 림프증식성 요소를 암호화하는 것과 비교하여 테스트 작제물을 암호화하는 계놈을 갖는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)를 사용하여 수행될 때, 전형적으로 이와 함께 전사된 세포를 분석함으로써 적어도 농축, 생존 및/또는 확장이 있거나 또는 농축, 생존 및/또는 증식에 통계적 차이가 없음을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 림프증식성 요소의 예시적인 또는 예증적인 실시형태는 이러한 테스트를 위한 대조군 림프증식성 요소의

예시적인 실시형태이다.

[0472] 일부 실시형태에서, 추정상의 또는 테스트 림프증식성 요소의 개선된 특성에 대한 이러한 테스트는 반복 수행하고/하거나 통계적 테스트를 수행함으로써 수행된다. 당업자는 많은 통계적 테스트가 이러한 림프증식성 요소 테스트에 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 실시형태에서 이러한 테스트를 위해 상정되는 것은 당업계에 공지된 임의의 이러한 테스트이다. 일부 실시형태에서, 통계적 테스트는 T-테스트 또는 맨-윌콕스-윌콕스 테스트일 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 작제물의 정규화된 농축 수준은 0.1 미만, 또는 0.05 미만 또는 0.01 미만의 p-값에서 유의하다.

[0473] 또 다른 실시형태에서, LE는 외인성으로 첨가된 사이토카인의 부재하에 시험관내 배양의 제7일 및 제21일, 제28일, 제35일 및/또는 제42일 사이에 CD3 제타 세포내 활성화 도메인을 포함하지만 공동-자극 도메인은 포함하지 않는 항-CD19 CAR과 함께 형질도입될 때, LE를 암호화하는 핵산으로 형질도입된 사전-활성화된 PBMC의 적어도 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배 또는 10-배 확장, 또는 1.5-배 내지 25-배 확장, 또는 2-배 내지 20-배 확장, 또는 2-배 내지 15-배 확장, 또는 5-배 내지 25-배 확장, 또는 5-배 내지 20-배 확장 또는 5-배 내지 15-배의 확장의 특성을 제공하고/하거나 보유할 수 있다(또는 LE로 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이를 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 이에 대해 변형될 수 있음). 일부 실시형태에서, 테스트는 PBMC의 존재하에, 예를 들어, 형질도입된 세포 대 PBMC의 1:1 비로 수행되며, 이는, 예를 들어, 일치하는 공여체로부터 유래할 수 있고, 일부 실시형태에서, 테스트는 PBMC의 부재하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 임의의 이러한 테스트에 대한 확장 분석은 W02019/055946에 예시되어 있는 바와 같이 수행된다. 일부 실시형태에서, 테스트는 추가의 통계적 테스트 0.1, 0.05 또는 0.01 미만의 P 값과 같은 컷-오프를 포함할 수 있되, 테스트 폴리펩타이드 또는 이를 암호화하는 핵산은 하나 또는 둘 모두의 임계값(즉, 배수 확장 및 통계적 컷오프)을 충족해야 한다.

[0474] 본 명세서에 제공된 임의의 림프증식성 요소 테스트에 대해, 테스트 세포의 수와 대조군 세포의 수가 형질도입 후 제7일 및 제14일, 제21일, 제28일, 제35일, 제42일 또는 제60일 사이에 비교될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 및 대조군 세포의 수는 DNA를 시퀀싱하고, 각 작제물에 존재하는 고유 식별자의 발생을 계수함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 및 대조군 세포의 수는, 예를 들어, 혈구계 또는 세포 계수기로 직접 계수될 수 있다. 일부 실시형태에서, 모든 테스트 세포 및 대조군 세포는 동일한 용기, 웰 또는 플라스크 내에서 성장될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 세포는 하나 이상의 웰, 플라스크 또는 용기에 시딩될 수 있고, 대조군 세포는 하나 이상의 플라스크 또는 용기에 시딩될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 및 대조군 세포는 개별적으로, 예를 들어, 세포 웰당 하나의 세포로 웰 또는 플라스크에 시딩될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 세포 및 대조군 세포의 수는 농축 수준을 사용하여 비교될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 또는 대조군 작제물에 대한 농축 수준은 각 작제물에 대한 이후 시점(제14일, 제21일, 제28일, 제35일 또는 제45일)에서의 세포 수를 제7일에서의 세포 수로 나눔으로써 계산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 또는 대조군 작제물에 대한 농축 수준은 형질도입되지 않은 세포에 대한 특정 시점(제14일, 제21일, 제28일, 제35일 또는 제45일)에서의 세포 수를 해당 시점에서의 세포 수로 나눔으로써 계산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각 테스트 작제물의 농축 수준은 정규화된 농축 수준을 생성하기 위해 각각의 대조군 작제물의 농축 수준으로 정규화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 테스트 작제물에 암호화된 LE는 적어도 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배 또는 10-배의 정규화된 농축 수준, 1.5-배 내지 25-배 정규화된 농축 수준, 또는 3-배 내지 20-배 정규화된 농축 수준, 또는 5-배 내지 25-배 정규화된 농축 수준, 또는 5-배 내지 20-배 정규화된 농축 수준, 또는 5-배 내지 15-배의 정규화된 농축 수준을 제공한다(또는 LE를 암호화하는 게놈을 갖는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)로 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이를 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 이에 대해 변형됨). 농축은, 예를 들어, 직접 세포 계수에 의해 측정될 수 있다. 컷오프 값은 단일 테스트 또는 2회, 3회, 4회 또는 5회 반복을 기반으로 하거나, 또는 많은 반복을 기반으로 할 수 있다. 컷오프는 림프증식성 요소가 하나 이상의 반복 테스트를 충족하거나, 또는 모든 반복에 대한 컷오프를 충족하거나 초과할 때 충족될 수 있다. 일부 실시형태에서, 농축은 $\log_2((\text{테스트일의 정규화된 카운트 데이터} + 1)/(\text{제7일의 정규화된 카운트 데이터} + 1))$ 로 측정된다.

[0475] W02019/055946에 예시된 바와 같이, CLE는 림프 또는 골수 세포의 증식 및/또는 생존을 유도하는 것으로 여겨지는 세포내 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하지만 공동-자극 도메인은 포함하지 않는 항-CD19 CAR을 포함하도록 설계된 테스트 키메라 폴리펩타이드를 암호화하는 작제물에 포함된 작제물의 라이브러리로부터 확인되었다. 37°C에서 밤새 수행되는 사전활성화는 PBMC, 림프구용 상업적 배지(완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM), 제조업 인간 인터류킨-2(1001 U/ml) 및 항-CD3 Ab(OKT3)(50 ng/ml)을 포함하는 사전활성화 반응 혼합물

에서 수행되었다. 사전활성화 후, 테스트 및 대조군 렌티바이러스 입자를 5의 감염 다중도(MOI)로 사전활성화 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C에서 밤새 형질도입이 수행되었다. 일부 대조군 렌티바이러스 입자는 세포외 및 막관통 도메인을 갖지만 세포내 도메인은 갖지 않는 폴리캡타이드를 암호화하는 작제물을 포함하였다. 대조적으로, 테스트 렌티바이러스 입자는 세포외 및 막관통 도메인 및 1개 또는 2개의 세포내 도메인을 갖는 폴리캡타이드를 암호화하는 작제물을 포함하였다. 형질도입 후, 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM을 첨가하여 반응 혼합물이 5-배 내지 20-배로 희석되고, 세포는 37°C에서 최대 45일 동안 배양되었다. 형질도입 후 제7일에, 배양물에 추가적인 형질도입되지 않은 공여체 일치된 PBMC가 "공급"되거나(또는 유가(fed)) 또는 영양이 공급되지 않았다(또는 "비유가(unfed)"). 형질도입 반응 혼합물이 초기에 형성된 후, 어떠한 추가적인 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7 또는 IL-15 및 다른 림프 유사분열 촉진제(lymphoid mitogenic agent)가 없음)도 상업적 배지에 존재하지 않는 이들 배양물에 첨가되지 않았다. 확장은 농축이 분석을 위한 마지막 날의 정규화된 카운트에 1을 더한 제7일의 카운트에 1을 더한 비의 밑수(base) 2의 로그로 계산된 바와 같이 양수가 되도록 혼합 배양된 PBMC 세포 집단에서 각 작제물에 대한 고유 식별자의 핵산 서열 수로 실제로 계수된 세포 수의 농축을 분석함으로써 측정되었다. LE를 식별하기 위해 수행된 테스트에 관한 추가적인 세부사항은 실험 조건을 포함하여 W02019/055946에 예시되어 있다.

[0476] W02019/055946에 예시된 바와 같이, 제7일 및 제21일, 제28일, 제35일 및/또는 제42일 사이에 IL-2와 같은 사이토카인이 첨가되지 않은 이러한 유가 또는 비유가 배양물에서 증식/확장을 유도하였기 때문에, 테스트 작제물은 CLE로 확인되었다. 예를 들어, W02019/055946에 예시된 바와 같이, 효과적인 CLE는 임의의 세포내 도메인을 포함하지 않는 대조군 작제물과 비교하여 형질도입 후 제7일 및 제21일, 제28일, 제35일 및/또는 제42일 사이에 형질도입되지 않은 PBMC가 공급되는지 여부에 관계없이 이러한 시험관내 배양물의 증가된 확장을 제공하는 테스트 CLE를 확인함으로써 확인되었다. W02019/055946은 테스트 유전자로부터의 세포내 도메인을 포함하는 적어도 하나 및 전형적으로 하나 초과와 테스트 CLE가 형질도입 후 제7일에 존재했던 세포내 도메인을 포함하지 않은 모든 대조군 작제물보다 더 많은 확장을 제공하였음을 개시하고 있다. W02019/055946은 제1 세포내 도메인 및 이들 유전자로부터의 하나 이상의 예시적인 세포내 도메인(들)과 관련하여 예외적으로 효과적인 유전자를 확인하는데 사용된 통계적 방법을 추가로 제공한다. 이 방법은 맨-휘트니-윌콕슨 테스트 및 0.1 미만 또는 0.05 미만의 허위 발견 컷오프율(false discovery cutoff rate)을 사용하였다. W02019/055946은, 예를 들어, 해당 유전자를 갖는 모든 작제물에 대한 조합 점수로서 계산된 유전자에 대한 점수를 분석함으로써 제1 세포내 도메인 또는 제2 세포내 도메인에 대해 특히 효과적인 유전자를 확인하였다. 이러한 분석은 W02019/055946에 개시된 일부 테스트에 대해 나타난 바와 같이 1보다 크거나, 임의의 세포내 도메인이 없는 음성 대조군 작제물보다 크거나 또는 2보다 큰 컷오프를 사용할 수 있다.

[0477] 또 다른 실시형태에서, LE는 생체내 T 세포 확장을 유도하는 특성을 제공하고, 제공할 수 있고/있거나 보유한다 (또는 LE로 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이를 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 변형될 수 있음). 예를 들어, 생체내 테스트는 마우스 모델을 이용하고, T 세포가 LE를 암호화하는 렌티바이러스 벡터와 접촉되고 W02019/055946에 개시된 바와 같이 마우스에 도입된 후, 생체내에서 15일 내지 25일, 또는 생체내에서 19일 내지 21일 또는 생체내에서 대략 21일에 T 세포 확장을 측정한다.

[0478] 세포를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입하기 위해 본 명세서에 제공된 방법 및 이의 용도와 같은 전형적으로 CAR을 포함하는 LE를 포함하는 예시적인 양태에서 및 실시형태에서, 유전적으로 변형된 세포는 유전적 변형 및/또는 형질도입 전에 세포가 이전에 보유하지 않은 새로운 특성을 갖도록 변형된다. 이러한 특성은 CAR 또는 LE, 및 예시적인 실시형태에서, CAR와 LE 모두를 암호화하는 핵산을 이용한 유전적 변형에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 추가된 IL-2의 부재하에 또는 추가된 사이토카인, 예컨대, IL-2, IL-15 또는 IL-7의 부재하에 그리고 소정의 예시적인 실시형태에서, CAR에 의해 인식되는 항원의 존재하에 형질도입 후 적어도 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일 또는 60일 동안 또는 7일과 14일, 21일, 28일, 35일, 42일 또는 60일 사이에 생체외 배양에서 생존 및/또는 증식이 가능하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 이에 대해 변형되되, 방법은 슈도타이핑 요소 및 선택적으로 이의 표면 상에 별도의 또는 융합된 활성화 도메인을 갖는 레트로바이러스 입자를 사용하여 변형시키는 것을 포함하고, 전형적으로 사전-활성화를 필요로 하지 않는다.

[0479] 소정의 실시형태에서 생존 및/또는 증식을 향상시킬 수 있다는 것은 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포가 유전적으로 변형 및/또는 형질도입되기 전 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포(들)와 동일한 대조군 세포(들), 또는 LE 또는 추정상의 LE를 포함하지만 LE 또는 LE의 세포내 도메인이 없는 테스트 중인 레트로바이러스 입자와 동일한 레트로바이러스 입자로 형질도입된 대조군 세포와 비교하여, IL-2, IL-15 또는

IL-7과 같은 1종 이상의 추가된 사이토카인 또는 추가된 림프구 유사분열 촉진제의 부재하에 배양 배지에서 생체외 또는 시험관내 배양에서 개선된 생존 또는 확장을 나타내고, 할 수 있고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 이에 대해 변형됨을 의미할 수 있되, 상기 대조군 세포(들)의 상기 생존 또는 증식은 IL-2, IL-15 또는 IL-7과 같은 상기 하나 이상의 사이토카인 또는 상기 림프구 유사분열 촉진제를 배양 배지에 첨가함으로써 촉진된다. 사이토카인 또는 림프구 유사분열 촉진제가 첨가되는 것은 초기 배양 배지와 비교하여 세포(들)를 배양하는 동안 상기 사이토카인 또는 림프구 유사분열 촉진제의 농도가 배양 배지에서 증가되도록 외인성 공급원으로부터 배양 배지에 첨가되는 것을 의미하며, 일부 실시형태에서, 이는 상기 첨가 전에 초기 배양 배지에 없을 수 있다. "첨가된" 또는 "외인성으로 첨가된"은 이러한 사이토카인 또는 림프구 유사분열 촉진제가 변형 후 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포에 사용되는 림프구 배지에 첨가됨을 의미하되, 배양 배지는 사이토카인 또는 림프구 유사분열 촉진제를 이미 가지고 있지 않을 수 있다. 다중 배지 성분은의 혼합물을 포함하는 배지의 전부 또는 일부는 전형적으로 보관되고, 예시적인 실시형태에서, 외인성으로 첨가된 사이토카인(들) 또는 림프구 유사분열 촉진제(들) 없이 배양이 일어나는 부위로 운송된다. 일부 실시형태에서, 림프구 배지는 공급자로부터 구입되며, 공급자에 의해 고용되지 않고 공급자 시설에 위치하지 않는 기술자와 같은 사용자가 외인성으로 첨가되는 사이토카인 또는 림프구 유사분열 촉진제를 림프구 배지에 첨가한 다음, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이러한 외인성으로 첨가된 사이토카인 또는 림프구 유사분열 촉진제의 존재 또는 부재하에 배양된다.

[0480] 일부 실시형태에서, 개선 또는 향상된 생존, 확장 및/또는 증식은 CLE를 암호화하는 게놈을 갖는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)로 형질도입된 세포로부터의 DNA를 시퀀싱하고, 각 CLE로부터의 고유 식별자에 존재하는 서열의 발생을 계수함으로써 결정된 세포의 수의 증가로 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 개선된 생존 및/또는 개선된 증식은, 예를 들어, 혈구계 또는 세포 계수기를 사용하여, 각 시점에서 세포를 직접 계수함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개선된 생존 및/또는 개선된 증식 및/또는 농축은 각 작제물에 대해 이후 시점(제21일, 제28일, 제35일 및/또는 제45일)의 세포 수를 제7일의 세포의 수로 나눔으로써 계산될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 혈구계 또는 세포 계수기에 의해 계수될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 특정 테스트 작제물의 핵산 수 또는 세포 수를 사용하여 결정된 농축 수준은 각각의 대조군 작제물, 즉, 동일한 세포의 도메인 및 막관통 도메인을 갖지만 테스트 작제물에 존재하는 세포내 도메인이 결여되어 있는 작제물의 농축 수준으로 정규화될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 작제물에 암호화된 LE는 적어도 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배 또는 10-배의 정규화된 농축 수준, 또는 1.5-배 내지 25-배의 정규화된 농축 수준, 또는 3-배 내지 20-배의 정규화된 농축 수준, 또는 5-배 내지 25-배의 정규화된 농축 수준, 또는 5-배 내지 20-배의 정규화된 농축 수준 또는 5-배 내지 15-배의 정규화된 농축 수준을 제공한다(또는 LE를 암호화하는 게놈을 갖는 레트로바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)로 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 이를 제공하고, 이에 대해 적합화되고, 이의 특성을 보유하고/하거나 이에 대해 변형될 수 있음).

[0481] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 사이토카인 수용체 또는 이의 신호전달 도메인을 포함하는 단백을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 수용체는 CD27, CD40, CRLF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, EPOR, GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2R, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7R, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL13R, IL13RA1, IL13RA2, IL15R, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27R, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, MPL, OSMR, PRLR, TGF β R, TGF β 유인 수용체, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18일 수 있다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 수용체는 CD27, CD40, CRLF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, EPOR, GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL22RA1, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, MPL, OSMR, PRLR, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18일 수 있다.

[0482] 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 사이토카인 수용체 CD27, CD40, CRLF2, CSF2RA, CSF3R, EPOR, GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR2, IL1R1, IL1RL1, IL2RA, IL2RG, IL3RA, IL5RA, IL6R, IL7R, IL9R, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RB, IL18R1, IL18RAP, IL20RB, IL22RA1, IL27RA, IL31RA, LEPR, MPL, OSMR, PRLR, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18로부터의 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소 내 세포내 도메인은 CD40, CRLF2, CSF2RA, CSF3R, EPOR, FCGR2A, IFNAR2, IFNGR2, IL1R1, IL3RA, IL7R, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL13RA2, IL18RAP, IL31RA, MPL, MYD88,

TNFRSF14 또는 TNFRSF18로부터의 도메인을 포함하며, 이는 W02019/055946에 개시된 바와 같이 초기 스크리닝 및 반복 스크리닝에서 특히 주목할 만한 농축을 나타내는 작제물에 존재한다.

- [0483] 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 CD27, CD28, OX40(TNFRSF4로도 지칭됨), GITR(TNFRSF18로도 지칭됨) 또는 HVEM(TNFRSF14로도 지칭됨)으로부터의 공동자극 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, OX40으로부터의 공동자극 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 CD3Z, CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, BTLA, CD30, GITR 또는 HVEM으로부터의 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, GITR로부터의 공동자극 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 CD3Z, CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, BTLA, CD30 또는 HVEM으로부터의 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, CD28로부터의 공동자극 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 CD3Z, 4-1BB, ICOS, CD27, BTLA, CD30 또는 HVEM으로부터의 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, OX40, CD3Z, CD28, 4-1BB, ICOS, CD27, BTLA, CD30, GITR 또는 HVEM으로부터의 공동자극 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 막관통 도메인의 코일형-코일(coiled-coil) 스페이서 도메인 N-말단을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, GITR로부터의 공동자극 도메인을 포함하는 림프증식성 요소는 GITR의 공동자극 도메인의 N-말단인 CD3Z로부터의 세포내 도메인을 포함하지 않는다.
- [0484] 소정의 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 CD40, MPL IL2Rb 중 임의의 2개의 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 사이토카인 수용체가 아닐 수 있다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 수용체 이외의 림프증식성 요소는 CD2, CD3D, CD3G, CD3Z, CD4, CD8A, CD8B, CD28, CD79A, CD79B, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C 또는 ICOS로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.
- [0485] 일부 실시형태에서, CLE를 포함하는 림프증식성 요소는 위에 개시된 바와 같은 세포내 활성화 도메인을 포함한다. 일부 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 ITAM-함유 도메인을 포함하는 세포내 활성화 도메인을 포함하는 CLE이고, 따라서 CLE는 CLE가 ASTR을 포함하지 않는 본 명세서에 제공된 CD3Z, CD3D, CD3E, CD3G, CD79A, CD79B, DAP12, FCER1G, FCGR2A, FCGR2C, DAP10/CD28 또는 ZAP70 도메인에 대해 적어도 80%, 90%, 95%, 98% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 세포내 활성화 도메인을 포함할 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 세포내 활성화 도메인은 CD3D, CD3G, CD3Z, CD79A, CD79B, FCER1G, FCGR2A 또는 FCGR2C로부터의 ITAM-함유 도메인이다. 이러한 세포내 활성화 도메인을 포함하는 CLE는 외인성 IL-2와 같은 외인성 사이토카인의 부재하에 배양물에서 생체의 PBMC의 증식을 촉진하는데 효과적인 것으로 W02019/055946에 설명되어 있다. 일부 실시형태에서, CD3D, CD3G, CD3Z, CD79A, FCER1G로부터의 세포내 도메인을 포함하는 CLE가 본 명세서에 제공된다.
- [0486] 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 하나 이상의 도메인은 CAR의 공동-자극 도메인 및/또는 세포내 활성화 도메인과 같은 조절 도메인에 융합된다. 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법 양태의 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소의 하나 이상의 세포내 도메인은 CAR과 동일한 폴리펩타이드의 일부일 수 있거나, 또는 CAR의 일부 성분에 융합되고 그리고 선택적으로 기능적으로 연결될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 ASTR, 세포내 활성화 도메인(예컨대, CD3 제타 신호전달 도메인), 공동-자극 도메인 및 림프증식성 도메인을 포함할 수 있다. 공동-자극 도메인, 세포내 활성화 도메인, ASTR 및 다른 CAR 도메인에 관한 추가의 세부사항은 본 명세서의 다른 곳에 개시되어 있다.
- [0487] 본 명세서에 제공된 림프증식성 요소는 전형적으로는 막관통 도메인을 포함한다. 예를 들어, 막관통 도메인은 W02019/055946에 개시된 다음 유전자 및 대표적인 서열로부터의 막관통 도메인 중 어느 하나에 대해 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가질 수 있다: CD8 베타, CD4, CD3 제타, CD28, CD134, CD7, CD2, CD3D, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD8A CD8B, CD27, CD28, CD40, CD79A, CD79B, CRLF2, CRLF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF2RB, CSF3R, EPOR, FCER1G, FCGR2C, FCGR2A, GHR, GHR, ICOS, IFNAR, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, MPL, OSMR, PRLR, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 및 TNFRSF18. 임의의 조작된 신호전달 폴리펩타이드에 사용하기에 적합한 막관통(TM) 도메인은 본 명세서에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이 구성적으로 활성인 사이토카인 수용체, LMP1로부터의 TM 도메인 및 이량체화 모티프를 포함하는 유형 1 TM 단백질로부터의 TM 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 유형 I 막관통 단백질로부터의 막관통 도메인을 포함하는 본 명세서에 개시된 임의의 양태에서, 막관통 도메인은 유형 I 성장 인자 수용체, 호르몬 수용체, T 세포 수용체 또는 TNF-패밀리 수용체일 수 있다.
- [0488] 엘트롬보펙은 트롬보포이에틴 수용체 MPL(TPOR로도 알려져 있음)의 소분자 활성인자이다. 일부 양태에서, MPL

막관통 도메인을 포함하는 LE를 발현하는 세포는 엘트롬보펙에 노출 또는 접촉될 수 있거나, 또는 이러한 세포가 주입된 환자 또는 대상체는 엘트롬보펙으로 치료될 수 있다. 상기 접촉 또는 치료시, LE의 증식 및/또는 생존 특성이 활성화되고 세포에 제공되어, 엘트롬보펙의 부재와 비교하여 세포의 생존 및/또는 증식을 증가시킨다. 이론에 제한되지 않고, 엘트롬보펙의 결합은 막관통 도메인에서 발생하고, 동일한 폴리펩타이드의 일부인 하나 이상의 세포내 도메인을 활성화할 수 있다. 당업자는 MPL 막관통 도메인을 포함하는 CLE를 활성화하는데 사용되는 엘트롬보펙의 양을 이해할 것이다.

[0489] 일부 실시형태에서, CLE는 동일한 단백질, 예시적인 실시형태에서, 동일한 수용체로부터의 세포외 부분 및 막관통 부분을 모두 포함하며, 이들 중 하나는 예시적인 실시형태에서 돌연변이체이며, 따라서 세포외 및 막관통 도메인을 형성한다. 이러한 도메인은 적어도 일부 세포 유형에서 발현될 때 구성적으로 활성인 것으로 보고된 일부 실시형태에서 사이토카인 수용체 또는 이의 돌연변이체, 또는 호르몬 수용체 또는 이의 돌연변이체로부터 유래할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 세포외 및 막관통 도메인은 리간드 결합 영역을 포함하지 않는다. 이러한 도메인은 CLE가 존재하며 B 세포, T 세포 및/또는 NK 세포에서 발현될 때 리간드에 결합하지 않는 것으로 여겨진다. 이러한 수용체 돌연변이체의 돌연변이는 막관통 영역 또는 세포외 막근접 영역에서 발생할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 본 명세서에 제공된 CLE의 적어도 일부 세포외 - 막관통 도메인의 돌연변이는 리간드의 부재하에, 일반적으로 함께 있지 않은 활성화 사슬을 함께 가져오거나 또는 연결된 막관통 및/또는 세포내 도메인의 구성을 변경함으로써 CLE의 신호전달을 담당한다.

[0490] 예시적인 실시형태에서, 이러한 도메인을 포함하는 실시형태의 CLE에 대한 예시적인 세포외 및 막관통 도메인은 전형적으로 관련 세포내 도메인의 활성화를 위해 리간드 결합을 필요로 하지 않는 구성적인 것으로 보고된 돌연변이체 수용체로부터의 막관통 도메인과 함께 막-근위 세포외 도메인의 30개 미만의 아미노산인 세포외 영역이다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 세포외 및 막관통 도메인은 IL7RA Ins PPCL, CRLF2 F232C, CSF2RB V449E, CSF3R T640N, EPOR L251C I252C, GHR E260C I270C, IL27RA F523C 및 MPL S505N을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포외 및 막관통 도메인은 IL7RA 또는 이의 돌연변이체의 세포외 및/또는 막관통 도메인의 일부와 서열이 동일한 10개, 20개, 25개, 30개 또는 50개 초과 연속 아미노산을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포외 및 막관통 도메인은 IL7RA Ins PPCL이 아니다. 일부 실시형태에서, 세포외 및 막관통은 IL15R의 세포외 및/또는 막관통 도메인의 일부와 서열이 동일한 10개, 20개, 25개, 30개 또는 50개 초과 연속 아미노산을 포함하지 않는다.

[0491] 이러한 양태의 한 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 LE는 세포외 도메인을 포함하며, 예시적인 실시형태에서, 세포외 도메인은 이량체화 모티프를 포함한다. 이러한 양태의 예시적인 실시형태에서, 세포외 도메인은 류신 지퍼를 포함한다. 일부 실시형태에서, 류신 지퍼는 jun 폴리펩타이드, 예를 들어, c-jun으로부터 유래한다. 소정의 실시형태에서, c-jun 폴리펩타이드는 ECD-11의 c-jun 폴리펩타이드 영역이다.

[0492] 막관통 도메인이 유형 I 막관통 단백질인 이러한 양태 및 실시형태 중 임의의 실시형태에서, 막관통 도메인은 유형 I 성장 인자 수용체, 호르몬 수용체, T 세포 수용체 또는 TNF-패밀리 수용체일 수 있다. 키메라 폴리펩타이드가 세포외 도메인을 포함하고 세포외 도메인은 이량체화 모티프를 포함하는 양태 및 실시형태 중 임의의 실시형태에서, 막관통 도메인은 유형 I 사이토카인 수용체, 호르몬 수용체, T 세포 수용체 또는 TNF-패밀리 수용체일 수 있다.

[0493] 예시적인 막관통 도메인은 W02019/055946에 예시된 임의의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD4, CD8RB, CD40, CRLF2, CSF2RA, CSF3R, EPOR, FCGR2C, GHR, ICOS, IFNAR1, IFNGR1, IFNGR2, IL1R1, IL1RAP, IL2RG, IL3RA, IL5RA, IL6ST, IL7RA, IL10RB, IL11RA, IL13RA2, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL22RA1, IL31RA, LEPR, PRLR 및 TNFRSF8, 또는 이러한 돌연변이체가 W02019/055946에 제공된 작제물에 존재하는 경우 소정의 세포 유형에서 신호전달 활성을 촉진하는 것으로 알려진 이들의 돌연변이체로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD40, ICOS, FCGR2C, PRLR, IL3RA 또는 IL6ST로부터 유래한다.

[0494] 일부 실시형태에서, 세포외 및 막관통 도메인은 바이러스 단백질 LMP1 또는 이의 돌연변이체 및/또는 단편이다. LMP1은 지질 라프트(lipid raft)를 표적화하거나 또는 CD40에 융합될 때 리간드와 무관하게 세포 신호전달을 활성화하는 것으로 알려진 다중스팬 막관통 단백질이다(문헌[Kaykas et al. EMBO J. 20: 2641(2001)]). LMP1의 단편은 전형적으로 원형질막에 걸쳐 있고, 연결된 세포내 도메인(들)을 활성화하기에 충분히 길다. 예를 들어, LMP1은 15개 내지 386개, 15개 내지 200개, 15개 내지 150개, 15개 내지 100개, 18개 내지 50개, 18개 내지 30개, 20개 내지 200개, 20개 내지 150개, 20개 내지 50개, 20개 내지 30개, 20개 내지 100개, 20개 내지 40개

또는 20개 내지 25개의 아미노산일 수 있다. 본 명세서에 제공된 LE에 포함될 때, LMP1의 돌연변이체 및/또는 단편은 세포내 도메인을 활성화하는 능력을 보유한다. 또한, 존재하는 경우, 세포외 도메인은 적어도 1개, 그러나 전형적으로 적어도 4개의 아미노산을 포함하며, 전형적으로 연결된 제거 도메인, 예를 들어, eTag와 같은 또 다른 기능적 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 LMP1 막관통 도메인을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 LMP1 막관통 도메인을 포함하고, 하나 이상의 세포내 도메인은 TNFRSF 단백질(즉, CD40, 4-1BB, RANK, TACI, OX40, CD27, GITR, LTR 및 BAFFR), TLR1 내지 TLR13, 인테그린, FcγRIII, 텍틴1, 텍틴2, NOD1, NOD2, CD16, IL-2R, 유형 I II 인터페론 수용체, 케모카인 수용체, 예컨대, CCR5 및 CCR7, G-단백질 커플링된 수용체, TREM1, CD79A, CD79B, Ig-알파, IPS-1, MyD88, RIG-1, MDA5, CD3Z, MyD88 ΔTIR, TRIF, TRAM, TIRAP, MAL, BTK, RTK, RAC1, SYK, NALP3(NLRP3), NALP3 ΔLRR, NALP1, CARD9, DAI, IPAG, STING, Zap70 또는 LAT로부터의 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0495] 본 명세서에 제공된 CLE의 다른 실시형태에서, 세포외 도메인은 이량체화 모이어티를 포함한다. 본 명세서에 개시된 많은 상이한 이량체화 모이어티가 이러한 실시형태에 사용될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이량체화 모이어티는 동종이량체화할 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 이량체화 모이어티는 막관통 도메인을 통해 이에 연결된 세포내 도메인에 활성화 기능을 제공할 수 있다. 이러한 활성화는, 예를 들어, 이량체화 모이어티의 이량체화시에 제공될 수 있으며, 이는 막관통 도메인을 통해 이에 연결된 세포내 도메인의 배향을 변화시키거나 또는 세포내 도메인이 근접하게 할 수 있다. 이량체화 모이어티를 갖는 세포외 도메인은 또한 세포 태그 폴리펩타이드를 CLE를 발현하는 세포에 연결하는 기능을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이량체화제는 세포외가 아니라 세포내에 위치할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 또는 여러 개의 이량체화 도메인이 사용될 수 있다.

[0496] 세포외 도메인이 이량체화 모티프를 갖는 실시형태에 대한 세포외 도메인은 류신 지퍼 이량체와 같은 이량체를 형성하기에 충분히 길다. 이와 같이, 이량체화 모이어티를 포함하는 세포외 도메인은 15개 내지 100개, 20개 내지 50개, 30개 내지 45개 또는 35개 내지 40개의 아미노산일 수 있으며, 예시적인 실시형태에서, c-Jun 세포외 도메인의 c-Jun 부분이다. 이량체화 모이어티를 포함하는 폴리펩타이드의 세포외 도메인은 다른 기능을 보유하지 않을 수 있다. 예를 들어, 류신 지퍼 실시형태의 경우, 이러한 류신 지퍼는 알파 나선을 따라 7개의 잔기가 이격된 류신의 모티프를 보유하기 때문에 이량체를 형성할 수 있다. 그러나, 본 명세서에 제공된 CLE의 소정의 실시형태의 류신 지퍼 모이어티는 DNA 결합 기능을 보유하거나 또는 보유하지 않을 수 있다.

[0497] 1개 내지 4개의 알라닌 잔기의 스페이서가 이량체화 모이어티를 갖는 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이의 CLE에 포함될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 알라닌 스페이서는 세포내 도메인의 배향을 변경함으로써 막관통 도메인을 통해 류신 지퍼 세포외 영역에 연결된 세포내 도메인의 신호전달에 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

[0498] 본 명세서에 제공된 CLE의 제1 및 선택적 제2 세포내 도메인은 증식, 생존(항-세포자멸)을 촉진하고/하거나 증식 가능성 또는 세포 사멸에 대한 저항성을 향상시키는 공동-자극 신호를 제공하기 위해 적어도 일부 세포 유형에서 알려진 유전자의 세포내 신호전달 도메인이다. 이와 같이, 이러한 세포내 도메인은 본 명세서에 제공된 림프증식성 요소 및 공동-자극 도메인으로부터의 세포내 도메인일 수 있다. 본 명세서에 제공된 림프증식성 요소의 많은 세포내 도메인은 jak/stat 경로를 활성화하고, 따라서 JAK1/JAK2, JAK3, TYK2(Jak 패밀리의 구성원), STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 및 STAT6 신호전달과 같은 jak/stat 신호전달을 활성화한다. STAT의 활성화는 STAT의 동원, STAT의 인산화, STAT의 이량체화 및/또는 STAT의 전위를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 림프증식성 요소는 구성적으로 활성화이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 림프증식성 요소는 하나 이상의 JAK 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, JAK-결합 도메인은 EPOR, GP130, PRLR, GHR, GCSFR 또는 TPOR/MPLR이거나 또는 이들로부터 유래된다. 이러한 단백질로부터의 JAK-결합 도메인은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 이들을 사용하는 방법을 이해할 것이다. 예를 들어, EpoR의 273번 내지 338번 잔기 및 TpoR의 478번 내지 582번 잔기는 JAK-결합 도메인으로 알려져 있다. 이 신호전달을 담당하는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인에서 발견되는 보존된 모티프는 공지되어 있으며, 본 명세서에 제공된 소정의 예시적인 림프증식성 요소에 존재한다(예를 들어, 문헌[Morris et al., "The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway," Protein Science (2018) 27:1984-2009] 참조). 박스1 및 박스2 모티프는 JAK에 대한 결합 및 신호 전달에 관여하지만, 박스2 모티프의 존재는 증식 신호에 항상 필요한 것은 아니다(문헌[Murakami et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Dec 15; 88(24):11349-53; Fukunaga et al. EMBO J. 1991 Oct; 10(10):2855-65; 및 O'Neal and Lee. Lymphokine Cytokine Res. 1993 Oct; 12(5):309-12]). 따라서, 일부 실시형태에서, 본 명세서의 림프증식성 요소는 박스1 야누스 카이네이스(Janus kinase: JAK)-결합 모티프, 선택적으로 박스2 JAK-결합 모티프를 포함하는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 포함하는 형질전환 박스1-

함유 사이토카인 수용체 및 타이로신 잔기를 포함하는 전사(Signal Transducer and Activator of Transcription: STAT) 결합 모티프이다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 2개 이상의 JAK-결합 모티프, 예를 들어, 3개 이상 또는 4개 이상의 JAK-결합 모티프를 포함한다.

[0499] 많은 사이토카인 수용체가 박스1 모티프에 대해 -1, -2 및 -6의 위치에 소수성 잔기를 가지며, 이는 사이토카인-유도성 JAK2 활성화에 필요하지만 JAK2 결합에는 필요하지 않은 "스위치 모티프"를 형성한다(문헌 [Constantinescu et al. Mol Cell. 2001 Feb; 7(2):377-85; 및 Huang et al. Mol Cell. 2001 Dec; 8(6):1327-38]). 따라서, 형질전환 BOX1-함유 사이토카인 수용체의 소정의 실시형태에서, 림프증식성 요소는 스위치 모티프를 가지며, 예시적인 실시양태에서 Box1 모티프에 대해 -1, -2 및 -6의 위치에 하나 이상, 바람직하게는 모든 소수성 잔기를 갖는다. 소정의 실시형태에서, 림프증식성 요소의 ICD의 박스1 모티프는 STAT 결합 모티프에 비해 막관통 도메인(예를 들어, TM 도메인에서 하류로 10개 내지 50개의 잔기)에 근접하게 위치한 박스2 모티프에 비해 막관통(TM) 도메인(예를 들어, TM 도메인에서 하류로 5개 내지 15개 또는 약 10개의 잔기)에 근접하게 위치한다. STAT 결합 모티프는 전형적으로 타이로신 잔기를 포함하며, 이의 인산화는 림프증식성 요소의 STAT 결합 모티프에 대한 STAT의 결합에 영향을 미친다. 일부 실시형태에서, ICD는 다중 STAT 결합 모티프를 포함하되, 다중 STAT 결합 모티프는 천연 ICD(예를 들어, EPO 수용체 및 IL-6 수용체 신호전달 사슬(gp130))에 존재한다.

[0500] IFNAR1, IFNGR1, IFNLR1, IL2RB, IL4R, IL5RB, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL21R, IL27R, IL31RA, LIFR 및 OSMR로부터의 세포내 도메인은 JAK1 신호전달을 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. CRLF2, CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, EPOR, GHR, IFNGR2, IL3RA, IL5RA, IL6ST, IL20RA, IL20RB, IL23R, IL27R, LEPR, MPL 및 PRLR로부터의 세포내 도메인은 JAK2를 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. IL2RG로부터의 세포내 도메인은 JAK3을 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. GHR, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IL2RB, IL2RG, IL4R, IL5RA, IL5RB, IL7RA, IL9R, IL21R, IL22RA1, IL31RA, LIFR, MPL 및 OSMR로부터의 세포내 도메인은 STAT1을 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. IFNAR1 및 IFNAR2로부터의 세포내 도메인은 STAT2를 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. GHR, IL2RB, IL2RG, IL6R, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27R, IL31RA, LEPR, LIFR, MPL 및 OSMR로부터의 세포내 도메인은 STAT3을 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. IL12RB1로부터의 세포내 도메인은 STAT4를 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. CSF2RA, CSF2RB, CSF3R, EPOR, GHR, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL5RB, IL7RA, IL9R, IL15RA, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL31RA, LIFR, MPL, OSMR 및 PRLR로부터의 세포내 도메인은 STAT5를 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. IL4R 및 OSMR로부터의 세포내 도메인은 STAT6을 활성화하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. 제1 세포내 도메인에서 발견되는 유전자 및 이의 세포내 도메인은 제1 및 제2 세포내 도메인이 동일한 경우 적어도 하나 그리고 전형적으로 막관통 도메인 및 세포외 도메인 둘 다가 동일한 유전자로부터 유래하지 않는다는 것을 제외하고, 선택적 제2 세포내 도메인과 동일하다.

[0501] 일부 실시형태에서, CLE의 모든 도메인은 IL-7 수용체 또는 이의 돌연변이체 및/또는 IL-7 수용체의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 25개의 연속 아미노산을 갖는 이의 단편이 아니거나, 또는 IL-15 수용체 또는 이의 돌연변이체 및/또는 IL-15 수용체의 적어도 10개, 15개, 20개 또는 25개의 연속 아미노산을 갖는 이의 단편이 아니다. 일부 실시형태에서, CLE는 CD40 및 MyD88의 제1 세포내 도메인 및 제2 세포내 도메인의 조합을 포함하지 않는다.

[0502] 예시적인 실시형태에서, CLE는 세포 태그 도메인을 포함한다. 세포 태그에 관한 세부사항은 본 명세서의 다른 부분에 제공된다. 본 명세서에 제공된 임의의 세포 태그는 CLE의 일부일 수 있다. 전형적으로, 세포 태그는 세포외 도메인의 N 말단에 연결된다. 이론에 제한되지 않고, 일부 실시형태에서, 세포외 도메인은 CLE를 발현하는 세포에 세포 태그 도메인을 연결하는 링커, 예시적인 실시형태에서, 가요성 링커를 제공하는 기능을 포함한다.

[0503] 또한, 본 명세서에 제공된 CLE를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 또한 원형질막으로의 발현을 지시하는 신호 서열을 포함한다. 예시적인 신호 서열은 본 명세서에의 다른 부문에서 제공된다. 소정의 실시형태에서, 요소는 CAR 및 CLE가 모두 동일한 전사체로부터 발현되도록 전사체 상에 제공될 수 있다.

[0504] CLE의 세포외 도메인이 이량체화 모티프를 포함하는 임의의 양태 또는 실시형태에서, 이량체화 모티프는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: 류신 지퍼 모티프-함유 폴리펩타이드, CD69, CD71, CD72, CD96, Cd105, Cd161, Cd162, Cd249, CD271 및 Cd324뿐만 아니라 이량체화 능력을 보유하는 이들의 돌연변이체 및/또는 활성 단편. CLE의 세포외 도메인이 이량체화 모티프를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태 및 실시형태에서, 이량체화 모티프는 이량체화체를 필요로 할 수 있고, 이량체화 모티프 및 관련 이량체화체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: FKBP 및 라파마이신 또는 이의 유사체, GyrB 및 쿠머마이신 또는 이의 유사체,

DHFR 및 메토틱세이트 또는 이의 유사체, 또는 DmrB 및 AP20187 또는 이의 유사체뿐만 아니라 이량체화 능력을 보유하는 인공된 이량체화 단백질의 돌연변이체 및/또는 활성 단편. 일부 양태 및 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 구성적으로 활성이며, 활성화를 위해 이량체화제가 필요한 림프증식성 요소가 아니다.

[0505] CLE의 세포의 도메인이 이량체화 모티프를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태 또는 실시형태의 예시적인 실시형태에서, 세포의 도메인은 류신 지퍼 모티프를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 류신 지퍼 모티프는 jun 폴리펩타이드, 예를 들어, c-jun으로부터 유래한다. 소정의 실시형태에서, c-jun 폴리펩타이드는 ECD-11의 c-jun 폴리펩타이드 영역이다.

[0506] 한 실시형태에서 내부적으로 이량체화 및/또는 다량체화하는 림프증식성 요소는 지질 투과성 면역억제제 약물 FK506의 이량체성 유사체를 사용하는 시스템의 필수 부분이며, 이는 FK506-결합 단백질 FKBP12에 유전적으로 융합된 분자를 가교하는 능력을 얻으면서 정상적인 생체활성을 상실한다. 하나 이상의 FKBP와 미리스토일화 서열을 표적 수용체의 세포질 신호전달 도메인에 융합시킴으로써, 이량체화 약물(dimerizer drug)-의존적이지만 리간드 및 엑토도메인-비의존적 방식으로 신호전달을 자극할 수 있다. 이는 시스템에 시간적 제어, 다량체성 약물 유사체를 사용한 가역성 및 향상된 특이성을 제공한다. 3세대 AP20187/AP1903 이량체화 약물의 결합 도메인 FKBP12에 대한 높은 친화성은 내인성 FKBP12를 통한 비-특이적 부작용의 유도 없이 생체내에서 재조합 수용체의 특이적 활성화를 허용한다. 이량체화 약물에 결합하는 FKBP12V36과 같은 아미노산 치환 및 결실을 갖는 FKBP12 변이체가 또한 사용될 수 있다. 또한, 합성 리간드는 프로테이스 분해에 저항성이 있어, 대부분의 전달된 단백질 작용제보다 생체내 수용체 활성화를 더 효율적이게 한다.

[0507] 결합 및 융합성 요소

[0508] 본 명세서에 제공된 많은 방법, 조성물 및 키트는 표면에 T 세포 및/또는 NK 세포 결합 폴리펩타이드의 다중 카피 및 융합원(fusogen)이라고도 하는 융합성 폴리펩타이드의 다중 카피를 갖는 레트로바이러스 입자를 포함한다. "결합 폴리펩타이드"는 표적 숙주 세포를 식별하고 이에 결합하는 하나 이상의 폴리펩타이드, 전형적으로 당단백질을 포함한다. "융합성 폴리펩타이드"는 레트로바이러스와 표적 숙주 세포막의 융합을 매개하여 레트로바이러스 게놈이 표적 숙주 세포에 진입할 수 있게 한다. 소정의 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드(들) 및 융합성 폴리펩타이드(들)는 동일한 이종 당단백질 상에 있다. 다른 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드(들) 및 융합성 폴리펩타이드(들)는 2개 이상의 상이한 이종 당단백질 상에 있다.

[0509] 이러한 결합 및 융합성 폴리펩타이드 기능 중 하나 또는 둘 모두는 슈도타이핑 요소에 의해 제공될 수 있다. 이종 외피 당단백질을 갖는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 슈도타이핑은 전형적으로 바이러스의 친화성을 변경하고, 숙주 세포의 형질 도입을 촉진한다. 본 명세서에 제공된 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 폴리펩타이드(들)/단백질(들)로서, 또는 폴리펩타이드(들)/단백질(들)을 암호화하는 핵산 서열로서 제공된다.

[0510] 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 상이한 바이러스로부터의 외피 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 고양이 내인성 바이러스(RD114) 외피 단백질, 온코레트로바이러스 양쪽 숙주 외피 단백질, 온코레트로바이러스 동종숙주 외피 단백질, 수포성 구내염 바이러스 외피 단백질(VSV-G)(서열번호 336), 개코 원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질(BaEV)(서열번호 337), 무린 백혈병 외피 단백질(MuLV)(서열번호 338), 인플루엔자 당단백질 HA 표면 당단백질(HA), 인플루엔자 당단백질 뉴로미니데이스(NA), 파라믹소바이러스 홍역 외피 단백질 H, 파라믹소바이러스 홍역 외피 단백질 F, 투파이아 파라믹소바이러스(TPMV) 외피 단백질 H, TPMV 외피 단백질 F, 니파 바이러스(NiV) 외피 단백질 H, NiV 외피 단백질 G, 신드비스 바이러스(SINV) 단백질 E1, SINV 단백질 E2 및/또는 임의의 이러한 외피 단백질의 기능적 변이체 또는 단편이다(예를 들어, 문헌[Frank and Buchholz Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Oct 17;12:19-31] 참조).

[0511] 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 야생형 BaEV일 수 있다. 이론에 제한되지 않고, BaEV는 형질도입을 저해하는 것으로 나타난 R 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, BaEV는 R 펩타이드의 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, BaEV는 아미노산 서열 HA를 암호화하는 뉴클레오타이드 뒤에 저해성 R 펩타이드의 결실을 포함할 수 있으며, 본 명세서에서 BaEV ΔR(HA)(서열번호 339)로 지칭된다. 일부 실시형태에서, BaEV는 아미노산 서열 HAM을 암호화하는 뉴클레오타이드 뒤에 저해성 R 펩타이드의 결실을 포함할 수 있으며, 본 명세서에서 BaEV ΔR(HAM)(서열번호 340)로 지칭된다.

[0512] 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 야생형 MuLV일 수 있다. 일부 실시형태에서, MuLV는 외피 당단백질의 막 관통(TM)과 표면(SU) 서브유닛 사이에 위치한 퓨린-매개성 절단 부위를 제거하기 위해 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, MuLV는 패키징 세포에서 MuLV 외피 단백질의 퓨린-매개성 절단을 저해하는

SUx 돌연변이(MuLVSUx)(서열번호 372)를 포함한다. 소정의 실시형태에서, MuLV 또는 MuLVSUx 단백질의 세포질 꼬리의 c-말단은 4개 내지 31개의 아미노산으로 절단된다. 소정의 실시형태에서, MuLV 또는 MuLVSUx 단백질의 세포질 꼬리의 c-말단은 4개, 8개, 12개, 16개, 20개, 24개, 28개 또는 31개의 아미노산으로 절단된다.

[0513] 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 상이한 단백질로부터 유래되는 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드를 포함한다. 일 양태에서, 슈도타이핑 요소는 인플루엔자 단백질 헤마글루티닌 HA 및/또는 뉴라미니데이스(neuraminidase: NA)를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, HA는 인플루엔자 바이러스 하위유형 H1N1로부터 유래한다. 예시적인 실시형태에서, HA는 H1N1 PR8 1934로부터 유래하며, 여기서 일염기성 트립신-의존적 절단 부위는 더욱 무차별적인 다염기성 서열(서열번호 311)로 돌연변이되었다. 소정의 실시형태에서, NA는 인플루엔자 바이러스 하위유형 H10N7로부터 유래한다. 예시적인 실시형태에서, NA는 H10N7-HKWF446C-07(서열번호 312)로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드는 표적 세포에 결합하는 능력을 보유하는 VSV-G, BaEV, BaEV ΔR(HA), BaEV ΔR(HAM), MuLV, MuLVSUx, 인플루엔자 HA, 인플루엔자 NA 또는 홍역 외피 단백질 H의 기능적 변이체 또는 단편일 수 있고, 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스와 표적 숙주 세포막의 융합을 매개하는 능력을 보유하는 VSV-G, BaEV, BaEV ΔR(HA), BaEV ΔR(HAM), MuLV, MuLVSUx, 인플루엔자 HA, 인플루엔자 NA 또는 홍역 외피 단백질 F의 기능적 변이체 또는 단편일 수 있다.

[0514] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 홍역 바이러스(MV)의 융합(F) 및/또는 헤마글루티닌(H) 폴리펩타이드, 비제한적인 예로서, MV의 임상적 야생형 균주 및 에드먼스톤 균주(MV-Edm)(Genbank; AF266288.2) 또는 이들의 단편을 포함하는 백신 균주와 함께 슈도타이핑될 수 있다. 이론에 제한되지 않고, 헤마글루티닌(H) 및 융합(F) 폴리펩타이드 모두 숙주 세포로 진입하는 역할을 하는 것으로 여겨지되, H 단백질은 MV를 표적 세포의 수용체 CD46, SLAM 및 벡틴-4에 결합하고, F는 레트로바이러스와 숙주 세포막의 융합을 매개한다. 예시적인 실시형태에서, 특히 표적 세포가 T 세포 및/또는 NK 세포인 경우, 결합 폴리펩타이드는 홍역 바이러스 H 폴리펩타이드이고, 융합성 폴리펩타이드는 홍역 바이러스 F 폴리펩타이드이다.

[0515] 일부 연구에서, 절단된 F 및 H 폴리펩타이드로 슈도타이핑된 렌티바이러스 입자는 역가 및 형질도입 효율을 상당히 증가하였다(문헌[Funke et al. 2008. *Molecular Therapy*. 16(8):1427-1436]), (문헌[Frecha et al. 2008. *Blood*. 112(13):4843-4852]). F 세포질 꼬리가 30개의 잔기로 절단되었을 때 가장 높은 역가가 얻어졌다(MV(Ed)-F Δ30으로 지칭됨(서열번호 313)). H 변이체의 경우, 18개 또는 19개의 잔기가 결실되었을 때(MV(Ed)-H Δ18(서열번호 314) 또는 MV(Ed)-H Δ19) 최적의 절단이 발생하였지만, 결실된 잔기를 알라닌으로 대체하거나 대체하지 않고 24개의 잔기의 절단이 있는 변이체(MV(Ed)-H Δ24(서열번호 315) 및 MV(Ed)-H Δ24+A)도 또한 최적의 역가를 초래하였다. 따라서, 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입하는 것에 대한 것을 포함하여, 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 홍역 바이러스 융합(F) 및 헤마글루티닌(H) 폴리펩타이드의 돌연변이된 또는 변이체 버전, 예시적인 예에서, 홍역 바이러스 F 및 H 폴리펩타이드의 세포질 도메인 결실 변이체로 슈도타이핑된다. 일부 실시형태에서, 돌연변이된 F 및 H 폴리펩타이드는 세포질 부분이 절단된, 즉, 아미노산 잔기(또는 단백질을 암호화하는 상응하는 핵산 분자의 코딩 핵산)가 결실된 "절단 H" 또는 "절단 F" 폴리펩타이드이다. "HΔY" 및 "FΔX"는 각각 이러한 절단 H 및 F 폴리펩타이드를 나타내며, "Y"는 아미노 말단으로부터 결실된 1개 내지 34개의 잔기를 지칭하고, "X"는 세포질 도메인의 카복시 말단으로부터 결실된 1개 내지 35개의 잔기를 지칭한다. 추가의 실시형태에서, "절단 F 폴리펩타이드"는 F Δ24 또는 F Δ30이고/이거나 "절단 H 단백질"은 H Δ14, H Δ15, H Δ16, H Δ17, H Δ18, H Δ19, H Δ20, H Δ21+A, H Δ24 및 H Δ24+4A로 이루어진 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 H Δ18 또는 H Δ24이다. 예시적인 실시형태에서, 절단 F 폴리펩타이드는 MV(Ed)-F Δ30이고, 절단 H 폴리펩타이드는 MV(Ed)-H Δ18이다.

[0516] 일부 실시형태에서, 별도의 결합 및/또는 융합성 폴리펩타이드 하나 이상의 비 바이러스-유래 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드는 표적 세포 상의 폴리펩타이드에 결합하는 항체, 리간드 또는 수용체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드는 CD16, CD56 및 CD57과 같은 NK 세포의 표면 상의 단백질을 인식한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드는 CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD62L, CCR7, TCRα 및 TCRβ와 같은 T 세포의 표면 상의 단백질을 인식한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드도 또한 활성화 요소이다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드는 CD3에 결합하는 막 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 융합원은 결합 활성인 SV1을 제거하도록 변형된 신드비스 바이러스 당단백질로부터 유래되며, 결합 폴리펩타이드는 막-결합 항-CD3 항체이다(문헌[Yang et al. 2009. *Pharm Res* 26(6):1432-1445]).

[0517] 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소도 또한 활성화 요소이다. 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 항 CD3scFv를 포함하는 항-CD3 항체와 같은 CD3에 결합하는 폴리펩타이드에 융합된 VSV-G이다. 일부 실시형태에서,

슈도타이핑 요소는 항CD3scFv를 포함하는 항-CD3 항체와 같은 CD3에 결합하는 폴리펩타이드에 융합된 MuLV이다.

[0518] 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 2종 이상의 이중 바이러스로부터의 외피 당단백질로 코슈도타이핑된다 (copseudotyped). 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 VSV-G 또는 이의 기능적 변이체 또는 단편, 및 RD114, BaEV, MuLV, 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스로부터의 외피 단백질 및/또는 이들의 기능적 변이체 또는 단편으로 코슈도타이핑된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 VSV-G로 그리고 절단된 세포질 도메인이 있는 MV(Ed)-H 당단백질 또는 MV(Ed)-H 당단백질로 코슈도타이핑된다. 예시적인 실시형태에서, 바이러스 입자는 VSV-G 및 MV(Ed)-HΔ24로 코슈도타이핑된다. 소정의 실시형태에서, VSV-G는 절단된 세포질 도메인이 있는 MuLV 또는 MuLV로 코슈도타이핑된다. 다른 실시형태에서, VSV-G는 절단된 세포질 도메인이 있는 MuLV_{SUx} 또는 MuLV_{SUx}로 코슈도타이핑된다. 추가의 예시적인 실시형태에서, VSV-G는 MuLV에 대한 항CD3scFv의 융합으로 코슈도타이핑된다.

[0519] 일부 실시형태에서, 융합성 폴리펩타이드는 클래스 I 융합원으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 융합성 폴리펩타이드는 클래스 II 융합원으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드 및 별도의 융합성 폴리펩타이드는 모두 바이러스-유래이다. 일부 실시형태에서, 융합성 폴리펩타이드는 하나의 폴리펩타이드로 발현되는 다중 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드는 동일한 전사체로부터 번역되지만, 별개의 리보솜 결합 부위로부터 번역된다; 다른 실시형태에서, 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드는 결합 이론에 의해 결합되지 않는 절단 펩타이드 부위에 의해 분리되며, 이는 문헌에서 흔히 볼 수 있는 바와 같이 번역 후에 절단되거나 또는 리보솜 스킵 서열이다. 일부 실시형태에서, 분리된 리보솜 결합 부위로부터의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드의 번역은 결합 폴리펩타이드와 비교하여 더 많은 양의 융합성 폴리펩타이드를 생성한다. 일부 실시형태에서, 융합성 폴리펩타이드 대 결합 폴리펩타이드의 비는 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 6:1, 적어도 7:1 또는 적어도 8:1이다. 일부 실시형태에서, 융합성 폴리펩타이드 대 결합 폴리펩타이드의 비는 범위의 하한에서 1.5:1, 2:1 또는 3:1 내지 범위의 상한에서 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 또는 10:1이다.

[0520] 짧은 접촉 시간을 포함하는 본 명세서에 개시된 실시형태에서, 세포 제형 내 많은 변형된 림프구는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와의 회합을 통해 또는 레트로바이러스 외피와 변형된 림프구의 원형질막의 융합에 의해 변형된 림프구를 대상체에게 재도입하는 동안 표면에 슈도타이핑 요소를 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 변형된 림프구의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 변형된 림프구의 표면에 결합될 수 있고/있거나 슈도타이핑 요소는 변형된 림프구의 원형질막에 존재할 수 있다.

[0521] 활성화 요소

[0522] 본 개시내용의 많은 방법 및 조성물 양태는 T 세포 활성화 요소로도 지칭되는 활성화 요소 또는 활성화 요소를 암호화하는 핵산을 포함한다. 휴지기 T 세포로의 렌티바이러스(LV) 형질도입과 관련된 제한은 일련의 사전-진입 및 진입 후 장벽뿐만 아니라 세포 제한 인자에 기인한다(문헌[Strebel et al 2009. *BMC Medicine* 7:48]). 한 가지 제한은 외피 슈도타이핑된-LV 입자가 잠재적 수용체를 인식하고 세포막과의 융합을 매개할 수 없다는 것이다. 그러나, 소정의 조건하에서, HIV-1-기반 렌티바이러스 벡터를 이용한 휴지기 T 세포의 형질도입은 주로 T 세포 수용체(TCR) CD3 복합체 및 CD28을 공동-자극할 때(문헌[Korin & Zack. 1998. *Journal of Virology*. 72:3161-8, Maurice et al. 2002. *Blood* 99:2342-50]) 뿐만 아니라 사이토카인에 대한 노출을 통해(문헌[Cavaliere et al. 2003]) 가능하다.

[0523] T 림프구와 같은 면역계의 세포는 수용체 또는 수용체 복합체를 통해 특정 항원을 인식하고 이와 상호작용하며, 이러한 항원을 인식하거나 또는 이와 상호작용할 때 세포의 활성화 및 신체 내 확장을 유발한다. 이러한 수용체의 예는 항원-특이적 T 림프구 수용체 복합체(TCR/CD3)이다. T 세포 수용체(TCR)는 T 림프구의 표면에 발현된다. 하나의 성분인 CD3은 리간드에 의한 TCR의 점유 후 세포내 신호전달을 담당한다. 항원-CD3 복합체(TCR/CD3)에 대한 T 림프구 수용체는 주요 조직적합성 복합체(MHC)의 단백질에 의해 제시되는 항원성 펩타이드를 인식한다. MHC와 펩타이드의 복합체는 항원 제시 세포 및 기타 T 림프구 표적의 표면에 발현된다. TCR/CD3 복합체의 자극은 T 림프구의 활성화를 초래하여 결과적으로 항원-특이적 면역 반응을 초래한다. TCR/CD3 복합체는 효과기 기능 및 면역계의 조절에서 중심적인 역할을 한다. 따라서, 본 명세서에 제공된 활성화 요소는 T 세포 수용체 관련 복합체의 하나 이상의 성분에 대한 결합에 의해, 예를 들어, CD3에 대한 결합에 의해 T 세포를 활성화한다. 일부 실시형태에서, 활성화 요소는 단독으로 활성화될 수 있다. 다른 경우에, 활성화는 세포를 추가로 활성화하기 위해 TCR 수용체 복합체를 통한 활성화를 필요로 한다.

- [0524] T 림프구는 또한 생체내에서 완전히 활성화되기 위해 제2 공동-자극 신호를 필요로 한다. 이러한 신호 없이, T 림프구는 TCR에 대한 항원 결합에 반응하지 않거나 또는 무력상태(anergic)가 된다. 그러나, 제2 공동-자극 신호는 T 세포의 형질도입 및 확장을 필요로 하지 않는다. 이러한 공동-자극 신호는, 예를 들어, 항원-생성 세포에서 CD80 및 CD86과 상호작용하는 T 림프구 단백질인 CD28에 의해 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, CD80의 기능적 세포의 단편은 CD28과 상호작용하는 능력을 보유한다. OX40, 4-1BB 및 ICOS(유도성 공동자극 인자(Inducible Costimulator))는 다른 T 림프구 단백질이며, 각각의 리간드인 OX40L, 4-1BBL 및 ICOSLG 중 하나 이상에 결합할 때 공동-자극 신호를 제공한다.
- [0525] T 세포 수용체(TCR) CD3 복합체의 활성화 및 CD28을 이용한 공동-자극은 항-CD3 및 항-CD28로 코팅된 고체 표면(예를 들어, 비드)에 대한 생체의 노출에 의해 발생할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 일부 실시형태에서, 휴지기 T 세포는 생체외에서 항-CD3 및 항-CD28로 코팅된 고체 표면에 대한 노출에 의해 활성화된다. 다른 실시형태에서, 휴지기 T 세포 또는 NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, 휴지기 T 세포는 가용성 항-CD3 항체(예를 들어, 50 내지 150 ng/ml 또는 75 내지 125 ng/ml 또는 100 ng/ml)에 대한 노출에 의해 활성화된다. 변형, 유전적으로 변형 또는 형질도입시키기 위한 방법의 일부일 수 있는 이러한 실시형태에서, 예시적인 실시형태에서, 이러한 활성화 및/또는 접촉은 형질도입 반응 혼합물에 항-CD3을 포함시키고, 본 명세서에 제공된 임의의 시간 동안 선택적 인큐베이션을 사용하여 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 또한, 가용성 항-CD3을 이용한 이러한 활성화는 항-CD3을 포함하는 배지에서 레트로바이러스 입자와 접촉시킨 후, 림프구, 예컨대, PBMC 및 예시적인 실시형태에서, NK 세포, 보다 예시적인 실시형태에서, T 세포를 인큐베이션함으로써 일어날 수 있다. 이러한 인큐베이션은, 예를 들어, 범위의 하한에서 5분, 10분, 15분, 30분, 45분, 60분 또는 120분 내지 범위의 상한에서 15분, 30분, 45분, 60분, 120분, 180분 또는 240분, 예를 들어, 15시간 내지 1시간 또는 2시간 동안일 수 있다.
- [0526] 예를 들어, 림프구, 특히 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키기 위한 본 명세서에 제공된 방법, 키트 및 조성물의 소정의 예시적인 실시형태에서, 활성화 T 세포 표면 단백질에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상에 "활성화 요소"로 제시된다. 레트로바이러스 입자의 표면 상의 이러한 T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소가 림프구를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키기 위한 본 명세서의 실시형태에 제공되며, 예를 들어, 레트로바이러스 입자는 본 명세서의 임의의 자가-구동 CAR 실시형태에 따른 자가-구동 CAR을 암호화하는 게놈을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표면이 활성화 요소를 갖는 이러한 레트로바이러스 입자는 피하 투여에 의한 투여를 포함하는 방법과 용도 및 피하 투여용 키트 성분에 사용된다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 이 부문에서 논의된 본 명세서에서 논의된 활성화 요소 기능뿐만 아니라 본 명세서의 다른 곳에 개시된 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드는 모두 1개, 2개의 또는 3개의 별개의 단백질, 예시적인 실시형태에서, 별개의 당단백질 및 추가의 예시적인 실시형태에서, 별개의 이중 당단백질의 일부로서 레트로바이러스 입자의 표면과 회합된 것으로 발견되었다. 예를 들어, CD3에 결합할 수 있는 것과 같은 일부 활성화 요소 폴리펩타이드는 또한 T 세포 결합 폴리펩타이드 기능을 제공할 수 있다.
- [0527] 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 활성화 요소는 CD3에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 표적 세포는 T 세포이다. 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 활성화 요소는 CD3의 엡실론 사슬(CD3 엡실론)에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면 상의 활성화 요소는 CD28, OX40, 4-1BB, ICOS, CD9, CD53, CD63, CD81 및/또는 CD82에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드 및 선택적으로 CD3에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 유사분열촉진 유발성 테트라스판닌(mitogenic tetraspanin)에 결합할 수 있는 폴리펩타이드, 예를 들어, CD81, CD9, CD53, CD63 또는 CD82에 결합할 수 있는 폴리펩타이드이다. 테트라스판닌은 짧은 세포의 도메인과 긴 세포의 도메인에 연결된 4개의 소수성 막관통 도메인을 포함하는 세포-표면 단백질이다. 긴 세포의 도메인은 전형적으로 약 100개의 아미노산 잔기이며, 고도로 보존된 "CCG" 모티프에 있는 2개와 함께 4개 이상의 시스테인 잔기를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 T 세포 표면 단백질 효능제일 수 있다. 활성화 요소는 T 세포 표면 단백질에 대한 리간드로서 작용하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 표면 단백질에 대한 리간드로서 작용하는 폴리펩타이드는 OX40L, 4-1BBL 또는 ICOSLG 중 하나 이상이거나 또는 이를 포함한다.
- [0528] 일부 실시형태에서, 전형적으로 하나 이상의 이러한 활성화 요소의 하나 이상의 카피는 슈도타이핑 요소와 분리되고 구별되는 폴리펩타이드로서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에서 발현될 수 있다. 일부 실시

형태에서, 활성화 요소는 융합 폴리펩타이드로서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에서 발현될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 하나 이상의 활성화 요소 및 하나 이상의 슈도타이핑 요소를 포함한다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 항-CD3, 예를 들어, 항-CD3scFv 또는 항-CD3scFvFc 및 바이러스 외피 단백질을 포함한다. 일례에서, 융합 폴리펩타이드는 문헌[Maurice et al. (2002)]에 나타나 있는 바와 같은 MuLV 외피 단백질과 같은 바이러스 외피 단백질의 아미노 말단에 융합된 OKT-3scFv이다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩타이드는 바이러스 외피 단백질, 예를 들어, MuLV 외피 단백질(서열번호 341), MuLV SUx 외피 단백질(서열번호 366), VSV-G(서열번호 367) 또는 본 명세서에 제공된 임의의 막 단백질 절단을 포함하는 이들의 기능적 변이체 또는 단편에 융합된 UCHT1scFv이다. 이러한 융합 작제물 및 활성화 요소가 레트로바이러스 입자의 표면에 테터링된 임의의 다른 작제물에서, 특히 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 본 명세서의 조성물 및 방법에 대한 예시적인 실시형태는 레트로바이러스 입자 외부에 존재하는 융합 단백질 부분의 임의의 혈액 단백질(예를 들어, 혈액 인자(예를 들어, 인자 X)) 절단 부위를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 융합 작제물은 임의의 퓨린 절단 부위를 포함하지 않는다. 퓨린은 검사된 모든 포유동물 세포에서 발현되는 막 결합 프로테이스이며, 그 중 일부는 혈장에서 분비되며 활성이다(예를 들어, 문헌[C. Fernandez et al. J. Internal. Medicine (2018) 284; 377-387] 참조). 이러한 프로테이스 절단 부위를 제거하기 위해 공지된 방법을 사용하여 융합 작제물에 돌연변이를 만들 수 있다.

[0529] CD3, CD28, OX40, 4-1BB 또는 ICOS에 결합하는 폴리펩타이드는 휴지기 T 세포를 활성화하는 능력 때문에 활성화 요소로 지칭된다. 소정의 실시형태에서, 이러한 활성화 요소를 암호화하는 핵산은 표면에 활성화 요소를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 게놈에서 발견된다. 다른 실시형태에서, 활성화 요소를 암호화하는 핵산은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 게놈에서 발견되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 활성화 요소를 암호화하는 핵산은 바이러스 패키징 세포의 게놈에서 발견된다.

[0530] 일부 실시형태에서, 활성화 요소는 CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드이다. 소정의 실시형태에서, CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 CD3D, CD3E, CD3G 또는 CD3Z에 결합한다. 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 CD3E에 결합할 수 있는 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 CD3에 결합하는 능력을 보유하는 항-CD3 항체 또는 이의 단편이다. 예시적인 실시형태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편은 항-CD3 scFv를 포함하지만 이로 제한되지 않는 단일쇄 항-CD3 항체이다. 또 다른 예시적인 실시형태에서, CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 항-CD3scFvFc이다.

[0531] UCHT1, OKT-3, HIT3A, TRX4, X35-3, VIT3, BMA030(BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, X111-141, X11146, X111-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW24B6, OKT3D, M-T301, SMC2 및 F101.01을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다수의 항-인간 CD3 단일클론 항체 및 항체 이들의 단편이 이용 가능하며, 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0532] 일부 실시형태에서, 활성화 요소는 CD28에 결합할 수 있는 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, CD28에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 CD28에 결합하는 능력을 보유하는 항-CD28 항체 또는 이의 단편이다. 다른 실시형태에서, CD28에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 CD80, CD86 또는 CD28에 결합할 수 있고, CD80의 외부 단편과 같은 Akt의 CD28-매개성 활성화를 유도할 수 있는 이들의 기능적 단편이다. 본 명세서의 일부 양태에서, CD80의 외부 단편은 CD28에 결합하는 능력을 보유하는, CD80의 정상적인 세포 위치에서 세포의 외부에 전형적으로 존재하는 단편을 의미한다. 예시적인 실시형태에서, 항-CD28 항체 또는 이의 단편은 항-CD28 scFv와 같지만 이로 제한되지 않는 단일쇄 항-CD28 항체이다. 또 다른 예시적인 실시형태에서, CD28에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 CD80 또는 CD80의 외부 단편과 같은 CD80의 단편이다.

[0533] 항-CD28 항체는 당업계에서 공지되어 있으며, 비제한적인 예로서, 단일클론 항체 9.3, IgG2a 항체(문헌[Dr. Jeffery Ledbetter, Bristol Myers Squibb Corporation, Seattle, Wash.]), 단일클론 항체 KOLT-2, IgG1 항체, 15E8, IgG1 항체, 248.23.2, IgM 항체 및 EX5.3D10, IgG2a 항체를 포함할 수 있다.

[0534] 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 2개의 폴리펩타이드, CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드 및 CD28에 결합할 수 있는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0535] 소정의 실시형태에서, CD3 또는 CD28에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 항체, 단일쇄 단일클론 항체 또는 항체 단편, 예를 들어, 단일쇄 항체 단편이다. 따라서, 항체 단편은, 예를 들어, 단일쇄 단편 가변 영역(scFv), 항체의 항체 결합(Fab) 단편, 단일쇄 항원-결합 단편(scFab), 시스테인이 없는 단일쇄 항원-결합 단편(scFabΔC), 단편 가변 영역(Fv), 항원의 인접 에피토프에 특이적인 작제물(CRAB) 또는 단일 도메인 항체(VH 또는 VL)일 수 있다.

- [0536] 짧은 접촉 시간을 포함하는 본 명세서에 개시된 실시형태에서, 세포 제형 내의 많은 변형된 림프구는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와의 회합을 통해 또는 레트로바이러스 외피와 변형된 림프구의 원형질막의 융합에 의해 변형된 림프구를 대상체에게 재도입하는 동안 표면에 T 세포 활성화 요소, 예를 들어, T 세포 활성화 항체를 갖는다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 변형된 림프구의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 이의 표면에 T 세포 활성화 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는, 예를 들어, T 세포 수용체를 통해 변형된 림프구의 표면에 결합될 수 있고/있거나 슈도타이핑 요소는 변형된 림프구의 원형질막에 존재할 수 있다.
- [0537] 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 활성화 요소 또는 이를 암호화하는 핵산은 이량체화 또는 고차 다량체화 모티프를 포함할 수 있다. 이량체화 및 다량체화 모티프는 당업계에 잘 알려져 있고, 당업자는 효과적인 이량체화 또는 다량체화를 위해 이들을 폴리펩타이드로 혼입하는 방법을 이해할 것이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 이량체화 모티프를 포함하는 활성화 요소는 CD3 및/또는 CD28에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 항-CD3 항체 또는 CD3에 결합하는 능력을 보유하는 이의 단편이다. 예시적인 실시형태에서, 항-CD3 항체 또는 이의 단편은 항-CD3 scFv와 같지만 이로 제한되지 않는 단일쇄 항-CD3 항체이다. 또 다른 예시적인 실시형태에서, CD3에 결합할 수 있는 폴리펩타이드는 항-CD3scFvFc이며, 일부 실시형태에서, 이는 항-CD3scFvFc 작제물이 별도의 이량체화 모티프의 필요 없이 이량체화할 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 임의의 추가적인 이량체화 모티프 없이 이량체화 모티프를 갖는 항-CD3으로 간주된다.
- [0538] 일부 실시형태에서, 이량체화 또는 다량체화 모티프 또는 이를 암호화하는 핵산 서열은 동종이량체 또는 다량체로서 자연적으로 존재하는 막관통 폴리펩타이드로부터의 아미노산 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 이량체화 또는 다량체화 모티프 또는 이를 암호화하는 핵산 서열은 천연 단백질 또는 조작된 단백질의 단편으로부터의 아미노산 서열일 수 있다. 한 실시형태에서, 동종이량체성 폴리펩타이드는 류신 지퍼 모티프-함유 폴리펩타이드(류신 지퍼 폴리펩타이드)이다. 예를 들어, c-JUN으로부터 유래되는 류신 지퍼 폴리펩타이드의 비제한적인 예는 본 명세서에서 키메라 림프증식성 요소(CLE)와 관련하여 개시되어 있다.
- [0539] 일부 실시형태에서, 이러한 막관통 동종이량체성 폴리펩타이드는 조기 활성화 항원 CD69(CD69), 트랜스페린 수용체 단백질 1(CD71), B-세포 분화 항원(CD72), T-세포 표면 단백질 텍타일(CD96), 엔도글린(Cd105), 살해 세포 렉틴-유사 수용체 서브패밀리 B 구성원 1(Cd161), P-셀렉틴 당단백질 리간드 1(Cd162), 글루타밀 아미노펩티데이스(Cd249), 중앙 과사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 16(CD271), 카드헤린-1(E-카드헤린)(Cd324) 또는 이들의 활성화 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이량체화 모티프 및 이를 암호화하는 핵산은 리간드(본 명세서에서 이량체화제 또는 이량체화 작용제로도 지칭됨) 결합시 이량체화되는 막관통 단백질로부터의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이량체화 모티프 및 이량체화제는 다음을 포함할 수 있다(여기서 이량체는 이량체화제-결합 쌍 다음의 괄호 안에 있음): FKBP 및 FKBP(라파마이신); GyrB 및 GyrB(쿠머마이신); DHFR 및 DHFR(메토크세이트); 또는 DmrB 및 DmrB(AP20187). 위에 언급된 바와 같이, 라파마이신은 이량체화제 역할을 할 수 있다. 대안적으로, 라파마이신 유도체 또는 유사체가 사용될 수 있다(예를 들어, WO96/41865; WO 99/36553; WO 01/14387; 및 문헌[Ye et al(1999) Science 283:88-91] 참조). 예를 들어, 라파마이신("라파로그")과 구조적으로 관련된 유사체, 동족체, 유도체 및 다른 화합물은 특히 라파마이신과 관련된 다음 변형 중 하나 이상을 갖는 라파마이신의 변이체를 포함한다: C7, C42 및/또는 C29에서 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 대체; C13, C43 및/또는 C28에서 하이드록시의 제거, 유도체화 또는 대체; C14, C24 및/또는 C30에서 케톤의 감소, 제거 또는 유도체화; 6-원 피페롤레이트 고리의 5-원 프롤린 고리로의 대체; 및 사이클로헥실 고리 상의 대안적 치환 또는 사이클로헥실 고리의 치환된 사이클로펜틸 고리로의 대체. 추가적인 정보는, 예를 들어, 미국 특허 제5,525,610호; 제5,310,903호, 제5,362,718호; 및 제5,527,907호에 제시되어 있다. c-28 하이드록실기의 선택적 에피머화가 기술되어 있다(예를 들어, WO 01/14387 참조). 라파마이신에 대한 대안으로서 사용하기에 적합한 추가적인 합성 이량체화 작용제는 미국 공개 제2012/0130076호에 기술되어 있는 것들을 포함한다. 위에 언급된 바와 같이, 쿠머마이신은 이량체화 작용제로 작용할 수 있다. 대안적으로, 쿠머마이신 유사체가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Farrar et al. (1996) Nature 383:178-181]; 및 미국 특허 제 6,916,846 참조). 위에 언급된 바와 같이, 일부 경우에, 이량체화 작용제는 메토크세이트, 예를 들어, 비-세포독성, 동종-이작용성 메토크세이트 이량체이다(예를 들어, 미국 특허 제8,236,925 참조). 림프증식성 요소의 일부 실시형태는 이량체화 작용제를 포함하지만, 일부 양태 및 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 구성적으로 활성화이며, 활성화를 위해 이량체화 작용제를 필요로 하는 림프증식성 요소가 아니다.
- [0540] 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에 존재하는 경우, 이량체화 모티프를 포함하

는 활성화 요소는 이량체화 작용제의 부재하에 활성화될 수 있다. 예를 들어, CD69, CD71, CD72, CD96, Cd105, Cd161, Cd162, Cd249, CD271, Cd324, 이들의 활성화 돌연변이체 및/또는 이들의 활성화 단편을 포함하는 막관통 동종이량체성 폴리펩타이드로부터의 이량체화 모티프를 포함하는 활성화 요소는 이량체화 작용제의 부재하에 활성화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 요소는 항-CD3 단일쇄 단편일 수 있고, CD69, CD71, CD72, CD96, Cd105, Cd161, Cd162, Cd249, CD271, Cd324, 활성화 이의 돌연변이체 및/또는 이들의 활성화 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 이량체화 모티프를 포함한다.

[0541] 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에 존재하는 경우, 이량체화 모티프를 포함하는 활성화 요소는 이량체화 작용제의 존재하에 활성화될 수 있다. 예를 들어, FKBP, GyrB, DHFR 또는 DmrB로부터의 이량체화 모티프를 포함하는 활성화 요소는 각각의 이량체화 작용제 또는 이들의 유사체, 예를 들어, 라파마이신, 쿠머마이신, 메토타렉세이트 및 AP20187 각각의 존재하에 활성화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성화 요소는 항-CD3 또는 항-CD28에 대한 단일쇄 항체 단편, 또는 CD3 또는 CD28에 결합하는 또 다른 분자 및 이량체화 모티프일 수 있고, 이량체화 작용제는 FKBP 및 라파마이신 또는 이들의 유사체, GyrB 및 쿠머마이신 또는 이들의 유사체, DHFR 및 메토타렉세이트 또는 이들의 유사체 또는 DmrB 및 AP20187 또는 이들의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0542] 일부 실시형태에서, 활성화 요소는 이중 신호 서열 및/또는 이중 막 부착 서열 또는 막 결합 단백질에 융합되고, 이들 모두는 활성화 요소를 막으로 지시하는데 도움이 된다. 이중 신호 서열은 활성화 요소를 소포체에 표적화하며, 여기서 이중 막 부착 서열은 이중 막 부착 서열에 융합된 활성화 요소가 원형질막의 지질 라프트에 고정되도록 하나 또는 여러 지방산에 공유적으로 부착(번역 후 지질 변형으로도 알려져 있음)된다. 일부 실시형태에서, 번역 후 지질 변형은 미리스토일화, 팔미토일화 또는 GPI 고정을 통해 발생할 수 있다. 미리스토일화는 진핵생물 또는 바이러스 단백질의 N-말단 글리신에 대한 14-탄소 포화 지방산인 미리스트산의 공유 연결에 해당하는 번역 후 단백질 변형이다. 팔미토일화는 단백질의 시스테인에 대한 C16 아실 사슬의 공유 연결에 해당하고, 덜 빈번하게는 단백질의 세린 및 트레오닌 잔기에 해당하는 번역 후 단백질 변형이다. GPI 고정은 번역 후 변형 동안 단백질의 c-말단에 글리코실포스파티딜이노시톨 또는 GPI의 부착을 지칭한다.

[0543] 일부 실시형태에서, 이중 막 부착 서열은 GPI 앵커 부착 서열이다. 이중 GPI 앵커 부착 서열은 임의의 공지의 GPI-고정 단백질로부터 유래될 수 있다(문헌[Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. *Glycosylphosphatidylinositol Anchors*. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 11]에서 검토됨). 일부 실시형태에서, 이중 GPI 앵커 부착 서열은 CD14, CD16, CD48, CD55(DAF), CD59, CD80 및 CD87로부터의 GPI 앵커 부착 서열이다. 일부 실시형태에서, 이중 GPI 앵커 부착 서열은 CD16으로부터 유래된다. 예시적인 실시형태에서, 이중 GPI 앵커 부착 서열은 Fc 수용체 FcγRIIb(CD16b) 또는 그렇지 않으면 보체 붕괴 가속 인자 또는 CD55로도 알려져 있는 붕괴 가속 인자(decay accelerating factor: DAF)로부터 유래된다.

[0544] 일부 실시형태에서, 활성화 요소 중 하나 또는 둘 모두는 활성화 요소의 세포막으로의 직접적인 발현을 돕는 이중 신호 서열을 포함한다. 패키징 세포주에서 활성화된 임의의 신호 서열이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 신호 서열은 DAF 신호 서열이다. 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 이의 N 말단에서 DAF 신호 서열에 융합되고, 이의 C 말단에서 GPI 앵커 부착 서열에 융합된다.

[0545] 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 CD14로부터 유래되는 GPI 앵커 부착 서열에 융합된 항-CD3 scFvFc 및 CD16b로부터 유래되는 GPI 앵커 부착 서열에 융합된 CD80을 포함하고; 둘 다 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 scFvFc는 이의 N 말단에서 DAF 신호 서열에 융합되고, 이의 C 말단에서 CD14로부터 유래되는 GPI 앵커 부착 서열에 융합되고, CD80은 이의 N 말단에서 DAF 신호 서열에 융합되고 이의 C 말단에서 CD16b로부터 유래되는 GPI 앵커 부착 서열에 융합되며; 둘 다 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에서 발현된다. 일부 실시형태에서, DAF 신호 서열은 DAF 단백질의 1번 내지 30번 아미노산 잔기를 포함한다.

[0546] **막-결합 사이토카인**

[0547] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물 양태의 일부 실시형태는 막-결합 사이토카인 또는 막-결합 사이토카인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 사이토카인은 항상 그런 것은 아니지만 전형적으로 분비되는 단백질이다. 자연적으로 분비되는 사이토카인은 막-결합하는 융합 단백질로 조작될 수 있다. 막-결합 사이토카인 융합 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 포함되며, 또한 본 발명의 양태이다. 일부 실시형태

에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 이의 표면에 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합하고 이의 증식 및/또는 생존을 촉진할 수 있는 막-결합 사이토카인 융합 폴리펩타이드를 갖는다. 전형적으로, 막-결합 폴리펩타이드는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 막으로 혼입되고, 세포가 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의해 형질도입될 때, 레트로바이러스와 숙주 세포막의 융합은 폴리펩타이드가 형질도입된 세포의 막에 결합되도록 한다.

[0548] 일부 실시형태에서, 사이토카인 융합 폴리펩타이드는 IL-2, IL-7, IL-15 또는 이들의 활성 단편을 포함한다. 막-결합 사이토카인 융합 폴리펩타이드는 전형적으로 이중 신호 서열 및/또는 이중 막 부착 서열에 융합된 사이토카인이다. 일부 실시형태에서, 이중 막 부착 서열은 GPI 앵커 부착 서열이다. 이중 GPI 앵커 부착 서열은 임의의 공지된 GPI-고정 단백질로부터 유래될 수 있다(문헌[Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 11]에서 검토됨). 일부 실시형태에서, 이중 GPI 앵커 부착 서열은 CD14, CD16, CD48, CD55(DAF), CD59, CD80 및 CD87로부터의 GPI 앵커 부착 서열이다. 일부 실시형태에서, 이중 GPI 앵커 부착 서열은 CD16으로부터 유래된다. 예시적인 실시형태에서, 이중 GPI 앵커 부착 서열은 Fc 수용체 FcγRIIb(CD16b)로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, GPI 앵커는 DAF의 GPI 앵커이다.

[0549] 예시적인 실시형태에서, 막-결합 사이토카인은 DAF에 융합된 사이토카인의 융합 폴리펩타이드이다. DAF는 패키징 세포로부터 출아하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 막에 혼입되는 지질 라프트에 축적되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이론에 제한되지 않고, DAF 융합 단백질은 재조합 레트로바이러스 막의 일부가 될 패키징 세포의 막의 부분에 우선적으로 표적화되는 것으로 여겨진다.

[0550] 비제한적인 예시적인 실시형태에서, 사이토카인 융합 폴리펩타이드는 DAF에 융합된 IL-7 또는 이의 활성 단편이다. 특정한 비제한적인 예시적인 실시형태에서, 융합 사이토카인 폴리펩타이드는 DAF 신호 서열(DAF의 1번 내지 31번 잔기), 신호 서열이 없는 IL-7 및 DAF의 36번 내지 525번 잔기를 순서대로 포함한다.

[0551] 패키징 세포주/재조합 레트로바이러스 입자를 제조하는 방법

[0552] 본 개시내용은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 생산하는 포유동물 패키징 세포 및 패키징 세포주를 제공한다. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 생산하는 세포주는 또한 본 명세서에서 패키징 세포주로도 지칭된다. 이러한 방법의 비제한적인 예는 W02019/055946에 예시되어 있다. 레트로바이러스 입자를 제조하는 추가의 예시적인 방법은 본 명세서, 예를 들어, 본 명세서의 실시예 부문에 제공된다. 이러한 방법은 GPI-연결된 항-CD3과 같은 바이러스 외피와의 융합이 아닌 T 세포 활성화 요소와 같은 추가적인 막 결합 단백질을 암호화하는 핵산이 포함되는 경우, 예를 들어, 4종의 플라스미드 시스템 또는 5종의 플라스미드 시스템을 포함한다(W02019/05546 참조). 예시적인 실시형태에서, GPI-연결된 항-CD3과 같은 T 세포 활성화 요소가 바이러스 외피를 암호화하는 플라스미드 또는 REV를 암호화하는 플라스미드와 같은 패키징 플라스미드 중 하나에 암호화되는 4종의 플라스미드 시스템이 본 명세서에 제공되며, 선택적으로 막 결합 사이토카인과 같은 제2 바이러스 막-관련 이식 유전자는 다른 패키징 플라스미드에 암호화될 수 있다. 각 경우에 바이러스 단백질을 암호화하는 핵산은 IRES, 또는 P2A 또는 T2A와 같은 리보솜 스킵 서열에 의해 이식 유전자로부터 분리된다. 실시예에 언급된 바와 같은 이러한 4종의 플라스미드 시스템 및 관련 폴리뉴클레오타이드는 일시적 형질감염에서 5종의 벡터 시스템과 비교하여 증가된 역가를 제공하고, 따라서 본 명세서의 예시적인 실시형태를 제공한다. 본 개시내용은 표적 포유동물 세포 및 표적 포유동물 세포 자체를 유전적으로 변형시키는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 생산하는 패키징 세포주인 패키징 세포 및 포유동물 세포주를 제공한다. 예시적인 실시형태에서, 패키징 세포는 복제 불능 레트로바이러스 입자의 패키징 가능한 RNA 게놈, REV 단백질, gag 폴리펩타이드, pol 폴리펩타이드 및 슈도타이핑 요소를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0553] 패키징 세포주의 세포는 부착성 또는 현탁 세포일 수 있다. 예시적인 세포 유형이 하기에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 패키징 세포주는 현탁 세포주, 즉, 성장 동안 표면에 부착하지 않는 세포주일 수 있다. 세포는 화학적으로-정의된 배지 및/또는 무혈청 배지에서 성장할 수 있다. 일부 실시형태에서, 패키징 세포주는 부착 세포주로부터 유래되는 현탁 세포주일 수 있으며, 예를 들어, HEK293 세포주는 당업계에서 공지된 방법에 따라 현탁-적응 HEK293 세포주를 생성하기 위한 조건에서 성장할 수 있다. 패키징 세포주는 전형적으로 화학적으로 정의된 배지에서 성장한다. 일부 실시형태에서, 패키징 세포주 배지는 혈청을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 패키징 세포주 배지는 당업계에 공지된 바와 같이 혈청 대체물을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 패키징 세포주 배지는 무혈청 배지일 수 있다. 이러한 배지는 미국 식품의약국(Food and Drug

Administration: FDA)의 현행 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(CGMP) 규정에 따라 제조된 화학적으로 정의된 무혈청 제형일 수 있다. 패키징 세포주 배지는 이중 물질이 없으며 완전할 수 있다. 일부 실시형태에서, 패키징 세포주 배지는 FDA 510(k) 승인 장치와 같은 생체의 세포 처리에 사용하기 위한 규제 기관에 의해 승인되었다.

[0554] 따라서, 일 양태에서, 다음을 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다: A. 패키징 세포를 무혈청 배지에서 현탁 상태로 배양하는 단계로서, 패키징 세포는 복제 불능 레트로바이러스 입자의 패키징 가능한 RNA 게놈, REV 단백질, gag 폴리펩타이드, pol 폴리펩타이드 및 슈도타이핑 요소를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 패키징 세포를 무혈청 배지에서 현탁 상태로 배양하는 단계; 및 B. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 무혈청 배지로부터 수확하는 단계. 또 다른 양태에서, 다음을 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자로 림프구를 형질도입시키는 방법이 본 명세서에 제공된다: A. 패키징 세포를 무혈청 배지에서 현탁 상태로 배양하는 단계로서, 패키징 세포는 복제 불능 레트로바이러스 입자의 패키징 가능한 RNA 게놈, REV 단백질, gag 폴리펩타이드, pol 폴리펩타이드 및 슈도타이핑 요소를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는, 상기 패키징 세포를 무혈청 배지에서 현탁 상태로 배양하는 단계; B. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 무혈청 배지로부터 수확하는 단계; 및 C. 림프구를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계로서, 24시간, 20시간, 18시간, 12시간, 8시간, 4시간, 2시간, 1시간, 30분 또는 15분 미만(또는 접촉과 인큐베이션 없음 또는 범위의 하한에서 15분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 또는 4시간 내지 범위의 상한에서 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 18시간, 20시간 또는 24시간 인큐베이션 사이) 동안 접촉을 수행하여 림프구를 형질도입시키는, 상기 림프구를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계.

[0555] 소정의 예시적인 실시형태에서, 패키징 가능한 RNA 게놈은 비제한적인 예로서, 본 명세서에 개시된 임의의 조작된 신호전달 폴리펩타이드 및/또는 gag 및 pol과 같은 레트로바이러스 성분으로부터 반대 배향(예를 들어, 반대 가닥 및 반대 배향으로 암호화함)의 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자를 포함하는 하나 이상의 표적 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된다. 예를 들어, 패키징 가능한 RNA 게놈은 5'에서 3'로 다음을 포함할 수 있다: 5' 긴 말단 반복부 또는 이의 활성 절단 단편; 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소를 암호화하는 핵산 서열; 5' 긴 말단 반복부 및 시스-작용 RNA 패키징 요소에 대해 반대 배향으로 프로모터를 제거할 수 있고, 일부 실시형태에서, 단지 편의상 "제4" 프로모터(및 때때로 본 명세서에서 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터)로 지칭되며, T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 표적 세포에 활성이지만 예시적인 예에서 패키징 세포에서는 활성이 없거나 또는 패키징 세포에서 유도적으로 또는 최소한으로만 활성인, 반대 배향의 조작된 신호전달 폴리펩타이드(들)와 같지만 이로 제한되지 않는 제1 및 선택적으로 제2 표적 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열; 및 3' 긴 말단 반복부 또는 이의 활성 절단 단편. 일부 실시형태에서, 패키징 가능한 RNA 게놈은 중심 폴리퓨린 트랙(central polypurine tract: cPPT)/중심 종결 서열(central termination sequence: CTS) 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소는 HIV Psi일 수 있다. 일부 실시형태에서, 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소는 Rev 반응 요소일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 5' 긴 말단 반복부로부터 반대 배향으로 프로모터에 의해 구동되는 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 조작된 신호전달 폴리펩타이드 중 하나 이상이고, 선택적으로 본 명세서 및 WO2017/165245A2, WO2018/009923A1 및 WO2018/161064A1에 보다 상세히 개시되어 있는 바와 같이 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 발현할 수 있다. 일부 양태에서, 자가-구동 CAR을 발현하도록 설계된 패키징 가능한 RNA 게놈이 본 명세서에 제공된다. 자가-구동 CAR을 포함하는 이러한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자, 및 조성물 및 방법 양태에 관한 세부사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부문, 및 예시적인 실시형태 부문에 보다 상세히 개시되어 있다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소를 암호화하는 하나 이상의 제1 전사 단위는 역배향으로 암호화되고, CAR을 암호화하는 하나 이상의 제2 전사 단위는 정배향으로 암호화된다.

[0556] 제1, 제2, 제3, 제4 등의 프로모터와 같은 프로모터 번호는 단지 편의를 위한 것임이 이해될 것이다. "제4" 프로모터로 불리는 프로모터는 다른 프로모터가 명시적으로 언급되지 않는 한, 제1, 제2 또는 제3 프로모터와 같은 임의의 추가적인 프로모터가 있음을 암시하는 것으로 간주되어서는 안된다. 각각의 프로모터는 적절한 세포 유형에서 전사체의 발현을 유도할 수 있으며, 이러한 전사체는 전사 단위를 형성한다는 점에 유의하여야 한다.

[0557] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 제1 림프증식성 요소를 포함할 수 있다. 적합한 림프증식성 요소는 본 명세서의 다른 부문에 개시되어 있다. 비제한적인 예로서, 림프증식성 요소는 본 명세서에 개시된 바와 같이 eTag와 같은 세포 태그와의 융합으로 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, 패키징 가능한 RNA 게놈은 본 명세서에 제공된 임의의 CAR 실시형태를 암호화하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 제2 조작된 폴리펩타이드

드를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 제2 조작된 폴리펩타이드는 제1 항원-특이적 표적화 영역, 제1 막관통 도메인 및 제1 세포내 활성화 도메인을 포함할 수 있다. 항원-특이적 표적화 영역, 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인의 예는 본 명세서의 다른 곳에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포가 T 세포인 경우, 표적 세포에서 활성화인 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같이 T 세포에서 활성화이다.

[0558] 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 CAR을 포함할 수 있고, 핵산 서열은 본 명세서에 제공된 임의의 CAR 실시형태를 암호화할 수 있다. 예를 들어, 조작된 폴리펩타이드는 제1 항원-특이적 표적화 영역, 제1 막관통 도메인 및 제1 세포내 활성화 도메인을 포함할 수 있다. 항원-특이적 표적화 영역, 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인의 예는 본 명세서의 다른 곳에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 패키징 가능한 RNA 게놈은 제2 조작된 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 조작된 폴리펩타이드는 림프증식성 요소일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포가 T 세포 또는 NK 세포인 경우, 표적 세포에서 활성화인 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같이 T 세포 또는 NK 세포에서 활성화이다.

[0559] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 포함된 패키징 가능한 RNA 게놈은 W02017/165245A2, W02018/009923A1 및 W02018/161064A1에 논의되어 있는 바와 같은 리보스위치를 더 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향과 관련하여 역배향일 수 있다. 추가의 실시형태에서, 패키징 가능한 RNA 게놈은 리보스위치를 더 포함할 수 있으며, 선택적으로, 리보스위치는 역배향일 수 있다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 임의의 요소를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 절연체 및/또는 폴리아데닐화된 서열은 조절되지 않은 전사를 방지하거나 또는 감소시키기 위해 유전자 앞, 뒤, 사이 또는 근처에 위치될 수 있다. 일부 실시형태에서, 절연체는 닭 HS4 절연체, Kaiso 절연체, SAR/MAR 요소, 키메라 닭 절연체-SAR 요소, CTCF 절연체, 집시 절연체 또는 β -글로빈 절연체 또는 당업계에 공지된 이들의 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절연체 및/또는 폴리아데닐화된 서열은 hGH 폴리A(서열번호 316), SPA1(서열번호 317), SPA2(서열번호 318), b-글로빈 폴리A 스페이스 B(서열번호 319), b-글로빈 폴리A 스페이스 A(서열번호 320), 250 cHS4 절연체 v1(서열번호 321), 250 cHS4 절연체 v2(서열번호 322), 650 cHS4 절연체(서열번호 323), 400 cHS4 절연체(서열번호 324), 650 cHS4 절연체 및 b-글로빈 폴리A 스페이스 B(서열번호 325) 또는 b-글로빈 폴리A 스페이스 B 및 650 cHS4 절연체(서열번호 326)일 수 있다.

[0560] 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, Vpx를 암호화하는 핵산 서열은 제2 또는 선택적 제3 전사 단위 상에 또는 제1 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 추가적인 전사 단위 상에 있을 수 있다.

[0561] 본 개시내용의 일부 양태는 T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입을 위한 렌티바이러스와 같은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 제조하기 위해 패키징 세포로서 사용되는 세포, 예시적인 예에서, 포유동물 세포이거나 또는 이들을 포함한다. 일부 양태에서, 자가-구동 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 제조하기 위한 패키징 세포가 본 명세서에 제공된다. 자가-구동 CAR을 포함하는 이러한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자, 및 조성물 및 방법 양태에 관한 세부사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법과 조성물 부문 및 예시적인 실시형태 부문에 보다 상세히 개시되어 있다.

[0562] 본 발명에 따른 재지시된 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 바이러스 또는 바이러스 입자의 시험관내 생산을 위해 임의의 다양한 세포가 선택될 수 있다. 진핵생물 세포, 특히 인간, 시미안, 개, 고양이, 말 및 설치류 세포를 포함하는 포유동물 세포가 전형적으로 사용된다. 예시적인 예에서, 세포는 인간 세포이다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 세포는 무한정으로 번식하므로 불멸이다. 본 발명에서 유리하게 사용될 수 있는 세포의 예는 NIH 3T3 세포, COS 세포, 매딘-다비 개 신장 세포, 인간 배아 293T 세포 및 이러한 세포로부터 유래되는 임의의 세포, 예컨대, 293T 세포로부터 유래되는 gpn1slacZ ϕ NX 세포를 포함한다. 인간 배아 신장 293T 세포와 같이 고품질감염성 세포가 사용될 수 있다. "고품질감염성"은 세포의 적어도 약 50%, 보다 바람직하게는 적어도 약 70%, 가장 바람직하게는 적어도 약 80%가 도입된 DNA의 유전자를 발현할 수 있음을 의미한다.

[0563] 적합한 포유동물 세포는 일차 세포 및 불멸화된 세포주를 포함한다. 적합한 포유동물 세포주는 인간 세포주, 비-인간 영장류 세포주, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트) 세포주 등을 포함한다. 적합한 포유동물 세포주는 HeLa 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL9618, CCL61, CRL9096), 293 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL-1573), Vero 세포, NIH 3T3 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL-1658), Huh-7 세포, BHK세포(예를 들어, ATCC 번호 CCL10), PC12 세포(ATCC 번호 CRL1721), COS 세포, COS-7 세포(ATCC 번호 CRL1651), RAT1 세포, 마우스 L 세포(ATCC 번호

CCL1.3), 인간 배아 신장(HEK) 세포(ATCC 번호 CRL1573), HLHepG2 세포, Hut-78, 저캣, HL-60 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0564] 유전적으로 변형된 T 세포 및 NK 세포

[0565] 본 명세서의 방법 및 조성물의 실시형태에서 유전적으로 변형된 림프구가 생산되며, 이는 그 자체가 본 발명의 별개의 양태이다. 이러한 유전적으로 변형된 림프구는 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구이다. 일 양태에서, 본 명세서에 제공된 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포는 본 명세서에 제공된 혈액 또는 이의 성분에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키기 위한 임의의 양태에 따른 방법을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포는 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 변형된다. 예시적인 실시형태에서, 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드는 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 림프증식성 요소 또는 CAR일 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포는 CAR 또는 림프증식성 요소일 수 있는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 더 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 키메라 림프증식성 요소일 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포는 표면에 슈도타이핑 요소를 더 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포는 표면에 활성화 요소를 더 포함할 수 있다. 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포의 CAR, 림프증식성 요소, 슈도타이핑 요소 및 활성화 요소는 본 명세서에 개시된 임의의 양태, 실시형태 또는 하위 실시형태를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 활성화 요소는 항-CD3 scFvFc와 같은 항-CD3 항체일 수 있다.

[0566] 일부 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구는 적어도 하나의 림프증식성 요소를 포함하는 제1 조작된 신호전달 폴리펩타이드 및/또는 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 제2 조작된 신호전달 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포와 같은 림프구이다. 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, NK 세포는 NKT 세포이다. NKT 세포는 CD3을 발현하며 전형적으로 $\alpha\beta$ T-세포 수용체를 공동 발현하지만, 또한 전형적으로 NK 세포와 관련된 다양한 분자 마커를 발현하는 T 세포의 서브세트(예컨대, NK1.1 또는 CD56)이다.

[0567] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 림프구는 재조합 DNA 방법에 의해 림프구에 도입된 이중 핵산 서열을 보유한다. 예를 들어, 예시적인 실시형태에서, 이중 서열은 형질도입 림프구 본 명세서에 제공된 림프구를 형질도입시키는 방법 동안 림프구에 삽입된다. 이중 핵산은 림프구 내에서 발견되며, 일부 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 게놈에 통합되거나 또는 통합되지 않는다.

[0568] 예시적인 실시형태에서, 이중 핵산은 유전적으로 변형된 림프구의 게놈에 통합된다. 예시적인 실시형태에서, 재조합 레트로바이러스 입자를 사용하는 본 명세서에 제공된 림프구를 형질도입시키는 방법을 사용하여 이러한 림프구가 생산된다. 이러한 재조합 레트로바이러스 입자는 전형적으로 적어도 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 다른 부분에서, 그 자체가 본 개시내용의 또 다른 양태를 형성하는 유전적으로 변형된 림프구를 생성하는데 사용될 수 있는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 및 복제 불능 레트로바이러스 입자의 게놈에 암호화된 폴리뉴클레오타이드의 다양한 실시형태가 본 명세서에 제공된다.

[0569] 본 개시내용의 유전적으로 변형된 림프구는 신체 외부에서 단리될 수 있다. 예를 들어, 이러한 림프구는 본 명세서에 제공된 바와 같이 생체의 형질도입을 위해 사용된 배지 및 기타 용액에서 발견될 수 있다. 림프구는 본 명세서에 제공된 방법에서 대상체로부터 수집된 혈액에 유전적으로 비변형된 형태로 존재할 수 있고, 그 다음 형질도입 방법 동안 유전적으로 변형될 수 있다. 유전적으로 변형된 림프구는 유전적으로 변형된 후 대상체에게 도입 또는 재도입된 후 대상체 내부에서 발견될 수 있다. 유전적으로 변형된 림프구는 휴지기 T 세포 또는 휴지기 NK 세포일 수 있거나, 또는 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포는 본 명세서에 개시된 바와 같이 형질도입 후 T 세포 또는 NK 세포에 삽입되는 핵산에 제공된 기능적 요소의 일부를 발현한 후, 활발하게 분열할 수 있다.

[0570] 일 양태에서, 게놈에 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사단위를 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질도입된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포가 본 명세서에 제공된다.

[0571] 일부 양태에서, 자가-구동 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 양태가 본 명세서에 제공된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하

는 자가-구동 CAR을 포함하는 이러한 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 T 세포 또는 NK 세포, 및 조성물 및 방법 양태에 관한 세부사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부문과 예시적인 실시형태 부문에 보다 상세히 개시되어 있다.

[0572] 일부 실시형태에서, 1개, 2개 이상(예를 들어, 1개 내지 10개, 2개 내지 10개, 4개 내지 10개, 1개 내지 6개, 2개 내지 6개, 3개 내지 6개, 4개 내지 6개, 1개 내지 4개, 2개 내지 4개, 3개 내지 4개)의 저해성 RNA 분자를 암호화하는 전사 단위를 포함하는 혈액 또는 이의 성분에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 형질도입시키기 위한 양태와 관련된, 유전적으로 변형된 림프구, 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포 또는 본 명세서에 제공된 자가-구동 CAR 양태가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 이러한 저해성 RNA 분자는 림프증식성 요소이므로, T 세포 및/또는 NK 세포의 증식을 유도하거나 또는 그렇지 않으면 본 명세서에 제공된 림프증식성 요소에 대한 테스트를 충족하는 한 림프증식성 요소로서 본 명세서에 개시된 임의의 양태 또는 실시형태에 포함될 수 있다.

[0573] 다양한 표적 RNA에 대해 지시된 저해성 RNA 분자는 본 명세서에 제공된 임의의 양태의 실시형태에 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상(예를 들어, 2개)의 저해성 RNA 분자 중 하나, 대부분 또는 모두는 내인성 TCR의 발현을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, RNA 표적은 PD-1, CTLA4, TCR 알파, TCR 베타, CD3 제타, SOCS, SMAD2, miR-155 표적, IFN 감마, cCBL, TRAIL2, PP2A 및 ABCG1로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자로부터 전사된 mRNA이다. 이 양태의 일부 실시형태에서, 하나 이상(예를 들어, 2개)의 저해성 RNA 분자 중 적어도 하나는 miR-155이다.

[0574] T 세포 또는 NK 세포가 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자 및 CAR 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 바로 위의 양태의 일부 실시형태에서, CAR의 ASTR은 MRB ASTR이고/이거나 CAR의 ASTR은 종양 관련 항원에 결합한다. 또한, 위의 양태의 일부 실시형태에서, 제1 핵산 서열은, 예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체, 및 예시적인 실시형태에서 아시클로버와 같은 항바이러스 약물에 결합할 수 있는 리보스위치에 작동 가능하게 연결된다.

[0575] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에서, 조작된 신호전달 폴리펩타이드의 발현은 제어 요소에 의해 조절되며, 일부 실시형태에서, 제어 요소는 리보스위치를 포함하는 폴리뉴클레오타이드이다. 소정의 실시형태에서, 리보스위치는 뉴클레오타이드 유사체에 결합할 수 있고, 뉴클레오타이드 유사체가 존재하는 경우, 조작된 신호전달 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두가 발현된다.

[0576] 핵산

[0577] 본 개시내용은 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 제공하며, 핵산은 본 명세서의 다양한 방법에 사용하기 위해 개시된다. 일부 실시형태에서, 핵산은, 예를 들어, 재조합 발현 작제물을 포함하거나 또는, 예를 들어, T 세포 또는 NK 세포의 게놈의 전부 또는 일부로서의 DNA일 것이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 레트로바이러스 게놈 또는, 예를 들어, 패키징 세포주, T 세포 또는 NK 내의 발현된 전사체와 같은 RNA일 것이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 RNA, 예를 들어, 시험관내에서 합성된 RNA일 것이다. 일부 실시형태에서, 핵산은 분리될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "단리된"은 물질이 원래의 환경(예를 들어, 자연적으로 발생하는 경우 자연 환경)으로부터 제거되는 것을 의미한다. 예를 들어, 자연 발생 폴리뉴클레오타이드 또는 다른 실시형태에서, 살아있는 동물에 존재하는 폴리펩타이드는 단리되지 않지만, 자연계에 공존하는 물질의 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 조성물의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 조성물이 자연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 단리된다. 예를 들어, 단리된 핵산은 예시적인 실시형태에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자일 수 있는 발현 벡터와 같은 재조합 핵산 벡터의 일부일 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산은 키트 성분에 대해 본 명세서에서 논의되는 바와 같이 cGMP에 따라 제조된다.

[0578] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 포유동물 세포에서 본 개시내용의 폴리펩타이드의 생산을 위한 핵산이 제공된다. 다른 경우에, 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 증폭을 위한 대상 핵산이 제공된다.

[0579] 임의의 이식 유전자, 예를 들어, 본 개시내용의 CAR일 수 있는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 전사 제어 요소, 예를 들어, 프로모터 및 인핸서 등에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이러한 작제물에서, 전사 제어 요소는 작동 가능하게 연결된 폴리펩타이드(예를 들어, CAR)의 발현을 지시 및/또는 조절한다. 재조합 레트로바이러스 입자를 제조하기 위한, 예를 들어, 패키징 세포주와 같은 진핵생물 세포에서의 발현을 위해, 적합한 프로모터는 경쇄 및/또는 중쇄 면역글로불린 유전자 프로모터 및 인핸서 요소; 사이토메갈로바이러스 급

초기 프로모터; 단순 포진 바이러스 티미딘 카이네이스 프로모터; 초기 및 후기 SV40 프로모터; 레트로바이러스의 긴 말단 반복부에 존재하는 프로모터; 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터; 및 다양한 당업계에 공지된 조직 특이적 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 프로모터는 유전적으로 변형될 세포에서 구성적으로 활성이거나 또는 유도성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 EF1a 프로모터 또는 뮤린 줄기 세포 바이러스(murine stem cell virus: MSCV) 프로모터일 수 있다(예를 들어, 문헌[Jones et al., Human Gene Therapy (2009) 20: 630-40] 참조). 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 T 세포-특이적 반응 요소 또는 NFAT 반응 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 T 세포-특이적 프로모터, CD8 세포-특이적 프로모터, CD4 세포-특이적 프로모터, 호중구-특이적 프로모터 또는 NK 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포-특이적 프로모터는 CD3 제타 프로모터 또는 CD3 델타 프로모터일 수 있다(예를 들어, 문헌[Ji et al., J Biol Chem. 2002 Dec 6;277(49):47898-906] 참조). 예시적인 실시형태에서, T 세포-특이적 프로모터는 CD3 제타 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD8 유전자 프로모터가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, CD4 유전자 프로모터가 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Salmon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7739; 및 Marodon et al. (2003) Blood 101:3416] 참조). 일부 실시형태에서, NK 세포-특이적 프로모터는 Neri(p46) 프로모터일 수 있다(예를 들어, 문헌[Eckelhart et al. (2011) Blood 117:1565] 참조). 가역적 유도성 프로모터를 포함하는 적합한 가역성 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 이러한 가역성 프로모터는 많은 유기체, 예를 들어, 진핵생물 및 원핵생물로부터 단리 및 유래될 수 있다. 제2 유기체, 예를 들어, 제1 원핵생물 및 제2 진핵생물, 제1 진핵생물 및 제2 원핵생물 등에서 사용하기 위한 제1 유기체로부터 유래되는 가역성 프로모터의 변형은 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 가역성 프로모터 및 이러한 가역성 프로모터를 기반으로 하지만 추가적인 대조군 단백질을 또한 포함하는 시스템은 알코올 조절성 프로모터(예를 들어, 알코올 전사활성인자 단백질(AlcR) 등에 반응하는 프로모터인 알코올 데하이드로게네이스 I(alcA) 유전자 프로모터), 테트라사이클린 조절성 프로모터(예를 들어, TetActivator, TetON, TetOFF 등을 포함하는 프로모터 시스템), 스테로이드 조절성 프로모터(예를 들어, 래트 글루코코르티코이드 수용체 프로모터 시스템, 인간 에스트로젠 수용체 프로모터 시스템, 레티노이드 프로모터 시스템, 갑상선 프로모터 시스템, 엑디손 프로모터 시스템, 미페프리스톤 프로모터 시스템 등), 금속 조절성 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터 시스템 등), 발병-관련 조절성 프로모터(예를 들어, 살리실산 조절성 프로모터, 에틸렌 조절성 프로모터, 벤조티아디아아졸 조절성 프로모터 등), 온도 조절성 프로모터(예를 들어, 열 충격 유도성 프로모터(예를 들어, HSP-70, HSP-90, 대두 열 충격 프로모터 등), 광 조절성 프로모터, 합성 유도성 프로모터 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다양한 방법에서 그리고 별개의 양태로서 사용하기에 적합한 프로모터의 추가 논의가 본 명세서에 제공된다.

[0580] 일부 예에서, 적합한 프로모터를 포함하는 유전자좌 또는 작제물 또는 이식 유전자는 유도성 시스템의 유도를 통해 비가역적으로 전환된다. 비가역적 스위치의 유도에 적합한 시스템은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 비가역적 스위치의 유도는 Cre-lox-매개성 재조합을 사용할 수 있다(예를 들어, 문헌[Fuhrmann-Benzakein, et al., PNAS (2000) 28:e99] 참조, 이 개시내용은 참조에 의해 본 명세서에 인용됨). 당업계에 공지된 재조합 효소, 엔도뉴클레아제, 라이게아제, 재조합 부위 등의 임의의 적합한 조합이 비가역적으로 전환 가능한 프로모터를 생성하는데 사용될 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에 기재된 부위-특이적 재조합을 수행하기 위한 방법, 메커니즘 및 요건은 비가역적으로 전환된 프로모터를 생성하는데 사용되며, 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 그 개시내용이 참조에 의해 본 명세서에 인용되어 있는 문헌[Grindley et al. (2006) Annual Review of Biochemistry, 567-605 and Tropp (2012) Molecular Biology (Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, MA)]을 참조한다.

[0581] 일부 양태에서, 특히 자가-구동 CAR에 특히 유용한 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공된다. 이러한 프로모터 및 이러한 프로모터를 포함하는 자가-구동 CAR을 포함하는 조성물 및 방법 양태에 관한 세부사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부분과 예시적인 실시형태 부분에 보다 상세히 개시되어 있다. 일부 경우에, 프로모터는 CD8 세포-특이적 프로모터, CD4 세포-특이적 프로모터, 호중구-특이적 프로모터 또는 NK-특이적 프로모터이다. 예를 들어, CD4 유전자 프로모터가 사용될 수 있으며; 예를 들어, 문헌[Salmon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7739; 및 Marodon et al. (2003) Blood 101:3416]을 참고한다. 또 다른 예로서, CD8 유전자 프로모터가 사용될 수 있다. NK 세포-특이적 발현은 Neri(p46) 프로모터의 사용에 의해 달성될 수 있으며; 예를 들어, 문헌[Eckelhart et al. (2011) Blood 117:1565]을 참조한다.

[0582] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 효모 세포에서의 발현을 위해, 적합한 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대, ADH1 프로모터, PGK1 프로모터, ENO 프로모터, PYK1 프로모터 등; 또는 조절성 프로모터, 예컨대, GALI 프로모터, GALI0 프로모터, ADH2 프로모터, PHO5 프로모터, CUP1 프로모터, GAL7 프로모터, MET25 프로모터, MET3 프

로모터, CYC1 프로모터, HIS3 프로모터, ADH1 프로모터, PGK 프로모터, GAPDH 프로모터, ADC1 프로모터, TRP1 프로모터, URA3 프로모터, LEU2 프로모터, ENO 프로모터, TP1 프로모터 및 AOX1(예를 들어, 피키아(*Pichia*)에서 사용)이다. 적절한 벡터 및 프로모터의 선택은 당업자의 수준 내에 있다.

[0583] 원핵 숙주 세포에서 사용하기에 적합한 프로모터는 박테리오파지 T7 RNA 폴리머레이스 프로모터; Trp 프로모터; lac 오페론 프로모터; 하이브리드 프로모터, 예를 들어, lac/tac 하이브리드 프로모터, Tac/trc 하이브리드 프로모터, Trp/lac 프로모터, T7/lac 프로모터; Trc 프로모터; Tac 프로모터 등; araBAD 프로모터; 생체내 조절성 프로모터, 예컨대, *ssaG* 프로모터 또는 관련 프로모터(예를 들어, 미국 공개 제20040131637호 참조), *pagC* 프로모터(문헌[Pulkkinen and Miller, *J. Bacteriol.*, 1991: 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al., PNAS, 1992: 89(21): 10079-83]), *nirB* 프로모터(문헌[Harborne et al. (1992) *Mal. Micro.* 6:2805-2813]) 등(예를 들어, 문헌[Dunstan et al. (1999) *Infect. Immun.* 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004) *Vaccine* 22:3243-3255; 및 Chatfield et al. (1992) *Biotechnol.* 10:888-892] 참조); 시그마70 프로모터, 예를 들어, 컨센서스 시그마 70 프로모터(예를 들어, Genbank 등록 번호 AX798980, AX798961 및 AX798183을 참조); 고정상 프로모터, 예를 들어, *dps* 프로모터, *spv* 프로모터 등; 병원성 유전자군 SPI-2로부터 유래되는 프로모터(예를 들어, W096/17951을 참조); *actA* 프로모터(예를 들어, 문헌[Shetron-Rama et al. (2002) *Infect. Immun.* 70:1087-1096] 참조); *rpsM* 프로모터(예를 들어, 문헌[Valdivia and Falkow (1996). *Mal. Microbial.* 22:367] 참조); Tet 프로모터(예를 들어, 문헌[Hillen, W. and Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (eds), *Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction*. Macmillan, London, UK, Vol. 10, pp. 143-162] 참조); SP6 프로모터(예를 들어, 문헌[Melton et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:7035] 참조); 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 대장균과 같은 원핵생물에 사용하기에 적합한 강력한 프로모터는 Trc, Tac, T5, T7 및 P람다를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 세균 숙주 세포에 사용하기 위한 작동자의 비제한적인 예는 락토스 프로모터 작동자(락토스와 접촉될 때 LacI 억제 단백질은 구조를 변경하여 LacI 억제 단백질이 작동자에 결합하는 것을 방지함), 트립토판 프로모터 작동자(트립토판과 복합체를 형성할 때, TrpR 억제 단백질은 작동자에 결합하는 구조를 가지며; 트립토판의 부재하에, TrpR 억제 단백질은 작동자에 결합하지 않는 구조를 가짐) 및 Tac 프로모터 작동자(예를 들어, 문헌[deBoer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25] 참조)를 포함한다.

[0584] 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 뉴클레오타이드 서열은 진핵생물 발현 벡터 및/또는 클로닝 벡터에 존재할 수 있다. 2개의 별개의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 동일한 또는 별개의 벡터에 클로닝 될 수 있다. 발현 벡터는 선별 마커, 복제 기점 및 벡터의 복제 및/또는 유지 및 이식 유전자의 발현을 제공하는 기타 특징을 포함할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 전형적으로는 이식 유전자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 적합한 발현 벡터는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 플라스미드 및 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 본 명세서에 상세히 개시된 바와 같은 재조합 레트로바이러스 입자이다.

[0585] 다수의 적합한 벡터 및 프로모터가 당업자에게 공지되어 있고; 많은 것들이 대상 재조합 작제물을 생성하기 위해 상업적으로 이용 가능하다. 다음 세균 벡터가 예로서 제공된다: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a(스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 라호이아 소재); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 및 pRIT5(파머시아(Pharmacia), 스웨덴 옴살라 소재). 다음 진핵생물 벡터가 예로서 제공된다: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG(스트라타진) pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVL(파머시아).

[0586] 발현 벡터는 일반적으로 이중 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열 근처에 위치하는 편리한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작동하는 선별 마커가 존재할 수 있다.

[0587] 위에 언급된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 일부 실시형태에서, RNA, 예를 들어, 시험관내 합성된 RNA일 것이다. RNA의 시험관내 합성을 위한 방법은 당업계에 공지되어 있으며; 임의의 공지된 방법이 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 RNA를 합성하는데 사용될 수 있다. RNA를 숙주 세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Zhao et al. (2010) *Cancer Res.* 15:9053] 참조. 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 RNA를 숙주 세포에 도입하는 것은 시험관내 또는 생체외 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, NK 세포, 세포독성 T 림프구 등)는 본 개시내용의 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 RNA로 시험관내 또는 생체외에서 전기천공 될 수 있다.

- [0588] 폴리뉴클레오타이드, 핵산 서열 및/또는 전사 단위 및/또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 다양한 양태 및 실시형태는 코작-유형 서열(본 명세서에서 코작-관련 서열이라고도 함), 우드척 간염 바이러스 전사후 제어 요소(woodchuck 간염 virus post-transcriptional regulatory element: WPRE) 및 이중 종결 코돈 또는 삼중 종결 코돈 중 하나 이상을 더 포함하되, 이중 종결 코돈 또는 삼중 종결 코돈의 하나 이상의 종결 코돈은 하나 이상의 전사 단위 중 적어도 하나의 판독의 종결을 정의한다. 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 핵산 서열 및/또는 전사 단위 및/또는 이를 포함하는 벡터는 하나 이상의 전사 단위 중 적어도 하나의 개시 코돈 상류의 10개의 뉴클레오타이드 내에 5' 뉴클레오타이드를 갖는 코작-유형 서열을 더 포함한다. 코작은 699개의 척추동물 mRNA에 대해 코작 컨센서스 서열 (GCC)GCCGCCATG(서열번호 327)을 결정하였으며, 여기서 R은 퓨린(A 또는 G)이다(문헌[Kozak. *Nucleic Acids Res.* 1987 Oct 26;15(20):8125-48]). 한 실시형태에서, 코작-유형 서열은 CCACCAT/UG(G)(서열번호 328), CCGCCAT/UG(G)(서열번호 329), GCCGCCGCCAT/UG(G)(서열번호 330) 또는 GCCGCCACCAT/UG(G)(서열번호 331)이거나 또는 이를 포함한다(선택적 뉴클레오타이드를 나타내는 괄호 안의 뉴클레오타이드와 슬래시로 구분된 뉴클레오타이드는, 예를 들어, 핵산이 DNA인지 또는 RNA인지에 따라 해당 위치에서 상이한 가능한 뉴클레오타이드를 나타냄). AU/TG 개시 코돈을 포함하는 이러한 실시형태에서, A는 위치 0으로 간주될 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, -3 및 +4의 뉴클레오타이드는 동일하며, 예를 들어, -3 및 +4 뉴클레오타이드는 G일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 코작-유형 서열은 ATG가 개시 코돈인 경우, ATG의 상류에서 세 번째 위치에 A 또는 G를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 코작-유형 서열은 AUG가 개시 코돈인 경우 AUG의 상류에서 세 번째 위치에 A 또는 G를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 코작 서열은 (GCC)GCCGCCATG(서열번호 327)이되, R은 퓨린(A 또는 G)이다. 예시적인 실시형태에서, 코작-유형 서열은 GCCGCCACCAUG(서열번호 332)이다. 코작-유형 서열을 포함하는 선행하는 실시형태 및/또는 삼중 종결 코돈을 포함하는 다음 실시형태와 조합될 수 있는 또 다른 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 WPRE 요소를 포함한다. WPRE는 당업계에서 특성화되었고(예를 들어, 문헌[Higashimoto et al., *Gene Ther.* 2007; 14: 1298] 참조), WO2019/055946에 예시되어 있다. 일부 실시형태에서, WPRE 요소는 하나 이상의 전사 단위의 종결 코돈의 3'에 위치하고, 폴리뉴클레오타이드의 5'에서 3' LTR에 위치한다. 선행하는 실시형태(즉, 폴리뉴클레오타이드가 코작-유형 서열을 포함하는 실시형태 및/또는 폴리뉴클레오타이드가 WPRE를 포함하는 실시형태) 중 하나 또는 둘 모두와 조합될 수 있는 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 전사 단위는 이중 종결 코돈 또는 삼중 종결 코돈 중 하나 이상의 종결 코돈으로 종결되되, 이중 종결 코돈은 제1 리딩 프레임의 제1 종결 코돈 및 제2 리딩 프레임의 제2 종결 코돈, 또는 제2 종결 코돈과 인프레임에 있는 제1 종결 코돈을 포함하고, 삼중 종결 코돈은 제1 리딩 프레임의 제1 종결 코돈, 제2 리딩 프레임의 제2 종결 코돈, 및 제3 리딩 프레임의 제3 종결 코돈 또는 제2 종결 코돈 및 제3 종결 코돈과 인프레임에 있는 제1 종결 코돈을 포함한다.
- [0589] 본 명세서의 삼중 종결 코돈은 서로 10개의 뉴클레오타이드 내에서 각각의 리딩 프레임에 하나씩, 바람직하게는 중첩 서열을 갖는 3개의 종결 코돈, 또는 바람직하게는 연속 코돈에서 동일한 리딩 프레임에 3개의 종결 코돈을 갖는다. 이중 종결 코돈은 서로 10개의 뉴클레오타이드 내에서 각각 서로 상이한 리딩 프레임에, 바람직하게는 중첩 서열을 갖는 2개의 종결 코돈, 또는 바람직하게는 연속 코돈에서 동일한 리딩 프레임에 2개의 종결 코돈을 의미한다.
- [0590] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물의 일부에서, PBMC, B 세포, T 세포 및/또는 NK 세포 내로의 DNA의 도입 및 선택적으로 숙주 세포 계놈으로의 DNA의 혼입은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 이외의 재조합 핵산 벡터를 사용하는 방법을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 비제한적인 예로서 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 또는 단순 포진 바이러스-1로부터 유래되는 것과 같은 다른 바이러스 벡터가 이용될 수 있다.
- [0591] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법 및 관련 용도, 반응 혼합물, 키트 및 세포 제형은 바이러스 벡터에 암호화되지 않은 폴리뉴클레오타이드로 세포를 형질감염시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 비-바이러스 벡터로 지칭될 수 있다. 세포를 유전적으로 변형 또는 형질감염시키기 위해 비-바이러스 벡터를 이용하는 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 예를 들어, 플라스미드 또는 네이키드 DNA를 포함하는 비-바이러스 벡터는 전기천공법, 뉴클레오펙션, 리포솜 제형, 지질, 덴드리머, 양이온성 중합체, 예컨대, 폴리(에틸렌이민)(PEI) 및 폴리(1-라이신)(PLL), 나노입자, 세포-투과 펩타이드, 미세주입 및/또는 비-통합 렌티바이러스 벡터를 포함하는 방법을 사용하여 예를 들어, PBMC, B 세포, T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 세포에 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 리포솜 제형, 지질, 덴드리머, PEI, PLL, 나노입자 및 세포-투과 펩타이드는 림프구-표적화 리간드, 예를 들어, 항-CD3 항체를 포함하도록 변형될 수 있다. 항-CD3 항체에 커플링된 PEI는 외인성 핵산으로 PBMC를 효과적으로 형질감염시키는 것으로 나타났다(문헌[O'Neill et al. *Gene Ther.* 2001 Mar;8(5):362-8]). 유사하게는, 나노입자는 항-CD3e f(ab')₂ 단편이 형질감염된 T 림프구에 커플링된 폴리글루

탐산 분자로 만들어진다(문헌[Smith et al. Nat Nanotechnol. 2017 Aug; 12(8): 813-820]). 일부 실시형태에서, DNA는 리포솜 및 프로타민과의 복합체로 PBMC, B 세포, T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 세포에 도입될 수 있다. 본 명세서에 제공된 방법의 실시형태에서 사용될 수 있는 생체외에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 형질감염시키는 다른 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Morgan and Boyerinas, Biomedicines. 2016 Apr 20;4(2). pii: E9] 참조, 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨).

[0592] 본 명세서에 제공된 방법의 일부 실시형태에서, DNA는 관심 유전자의 5' 및 3' 말단에 트랜스포존 ITR 단편을 포함하는 플라스미드로서 표적 DNA의 공동-형질감염, 공동-뉴클레오택션 또는 공동-전기천공법에 의한 트랜스포존-기반 담체 시스템 및 인간 게놈의 유사 attP 부위에 관심 유전자를 통합시키는 phiC31과 같은 DNA 또는 mRNA 또는 단백질 또는 부위 특이적 세린 제조합효소로서 전위효소 담체 시스템을 사용하여 게놈에 통합될 수 있으며, 이 경우 DNA 벡터는 제조합효소에 대한 인식 서열인 34bp 내지 40bp의 attB 부위(문헌[Bhaskar Thyagarajan et al. Site-Specific Genomic Integration in Mammalian Cells Mediated by Phage ϕ C31 Integrase, Mol Cell Biol. 2001 Jun; 21(12): 3926-3934])를 포함하며, 이는 제조합효소로 공동 형질감염된다. T 세포 및/또는 NK 세포의 경우, 본 명세서에 제공된 소정의 방법에서 사용될 수 있는 트랜스포존-기반 시스템은 DNA, mRNA 또는 단백질 형태로 슬리핑 뷰티(*Sleeping Beauty*) DNA 담체 시스템(예를 들어, 미국 특허 제6,489,458호 및 미국 출원 제15/434,595호 참조, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨), *PiggyBac* DNA 담체 시스템(예를 들어, 문헌[Manuri et al., Hum Gene Ther. 2010 Apr;21(4):427-37] 참조, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨) 또는 ToLCDR2트랜스포존 시스템(예를 들어, 문헌[Tsukahara et al., Gene Ther. 2015 Feb; 22(2): 209-215] 참조, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨)을 이용한다. 일부 실시형태에서, 트랜스포존-기반 벡터 시스템의 트랜스포존 및/또는 전위효소는 T 세포 및/또는 NK 세포에 도입하기 전 미니서클 DNA 벡터로 생산될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hudecek et al., Recent Results Cancer Res. 2016;209:37-50 및 Monjezi et al., Leukemia. 2017 Jan;31(1):186-194] 참조, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용됨). 그러나, 일부 상황에서, 전위효소-기반 담체 시스템은 외인성 핵산을 도입하는 바람직한 방법이 아니다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 양태 또는 실시형태의 폴리뉴클레오타이드는 트랜스포존 ITR 단편을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 양태 또는 실시형태의 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 세포는 DNA 또는 mRNA 또는 단백질과 같은 전위효소 담체 시스템을 포함하지 않는다.

[0593] CAR 또는 림프증식성 요소는 또한 표적 부위의 통합 5' 및 3'에 상동성인 50bp 내지 1000bp의 상동성 암(homology arm)을 추가함으로써 CRISPR 또는 TALEN 매개성 통합을 사용하여 게놈의 정의되고 특정한 부위 내로 통합될 수 있다(문헌[Jae Seong Lee et al. Scientific Reports 5, Article number: 8572 (2015), Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway]). CRISPR 또는 TALEN은 특이성 및 게놈-표적화된 절단을 제공하며, 작제물은 상동성-매개 말단 연결을 통해 통합될 것이다(문헌[Yao X et al. Cell Res. 2017 Jun;27(6):801-814. doi: 10.1038/cr.2017.76. Epub 2017 May 19]). CRISPR 또는 TALEN은 DNA, mRNA 또는 단백질과 같은 표적 플라스미드로 공동-형질감염될 수 있다.

[0594] (예를 들어, 전혈에서 또는 TNC 또는 PBMC와 같은 전혈 분획에서) T 세포 및/또는 NK 세포를 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 임의의 방법, 또는 이러한 방법을 포함하는 용도, 또는 이러한 방법에 의해 생성된 변형된 세포, 및 본 명세서에 제공된 임의의 다른 방법 또는 공정 별 제품에 대해, 당업자는 외인성 핵산(들)이 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자를 포함하지 않는 방법을 사용하여, 예를 들어, 또 다른 유형의 제조합 벡터(예를 들어, 플라스미드 지질 형질감염제와 회합된 플라스미드)를 사용하여 세포에 도입될 수 있음을 이해할 것이다.

[0595] 저해성 RNA 분자

[0596] 본 명세서에 제공된 임의의 양태의 실시형태는 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)와 같은 숙주 세포로의 통합 후 게놈이 하나 이상, 및 예시적인 실시형태에서 2개 이상의, 예를 들어, miRNA 또는 shRNA와 같은 저해성 RNA 분자의 발현을 유도하도록 구축된 제조합 레트로바이러스 입자를 포함할 수 있다. 이러한 저해성 RNA 분자는, 예를 들어, EF1-a 인트론을 비롯한 인트론 내에서 암호화될 수 있다. 이는 이전 교시의 단점을 극복하기 위해 패키징 가능한 레트로바이러스 게놈에 포함될 수 있는 기능적 요소를 최대화하고, 입양 T 세포 요법에 있어 이러한 제조합 레트로바이러스 입자의 효과를 최대화하는 방법의 본 발명의 교시의 이점을 취한다.

[0597] 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 2개의 가닥이 세포 환경 내에서 18개 내지 25개 뉴클레오타이드 RNA 듀플렉스를 형성할 수 있도록 서로 부분적으로 또는 완전히 상보적인 5' 가닥 및 3' 가닥(일부 예에서, 센스 가닥

및 안티센스 가닥)을 포함한다. 5' 가닥은 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있고, 3' 가닥은 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 5' 가닥 및 3' 가닥은 동일하거나 또는 상이한 길이일 수 있고, RNA 듀플렉스는 하나 이상의 미스매치를 포함할 수 있다. 대안적으로, RNA 듀플렉스는 미스매치를 갖지 않는다.

[0598] 소정의 예시적인 예에서, 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에 포함된 저해성 RNA 분자는 이들이 삽입된 계놈의 T 세포에 존재하지 않고/않거나 자연적으로 발현되지 않는다. 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 miRNA 또는 shRNA이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서 또는 우선권 출원에서, 특히 핵산이 계놈의 일부인 맥락에서 siRNA를 암호화하는 핵산에 대한 참조가 있는 경우, 이러한 핵산은 DICER에 의해 처리되어 전형적으로 RISC 복합체와 상호작용하거나 또는 이의 일부가 되는 이중 가닥 RNA를 형성하는 세포에서 miRNA 또는 shRNA와 같은 siRNA 전구체를 형성할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 실시형태의 저해성 분자는, 예를 들어, Pri-miRNA 또는 Pre-miRNA와 같은 miRNA의 전구체 또는 shRNA의 전구체이다. 일부 실시형태에서, miRNA 또는 shRNA는 인공적으로 유래된다(즉, 인공 miRNA 또는 siRNA). 다른 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 siRNA 또는 siRNA 자체로 처리되는 dsRNA(전사되거나 또는 인공적으로 도입됨)이다. 일부 실시형태에서, miRNA 또는 shRNA는 자연에서 발견되지 않는 서열을 가지거나, 또는 자연에서 발견되지 않는 적어도 하나의 기능적 분절을 가지거나, 또는 자연에서 발견되지 않는 기능적 분절의 조합을 갖는다.

[0599] 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 다중 miRNA 서열이 단일 폴리시스트론 miRNA 전사체로부터 동시에 발현되도록 직렬 또는 다중 배열로 제1 핵산 분자에 위치한다. 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 비-기능적 링커 서열(들)에 의해 직접 또는 간접적으로 서로 인접될 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 5개 내지 120개의 뉴클레오타이드 길이이고, 일부 실시형태에서, 비제한적인 예로서 10개 내지 40개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA를 암호화하는 제1 핵산 서열과 CAR(예를 들어, MRB-CAR)을 암호화하는 제2 핵산 서열은 구성적으로 활성이거나 또는 T 세포 또는 NK 세포에서 유도될 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 이와 같이, 저해성 RNA 분자(들)(예를 들어, miRNA)뿐만 아니라 CAR은 폴리시스트론 방식으로 발현된다. 추가적으로, 기능적 서열은 동일한 전사체로부터 발현될 수 있다. 예를 들어, 저해성 RNA 분자가 아닌 본 명세서에 제공된 임의의 림프증식성 요소는 CAR 및 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자와 동일한 전사체로부터 발현될 수 있다.

[0600] 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 miR-155와 같지만 이로 제한되지 않는 자연 발생적 miRNA이다. 대안적으로, 인공 miRNA는 혼성화/상보적 스템 구조를 형성할 수 있고 표적 RNA에 대해 지시되는 서열이 스템 서열 사이에 마이크로RNA 처리를 위한 마이크로RNA 측면 서열 및 측면 서열과 동일한 자연 발생적 miRNA로부터 선택적으로 유래될 수 있는 루프를 포함하는 miRNA 프레임워크에 배치되는 방식으로 생산될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 5'에서 3' 배향을 포함한다: 5' 마이크로RNA 측면 서열, 5' 스템, 루프, 상기 5' 스템에 대해 부분적으로 또는 완전히 상보적인 3' 스템 및 3' 마이크로RNA 측면 서열. 일부 실시형태에서, 5' 스템(본 명세서에서 5' 암이라고도 함)은 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 3' 스템(본 명세서에서 3' 암이라고도 함)은 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시형태에서, 루프는 3개 내지 40개, 10개 내지 40개, 20개 내지 40개 또는 20개 내지 30개의 뉴클레오타이드 길이이고, 예시적인 실시형태에서, 루프는 18개, 19개, 20개, 21개 또는 22개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 한 스템은 다른 스템보다 2개의 뉴클레오타이드가 더 길다. 더 긴 스템은 5' 스템 또는 3' 스템일 수 있다.

[0601] 일부 실시형태에서, 5' 마이크로RNA 측면 서열, 3' 마이크로RNA 측면 서열 또는 둘 모두는 miR-155, miR-30, miR-17-92, miR-122 및 miR-21과 같지만 이들로 제한되지 않는 자연 발생적 miRNA로부터 유래된다. 소정의 실시형태에서, 5' 마이크로RNA 측면 서열, 3' 마이크로RNA 측면 서열 또는 둘 모두는, 예를 들어, 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 또는 호모 사피엔스(*Homo sapiens*)로부터의 miR-155와 같은 miR-155로부터 유래된다. 합성 miRNA 스템-루프를 miR-155 프레임워크(즉, 5' 마이크로RNA 측면 서열, 3' 마이크로RNA 측면 서열 및 miRNA 5' 스템과 3' 스템 사이의 루프)에 삽입하는 것은 당업자에게 알려져 있다(문헌[Chung, K. *et al.* 2006. *Nucleic Acids Research*. 34(7):e53]; US 7,387,896). 예를 들어, siBR(합성 저해성 BIC-유래 RNA) 서열(위의 문헌[Chung *et al.* 2006])은 무스 무스쿨루스 BIC 논코딩 mRNA(Genbank ID AY096003.1)의 134번 내지 161번 뉴클레오타이드(서열번호 333)로 구성된 5' 마이크로RNA 측면 서열 및 무스 무스쿨루스 BIC 논코딩 mRNA(Genbank ID AY096003.1)의 223번 내지 283번 뉴클레오타이드로 구성된 3' 마이크로RNA 측면 서열을 갖는다. 한 연구에서, miRNA의 발현을 향상시키기 위해 SIBR 서열이 변형되었다(eSIBR)(문헌[Fowler, D.K. *et al.* 2015. *Nucleic acids Research* 44(5):e48]). 본 개시내용의 일부 실시형태에서, miRNA는 SIBR 또는 eSIBR miR-155 프레임워크

에 배치될 수 있다. 본 명세서의 예시적인 실시형태에서, miRNA는 서열번호 333으로 표시되는 miR-155의 5' 마이크로RNA 측면 서열, 서열번호 334로 표시되는 3' 마이크로RNA 측면 서열(무스 무스쿨루스 BIC 논코딩 mRNA의 221번 내지 265번 뉴클레오타이드)을 포함하는 miR-155 프레임워크; 및 변형된 miR-155 루프(서열번호 335)에 배치된다. 따라서, 일부 실시형태에서, miR-155의 5' 마이크로RNA 측면 서열은 서열번호 333 또는, 예를 들어, 서열번호 333과 동일한 길이, 또는 서열번호 333의 95%, 90%, 85%, 80%, 75% 또는 50%만큼 긴 길이, 또는 100개 이하의 뉴클레오타이드, 95개 이하의 뉴클레오타이드, 90개 이하의 뉴클레오타이드, 85개 이하의 뉴클레오타이드, 80개 이하의 뉴클레오타이드, 75개 이하의 뉴클레오타이드, 70개 이하의 뉴클레오타이드, 65개 이하의 뉴클레오타이드, 60개 이하의 뉴클레오타이드, 55개 이하의 뉴클레오타이드, 50개 이하의 뉴클레오타이드, 45개 이하의 뉴클레오타이드, 40개 이하의 뉴클레오타이드, 35개 이하의 뉴클레오타이드, 30개 이하의 뉴클레오타이드 또는 25개 이하의 뉴클레오타이드; 및 서열번호 333에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 길이인 서열과 같은 이의 기능적 변이체이다. 일부 실시형태에서, miR-155의 3' 마이크로RNA 측면 서열은 서열번호 334, 또는, 예를 들어, 서열번호 334와 동일한 길이, 또는 서열번호 334의 95%, 90%, 85%, 80%, 75% 또는 50%만큼 긴 길이, 또는 100개 이하의 뉴클레오타이드, 95개 이하의 뉴클레오타이드, 90개 이하의 뉴클레오타이드, 85개 이하의 뉴클레오타이드, 80개 이하의 뉴클레오타이드, 75개 이하의 뉴클레오타이드, 70개 이하의 뉴클레오타이드, 65개 이하의 뉴클레오타이드, 60개 이하의 뉴클레오타이드, 55개 이하의 뉴클레오타이드, 50개 이하의 뉴클레오타이드, 45개 이하의 뉴클레오타이드, 40개 이하의 뉴클레오타이드, 35개 이하의 뉴클레오타이드, 30개 이하의 뉴클레오타이드 또는 25개 이하의 뉴클레오타이드; 및 서열번호 334에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 서열과 같은 이의 기능적 변이체이다. 그러나, 이들이 결합하는 표적 mRNA의 발현을 저해할 수 있는 성숙 miRNA를 형성하기 위해 그 안에 삽입된 miRNA의 세포 내 적절한 처리를 제공하는 기능을 하는 임의의 공지된 마이크로RNA 프레임워크가 본 개시내용 내에서 상정된다.

[0602] 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 폴리뉴클레오타이드에서 핵산 서열에 의해 암호화된 저해성 RNA 분자 중 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개는 5'에서 3' 방향으로 다음 배열을 갖는다: 5' 마이크로RNA 측면 서열, 5' 스템, 루프, 상기 5' 스템에 대해 부분적으로 또는 완전히 상보적인 3' 스템 및 3' 마이크로RNA 측면 서열. 일부 실시형태에서, 모든 저해성 RNA 분자는 5'에서 3' 방향으로 다음 배열을 갖는다: 5' 마이크로RNA 측면 서열, 5' 스템, 루프, 상기 5' 스템에 대해 부분적으로 또는 완전히 상보적인 3' 스템 및 3' 마이크로RNA 측면 서열. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 저해성 RNA 분자는 하나 이상의 링커 서열에 의해 분리될 수 있으며, 이는 일부 실시형태에서 저해성 RNA 분자 사이의 스페이서로서 작용하는 것을 제외하고는 기능을 갖지 않는다.

[0603] 일부 실시형태에서, 2개 이상의 저해성 RNA 분자(일부 예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 저해성 RNA 분자)가 포함되는 경우, 이러한 저해성 RNA 분자는 동일하거나 또는 상이한 RNA 표적(예컨대, 예를 들어, 관심 유전자로부터 전사된 mRNA)에 대해 지시된다. 예시적인 실시형태에서, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 2개 내지 5개, 3개 내지 5개, 3개 내지 6개 또는 4개의 저해성 RNA 분자가 제1 핵산 서열에 포함된다. 예시적인 실시형태에서, 4개의 저해성 RNA 분자가 제1 핵산 서열에 포함된다.

[0604] 따라서, 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 또는 실시형태에서, 달리 림프증식성 요소(예를 들어, 폴리펩타이드 림프증식성 요소)와 양립할 수 없거나 또는 이미 그 안에 있는 상태가 아닌 한, 하나 이상의 저해성 RNA 분자는 하나 이상의 림프증식성 요소이다. 일부 실시형태에서, RNA 표적은 PD-1(불활성화 방지); CTLA4(불활성화 방지); TCRa(안전성 - 자가면역 방지); TCRb(안전성 - 자가면역 방지); CD3Z(안전성 - 자가면역 방지); SOCS1(불활성화 방지); SMAD2(불활성화 방지); miR-155 표적(활성화 촉진); IFN 감마(CRS 감소); cCBL(신호전달 연장); TRAIL2(사멸 방지); PP2A(신호전달 연장); 또는 ABCG1(콜레스테롤의 제거를 제한하여 콜레스테롤 마이크로도메인 함량 증가)과 같지만 이들로 제한되지 않는 T 세포에 의해 발현된 유전자로부터 전사된 mRNA이다. 예시적인 예에서, 본 명세서에 제공된 방법에서 T 세포의 계능에 삽입된 miRNA는 T 세포의 증식이 유도 및/또는 향상되고/되거나 세포자멸사가 억제되도록 표적을 지향한다.

[0605] 일부 실시형태에서, RNA 표적은 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 성분을 암호화하는 mRNA를 포함한다. 이러한 성분은 T 세포 수용체 복합체의 생성 및/또는 형성을 위한 성분 및/또는 T 세포 수용체 복합체의 적절한 기능을 위한 성분을 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 2개 이상의 저해성 RNA 분자 중 적어도 하나는 TCR 복합체, 예시적인 실시형태에서, T 세포의 하나 이상의 내인성 TCR 복합체의 형성 및/또는 기능의 감소를 야기한다. T 세포 수용체 복합체는 TCRa, TCRb, CD3d, CD3e, CD3g 및 CD3z를 포함한다. 이러한 성분의 복잡한 상호의존성이 있어, 임의의 한 서브유닛의 발현이 감소하면 복합체의 발현 및 기능이 감소할 것으로 알려져 있다. 따라서,

일 실시형태에서, RNA 표적은 형질도입된 T 세포에 내인성인 TCR α , TCR β , CD3d, CD3e, CD3g 및 CD3z 중 하나 이상을 발현하는 mRNA이다. 소정의 실시형태에서, RNA 표적은 하나 이상의 miRNA를 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하는 T 세포의 내인성 TCR α 또는 TCR β 유전자로부터 전사된 mRNA이다. 예시적인 실시형태에서, RNA 표적은 TCR α 유전자로부터 전사된 mRNA이다. 소정의 실시형태에서, 유사한 예상 유용성을 갖는 표적 유전자로부터 전사된 mRNA에 대해 지시된 저해성 RNA 분자가 결합될 수 있다. 다른 실시형태에서, 상보적 유용성을 갖는 표적 유전자로부터 전사된 표적 mRNA에 대해 지시된 저해성 RNA 분자가 결합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 저해성 RNA 분자는 표적 유전자 CD3Z, PD1, SOCS1 및/또는 IFN 감마로부터 전사된 mRNA에 대해 지시된다.

[0606]

일부 실시형태에서, 저해성 RNA, 예를 들어, miRNA는 Cb1 원종양 유전자(RNF55)(cCBL 및 RNF55로도 알려져 있음)(HGNC: 1541, Entrez Gene: 867, OMIM: 165360), T-세포 수용체 T3 제타 사슬(CD3z)(HGNC: 1677, Entrez Gene: 919, OMIM: 186780), PD1, CTLA4, T 세포 면역글로불린 뮤신 3(TIM3)(간염 바이러스 세포 수용체 2로도 알려져 있음)(HGNC: 18437 Entrez Gene: 84868, OMIM: 606652), 림프구 활성화 3(LAG3)(HGNC: 6476, Entrez Gene: 3902, OMIM: 153337), SMAD2, TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 10b(TNFRSF10B)(HGNC: 11905, Entrez Gene: 8795, OMIM: 603612), 단백질 포스포타이민 2 촉매 서브유닛 알파(PPP2CA)(HGNC: 9299, Entrez Gene: 5515, OMIM: 176915), 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 구성원 6(TNFRSF6)(Fas 세포 표면 사멸 수용체(FAS)로도 알려져 있음)(HGNC: 11920, Entrez Gene: 355, OMIM: 134637), B 및 T 림프구 감쇠인자(BTLA)(HGNC: 21087, Entrez Gene: 151888, OMIM: 607925), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT)(HGNC: 26838, Entrez Gene: 201633, OMIM: 612859), 아데노신 A2a 수용체(ADORA2A 또는 A2AR)(HGNC: 263, Entrez Gene: 135, OMIM: 102776), 아릴 탄화수소 수용체(AHR)(HGNC: 348, Entrez Gene: 196, OMIM: 600253), 에오메소더민(EOMES)(HGNC: 3372, Entrez Gene: 8320, OMIM: 604615), SMAD 패밀리 구성원 3(SMAD3)(HGNC: 6769, Entrez Gene: 4088, OMIM: 603109), SMAD 패밀리 구성원 4(SMAD4)(HGNC: 6770, Entrez Gene: 4089, OMIM: 600993), TGFBR2, 단백질 포스포타이민 2 조절 서브유닛 B 텔타(PPP2R2D)(HGNC: 23732, Entrez Gene: 55844, OMIM: 613992), 종양 괴사 인자 리간드 슈퍼패밀리 구성원 6(TNFSF6)(FASL로도 알려져 있음)(HGNC: 11936, Entrez Gene: 356, OMIM: 134638), 카스페이스 3(CASP3) HGNC: 1504, Entrez Gene: 836, OMIM: 600636), 사이토카인 신호전달 2 억제인자(SOCS2)(HGNC: 19382, Entrez Gene: 8835, OMIM: 605117), 크루켈 유사 인자 10(KLF10)(TGFB-유도성 초기 성장 반응 단백질 1(TIEG1)로도 알려져 있음)(HGNC: 11810, Entrez Gene: 7071, OMIM: 601878), JunB 원종양 유전자, AP-1 전사 인자 서브유닛(JunB)(HGNC: 6205, Entrez Gene: 3726, OMIM: 165161), Cbx3, Tet 메틸사이토신 다이옥시메타제 2(Tet2)(HGNC: 25941, Entrez Gene: 54790, OMIM: 612839), 헥소카이네이스 2(HK2)(HGNC: 4923, Entrez Gene: 3099, OMIM: 601125), Src 상동성 영역 2 도메인-함유 포스포타이민-1(SHP1)(HGNC: 9658, Entrez Gene: 5777, OMIM: 176883), Src 상동성 영역 2 도메인-함유 포스포타이민-2(SHP2)(HGNC: 9644, Entrez Gene: 5781, OMIM: 176876), 콜로니 자극 인자 2(CSF2; GMCSF)(Entrez Gene: 1437)를 암호화하거나, 또는 일부 실시형태에서, TIM3, LAG3, TNFRSF10B, PPP2CA, TNFRSF6(FAS), BTLA, TIGIT, A2AR, AHR, EOMES, SMAD3, SMAD4, PPP2R2D, TNFSF6(FASL), CASP3, SOCS2, TIEG1, JunB, Cbx3, Tet2, HK2, SHP1 또는 SHP2를 암호화하는 mRNA를 표적으로 한다. 일부 예시적인 실시형태에서, 저해성 RNA, 예를 들어, miRNA는 FAS, AHR, CD3z, cCBL, Chromo박스 1(Cbx)(HGNC: 1551, Entrez Gene: 10951, OMIM: 604511), HK2, FASL, SMAD4 또는 EOMES를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하거나; 또는 일부 예시적인 실시형태에서, 저해성 RNA, 예를 들어, miRNA는 FAS, AHR, Cbx3, HK2, FASL, SMAD4 또는 EOMES를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하거나; 또는 일부 예시적인 실시형태에서, 저해성 RNA, 예를 들어, miRNA는 AHR, Cbx3, HK2, SMAD4 또는 EOMES를 암호화하는 mRNA를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 저해성 RNA, 예를 들어, miRNA는 CAR의 ASTR이 결합하는 항원을 표적으로 한다.

[0607]

일부 양태에서, 자가-구동 CAR을 발현하도록 설계된 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공된다. 자가-구동 CAR을 포함하는 이러한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 및 조성물 및 방법 양태에 관한 세부사항은 본 명세서, 예를 들어, 자가-구동 CAR 방법 및 조성물 부분과 예시적인 실시형태 부분에 보다 상세히 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 자가-구동 CAR을 발현하도록 설계된 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 개시된 임의의 저해성 RNA 분자를 포함할 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 또한 본 명세서에 개시된 다른 저해성 RNA 분자의 존재 또는 부재하에 NFAT 경로의 저해제를 표적으로 하는 저해성 RNA 분자를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 CABIN, Homer2, AKAP5, LRRK2 및/또는 DSCR1/MCIP(이러한 단백질을 암호화하는 RNA 분자의 너다운은 칼시뉴린 또는 칼모듈린의 저해를 감소시킬 수 있음); 및/또는 Dyrk1A, CK1 및/또는 GSK3(이러한 단백질을 암호화하는 RNA 분자의 너다운은 NFAT의 인산화 및 핵 방출을 방지할 수 있음)을 표적으로 할 수 있다.

[0608]

일부 추가의 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 벡터 또는 게놈은 본 명세서, 예를 들어, 바로 위의 단락에서

확인된 2개 이상, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 저해성 RNA(예를 들어, miRNA)를 포함한다. 일부 추가의 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 벡터 또는 계놈은 FAS, cCBL, AHR, CD3z, Cbx, EOMES 또는 HK2를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하는 2개 이상, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 저해성 RNA(예를 들어, miRNA) 또는 이러한 mRNA를 표적으로 하는 하나 이상의 저해성 RNA의 조합을 포함한다. 일부 추가의 예시적인 실시형태에서, 본 명세서의 벡터 또는 계놈은 AHR, Cbx3, EOMES 또는 HK2를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하는 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 저해성 RNA(예를 들어, miRNA) 또는 이러한 mRNA를 표적으로 하는 하나 이상의 저해성 RNA의 조합을 포함한다.

[0609] 본 명세서에 제공된 일부 실시형태에서, 2개 이상의 저해성 RNA 분자는 EF1-a 인트론 A와 같지만 이로 제한되지 않는 단일 인트론으로 전달될 수 있다. 본 개시내용을 위한 miRNA를 지니게 하는데 사용될 수 있는 인트론 서열은 T 세포 내에서 처리되는 임의의 인트론을 포함한다. 본 명세서에 나타난 바와 같이, 이러한 배열의 한 가지 장점은 이것이 본 명세서에 제공된 방법에서 T 세포에 이러한 서열을 전달하는데 사용되는 레트로바이러스 계놈의 크기 제한 내에서 miRNA 서열을 포함하는 능력을 최대화하는데 도움이 된다는 것이다. 이는 제1 핵산 서열의 인트론이 해당 인트론을 발현하는데 사용되는 프로모터 서열의 전부 또는 일부, CAR 서열 및 저해성 RNA 분자가 아닌 림프증식성 요소(들)와 같은 본 명세서에 제공된 다른 기능적 서열을 폴리시스트론 방식으로 포함하는 경우에 특히 그렇다. 인트론에 대한 서열 요건은 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 인트론 처리는 본 명세서에 개시된 임의의 리보스위치와 같은 리보스위치에 작동 가능하게 연결된다. 따라서, 리보스위치는 제1 핵산 서열 상의 하나 이상의 miRNA 서열의 발현을 제어하기 위한 제어 요소를 제공할 수 있다. 따라서, 예시적인 실시형태에서, 내인성 T 세포 수용체 서브유닛에 대해 지시된 miRNA의 조합이 본 명세서에 제공되며, miRNA의 발현은 본 명세서에서 논의된 임의의 리보스위치일 수 있는 리보스위치에 의해 조절된다.

[0610] 일부 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는 동일하거나 또는 상이한 전사 단위에 포함될 수 있는 다중 핵산 서열에 제공될 수 있다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화할 수 있고, 제1 프로모터로부터 발현될 수 있으며, 제2 핵산 서열은 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화할 수 있고, 제2 프로모터로부터 발현될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 2개 이상의 저해성 RNA 분자는 단일 프로모터로부터 발현되는 제1 핵산 서열에 위치한다. 이러한 miRNA를 발현하는데 사용되는 프로모터는 전형적으로 계놈의 miRNA를 표적 T 세포에 전달할 레트로바이러스 입자를 발현하는데 사용되는 패키징 세포에서 비활성인 프로모터이지만, 이러한 프로모터는 T 세포 내에서 구성적으로 또는 유도성 방식으로 활성화이다. 프로모터는 Pol I, Pol II 또는 Pol III 프로모터일 수 있다. 일부 예시적인 실시형태에서, 프로모터는 Pol II 프로모터이다.

[0611] 특성화 및 상업적 생산 방법

[0612] 본 개시내용은 과학적 실험 및 상업적 생산을 위한 연구 시약으로 사용될 수 있는 다양한 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 과학적 실험은 본 명세서에 제공된 림프구를 변형, 예를 들어, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법을 사용하여 림프구, 예컨대, NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, T 세포를 특성화하는 방법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 방법은 림프구의 활성화 및 활성화가 이러한 세포를 형질도입 가능하게 만드는 상세한 분자 메커니즘을 연구하는데 사용될 수 있다. 또한, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 예를 들어, T 세포 증식 및 생존에 영향을 미치는 인자를 더 잘 이해하기 위한 연구 도구로서 유용성을 가질 유전적으로 변형된 림프구가 본 명세서에 제공된다. 이러한 변형된 림프구, 예컨대, NK 세포 및 예시적인 실시형태에서, T 세포는 또한 상업적 생산, 예를 들어, 상업적 제품의 생산에서 수확 및 테스트되거나 또는 사용될 수 있는 성장 인자 및 면역 조절제와 같은 소정의 인자의 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0613] 림프구의 과학적 실험 및/또는 특성화는 림프구를 분석 또는 비교하는데 유용한 본 명세서에 제공된 임의의 양태, 실시형태 또는 하위 실시형태를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 명세서에 제공된 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자로 형질도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입은 본 개시내용의 폴리펩타이드, 예를 들어, CAR, 림프증식성 요소 및/또는 활성화 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같은 저해성 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 키메라 림프증식성 요소일 수 있다.

[0614] 예시적인 실시형태

[0615] 본 명세서에 제공된 비제한적인 예시적인 양태 및 실시형태가 이 예시적인 실시형태 부문에서 제공되며, 본 명

세서 전반에 걸쳐 추가로 논의된다. 간결함과 편의를 위해, 본 명세서에 개시된 모든 양태와 실시형태 및 개시된 양태와 실시형태의 모든 가능한 조합은 이 부문에 열거되어 있지 않다. 추가적인 실시형태 및 양태는 본 명세서의 다른 부분에 제공된다. 또한, 이 전체 개시내용에서 논의된 바와 같이 많은 양태에 대한 특정 실시형태인 실시형태가 제공된다는 것이 이해될 것이다. 본 명세서의 전체 개시내용을 고려하여, 아래 또는 본 명세서의 전체 개시내용에 인용된 임의의 개별 실시형태는 아래 또는 본 명세서의 전체 개시내용에 인용된 임의의 양태와 조합될 수 있는 것으로 의도되며, 이는 그것이 양태에 추가될 수 있는 추가적인 요소이거나 또는 그것이 양태에 이미 존재하는 요소에 대한 더 좁은 요소이기 때문이다. 이러한 조합은 이 상세한 설명의 다른 부분에서 보다 구체적으로 논의된다. 따라서, 예를 들어, 본 명세서에 제공된 임의의 실시형태는 달리 양립 가능하지 않거나 또는 달리 언급되지 않는 한 본 명세서에 제공된 임의의 반응 혼합물, 세포 형성, 키트, 용도, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포 또는 방법 양태에서 사용될 수 있다.

[0616] 본 명세서에 제공된 많은 방법 양태는 다음 단계를 포함한다: 1) 대상체로부터 혈액을 수집하는 선택적 단계; 2) 선택적 인큐베이션을 포함할 수 있는, 반응 혼합물에서 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 예시적인 실시형태에서, T 세포를 재조합 백터, 예시적인 실시형태에서, 소정의 예시적인 실시형태에서 CAR을 암호화하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 및/또는 림프증식성 요소를 접촉시키는 단계; 3) 전형적으로 반응 혼합물의 세포로부터 결합되지 않은 재조합 백터를 세척하는 단계; 4) 전형적으로, 예시적인 실시형태에서, 전달 용액일 수 있는 용액에서 변형된 세포, 예컨대, 변형된 NK 세포 및/또는 예시적인 실시형태에서, 변형된 T 세포를 수집하여, 예시적인 실시형태에서, 세포 제형인 세포 현탁액을 형성하는 단계; 및 5) 세포 제형을, 예를 들어, 주입을 통해, 또는 소정의 예시적인 실시형태에서, 근육내로 또는 일부 가장 예시적인 실시형태에서, 피하로 대상체, 예시적인 실시형태에서, 혈액이 수집되는 대상체에게 전달하는 선택적 단계. 소정의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 미분획 전혈을 포함하거나, 총 유핵 세포(TNC)를 포함하여 전혈에서 발견되는 모든 또는 많은 세포 유형을 포함한다는 점은 주목할 만하다. 소정의 실시형태에서, 재조합 백터는 CAR 및 림프증식성 요소를 모두 암호화하는 자가-구동 CAR을 포함한다는 점은 주목할 만하다. 이 예시적인 실시형태 부문의 뒷 부분에는 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 양립할 수 없거나 또는 달리 표시되지 않는 한, 바로 아래 또는 그렇지 않으면 본 명세서에 제공되는 임의의 양태에 대해 사용될 수 있는 예시적인 범위 및 목록이 제공된다.

[0617] 일 양태에서, 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 세포 제형을 대상체에게 피하로 투여하는 단계를 포함하는, 변형된 림프구(예를 들어, NK 세포 및/또는 T 세포)를 대상체에게 투여, 주사 또는 전달하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 [i] 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되며, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되거나, 또는 [ii] 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나 또는 이들 둘 다이고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하며, 호중구, B 세포, 단핵구, 호염기구 및 호산구 중 적어도 하나는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포와 함께 세포 제형으로 피하로 투여된다.

[0618] 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 세포 제형을 대상체에게 피하로 투여하는 단계를 포함하는, 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 대상체에게 전달하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나, 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되거나 또는 이들 둘 다이고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하며,

[0619] a. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 림프구의 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%에서 염색체외이고;

[0620] b. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 CAR 또는 전위 효소 중 하나 이상을 발현하지 않으며;

[0621] c. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25% 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 재조합 바이러스 역전사효소 또는 재조합 바이러스 인테그레이스를 포함하고;

[0622] d. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 계놈에 안정적으로 통합된 폴리뉴클레오타이드를 갖지 않으며;

[0623] e. 세포 제형 내 T 세포 및/또는 NK 세포의 1% 내지 20% 또는 선택적으로 5% 내지 15%는 유전적으로 변형되고;

[0624] f. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 변형된 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 생존하

며; 그리고/또는

- [0625] g. 변형된 림프구의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%는 표면에 바이러스 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 항체를 포함한다.
- [0626] 일부 실시형태에서, 피하 또는 근육내 투여, 전달 또는 주사에 의해 대상체에게 도입되는 변형된 림프구는 동종 이계 림프구일 수 있다. 이러한 실시형태에서, 림프구는 상이한 사람으로부터 유래하며, 대상체로부터의 림프구는 변형되지 않는다. 일부 실시형태에서, 림프구를 수확하기 위해 대상체로부터 혈액을 수집하지 않는다.
- [0627] 바로 위의 임의의 양태에서, 방법은 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형시키거나(여기서, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결됨); 또는 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 레트로바이러스 입자와 회합시키거나 또는 이들 둘 다에 의해 림프구를 변형시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0628] 바로 위의 임의의 양태에서, 둘 중 하나 또는 둘 모두가 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 회합되거나(여기서, 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결됨) 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되기 때문에, 림프구는 변형된 림프구로 간주될 수 있다.
- [0629] 일 양태에서, 다음을 포함하는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 전달, 주사 또는 투여하는 방법이 본 명세서에 제공된다:
- [0630] a) 선택적으로, 대상체로부터 림프구를 포함하는 혈액을 수집하는 단계;
- [0631] b) T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소를 포함하는 반응 혼합물에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계로서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 다음을 포함하며,
- [0632] i) 레트로바이러스 입자의 표면 상의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드(여기서, 결합 펩타이드는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스 입자 막과 T 세포 및/또는 NK 세포막의 융합을 매개할 수 있음); 및
- [0633] ii) 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화함),
- [0634] 상기 접촉은 T 세포 및/또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는, 혈액 세포를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계; 및
- [0635] c) 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 용액을 대상체에게 근육내로 또는 예시적인 실시형태에서, 피하로 투여하는 단계:
- [0636] i) 반응 혼합물은 부피 기준으로 적어도 25%의 미분획 전혈을 포함하고,
- [0637] ii) 반응 혼합물은 호중구를 포함하며,
- [0638] iii) 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 B 세포, 호중구, 단핵구, 호염기구 및 호산구 중 하나 이상과 함께 세포 제형으로 피하로 투여되고; 그리고/또는
- [0639] 생체외에서, iv) 대상체로부터 혈액이 수집된 시간과 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 대상체에게 투여(또는 재투여/재도입)되는 시간 사이에 14시간 이하의 시간이 경과하지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 재조합 핵산 벡터는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하는 복제 불능 레트로바이러스 입자이다.
- [0640] 바로 위의 방법을 포함하지만 이로 제한되지 않는 투여 단계를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 방법에 대한 일부 실시형태에서, 방법은 변형 후 그러나 투여 전, 변형된 림프구를 희석 용액에 제형화하여 변형된 림프구를 포함하는 세포 제형을 형성하는 단계를 더 포함하되, 대상체에게 투여되는 용액은 세포 제형이다.
- [0641] 일 양태에서, 다음을 포함하는 변형된 림프구를 대상체에게 투여하는 방법이 본 명세서에 제공된다:

- [0642] a) 대상체로부터 림프구를 포함하는 혈액을 수집하는 단계;
- [0643] b) 혈액 또는 이의 분획을 포함하는 반응 혼합물에서 림프구를 생체외에서 재조합 핵산 벡터와 접촉시킴으로써 림프구를 변형시키는 단계로서, 상기 접촉은 임의의 인큐베이션 없이 또는 1분 내지 12시간 동안 반응 혼합물을 인큐베이션함으로써 수행되고, 상기 접촉은 림프구와 재조합 핵산 벡터의 회합을 촉진하여 림프구를 변형시키는, 상기 혈액 또는 이의 분획을 포함하는 반응 혼합물에서 림프구를 생체외에서 재조합 핵산 벡터와 접촉시킴으로써 림프구를 변형시키는 단계; 및
- [0644] c) 변형된 림프구를 포함하는 용액을 대상체에게 피하로 또는 근육내로 투여하는 단계로서, 변형된 림프구는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 핵산 벡터와 회합되거나, 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되거나 또는 이들 둘 다에 의해 변형되고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는, 상기 변형된 림프구를 포함하는 용액을 대상체에게 피하로 또는 근육내로 투여하는 단계.
- [0645] 예시적인 실시형태에서, 이러한 재조합 핵산 벡터는 표면에 융합성 폴리펩타이드, 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 슈도타이핑 요소) 및 선택적으로 활성화 요소들을 포함하는 복제 불능 레트로바이러스 입자이다.
- [0646] 생체외 또 다른 양태에서, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 전달하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 방법은 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형을 대상체에게 피하로 전달하는 단계를 포함하고, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되고, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드 및 사이토카인 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화한다.
- [0647] 생체외
- [0648] 일 양태에서, 세포 제형, 및 변형된 림프구를 대상체에게 피하로 또는 근육내로 투여하기 위한 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포) 및 예시적인 실시형태에서, 종양 침윤 림프구 또는 유전적으로 변형된 림프구를 포함하는 세포 제형을 제조하기 위한 또는 이의 제조에서의 재조합 핵산 벡터, 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 재조합 핵산 벡터는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고, 세포 제형은 피하 또는 근육내 투여에 효과적이고, 이에 적합화되고/되거나 가능하다. 세포 제형은 본 명세서에 제공된 임의의 세포 제형 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0649] 또 다른 양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 응집체를 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, T 세포 및/또는 NK 세포는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 변형되고, 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되며, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고,
- [0650] 그리고 추가로, 응집체는 적어도 4개, 5개, 6개 또는 8개의 T 세포 및/또는 NK 세포를 더 포함하되, 세포 응집체는 최소 치수가 적어도 15 μ m이고/이거나 세포 응집체는 직경이 적어도 15 μ m인 거친 필터에 의해 유지된다.
- [0651] 일 양태에서, 다음을 포함하는 유전적으로 변형된 림프구를 대상체에게 생착시키는 방법이 본 명세서에 제공된다:
- [0652] a) 변형된 림프구를 포함하는 용액을 대상체에게 피하로 투여하는 단계로서, 변형된 림프구는 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합하거나(여기서, 각 전사 단위는 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결됨), 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되거나 또는 이들 둘 다에 의해 변형되고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드 및 전형적으로 림프증식성 요소를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는, 상기 변형된 림프구를 포함하는 용액을 대상체에게 피하로 투여하는 단계; 및
- [0653] b) 변형된 림프구의 적어도 일부가 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되도록 또는 변형된 림프구의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40% 또는 50%가 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형될 때까지, 적어도 0.5시간, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 또는 8시간 동안 변형된 림프구를 피하에서 인큐베이션 하는 단계. 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 CAR의 항원-특이적 표적화 영역에 대한 표적의 부

재 및 외인성 사이토카인의 부재하에 적어도 7일 동안 생체의 배양에서 생존할 수 있다.

- [0654] 일 양태에서, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 전달 용액에 현탁되며,
- [0655] [i] 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되며, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되거나, 또는
- [0656] [ii] 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나, 또는 이들 둘 다이고,
- [0657] 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고, 예시적인 실시 형태에서, 세포 제형은 주사기 안에 포함되며, 0.5ml 내지 20ml 또는 2ml 내지 10ml의 부피 또는 본 명세서에 제공된 또 다른 피하 또는 근육내 세포 제형 부피를 갖고, 호중구, B 세포, 단핵구, 호염기구 및 호산구 중 적어도 하나를 더 포함한다. 예시적인 실시 형태에서, 세포 제형은 근육내 및 추가의 예시적인 실시 형태에서, 피하 전달과 양립할 수 있고, 이에 효과적이고/이거나 이에 적합화된다.
- [0658] 일 양태에서, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 전달 용액에 현탁되며,
- [0659] [i] 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되며, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되거나, 또는
- [0660] [ii] 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나, 또는 이들 둘 다이고,
- [0661] 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고, 예시적인 실시 형태에서, 세포 제형은 주사기 안에 포함되고, 0.5ml 내지 20ml 또는 2ml 내지 10ml의 부피 또는 본 명세서에 제공된 또 다른 피하 또는 근육내 세포 제형 부피를 갖고,
- [0662] a. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 림프구의 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%에서 염색체외이고;
- [0663] b. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 CAR 또는 전위 효소 중 하나 이상을 발현하지 않으며;
- [0664] c. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25% 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 재조합 바이러스 역전사효소 또는 재조합 바이러스 인테그레이스를 포함하고;
- [0665] d. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 계놈에 안정적으로 통합된 폴리뉴클레오타이드를 갖지 않으며;
- [0666] e. 세포 제형 내 T 세포 및/또는 NK 세포의 1% 내지 20% 또는 선택적으로 5% 내지 15%는 유전적으로 변형되고;
- [0667] f. 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 변형된 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 75%, 80%, 90% 또는 95%는 생존하며; 그리고/또는
- [0668] g. 변형된 림프구의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%는 표면에 바이러스 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 항체를 포함한다.
- [0669] 또 다른 양태에서, 다음을 포함하는 세포 제형을 제조하는 방법이 본 명세서에 제공된다:
- [0670] a) 선택적으로, 대상체로부터 림프구를 포함하는 혈액을 수집하는 단계;
- [0671] b) T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소를 포함하는 반응 혼합물에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계로서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 다음을 포함하며,
- [0672] i) 레트로바이러스 입자의 표면 상의 결합 폴리펩타이드 및 융합성 폴리펩타이드(여기서, 결합 펩타이드는 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 융합성 폴리펩타이드는 레트로바이러스 입자 막과 T 세포 및/또는 NK 세포막의 융합을 매개할 수 있음); 및
- [0673] ii) 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 하나 이상의 전사 단위 각각은 T 세포 및/

또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결되되, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화함),

- [0674] 상기 접촉은 T 세포 및/또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포를 변경시키는, 상기 T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소를 포함하는 반응 혼합물에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계;
- [0675] b) 전달 용액에서 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 수집하여 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 현탁액을 포함하는 세포 제형을 형성하는 단계; 및
- [0676] c) 0.5ml 내지 20ml 또는 2ml 내지 10ml 또는 본 명세서에 제공된 또 다른 피하 또는 근육내 세포 제형 부피의 세포 제형을 주사기로 옮기는 단계.
- [0677] 추가적인 세포 제형 양태 및 실시형태는 이 예시적인 실시형태 부문 외부에서 아래에 및 본 명세서의 상세한 설명에서 제공된다. 임의의 세포 제형 양태를 위한 다양한 부피의 세포 제형이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 부피가 3ml 이상, 예를 들어, 부피가 3ml 내지 600ml이며, 하이알루로니데이스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 1ml 내지 10ml, 1ml 내지 5ml, 1ml 내지 3ml, 또는 10ml, 5ml, 4ml, 3ml, 또는 2ml 이하 또는 3ml 미만이고, 예시적인 실시형태에서, 하이알루로니데이스를 포함하지 않는다. 다른 부피 및 제형도 본 명세서에 제공된다. 본 명세서의 임의의 세포 제형 양태에 대한 일부 실시형태에서, 세포 제형은 주사기 안에 포함된다.
- [0678] 본 명세서에 제공된 임의의 세포 제형 양태의 일부 실시형태에서, 세포 제형은 피하로 또는 근육내로 국재화되거나, 또는 대부분의 세포 제형은 대상체에서 피하로 또는 근육내로 국재화된다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 CAR에 의해 인식되는 항원의 공급원을 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구는 본 명세서에 제공된 림프구를 변형시키는 방법의 생성물이다.
- [0679] 다른 양태에서, 다음을 포함하는 NK 세포 및/또는 T 세포를 변형시키기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다:
- [0680] T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제1 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 전형적으로 실질적으로 순수한 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 명세서의 임의의 실시형태에 따른 재조합 레트로바이러스 입자 내에서 발견됨)를 포함하는 하나 또는 복수의 제1 용기로서, 제1 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하고; 하나 이상의 부속 성분은 다음으로부터 선택되며:
- [0681] a) 본 명세서에 제공된 바와 같이 피하 및/또는 근육내 투여와 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서, 이에 효과적이고, 추가의 예시적인 실시형태에서, 이에 적합화되는 전달 용액을 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0682] b) T 세포 및/또는 NK 세포의 피하 또는 근육내 전달과 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서, 이에 효과적이고, 추가의 예시적인 실시형태에서, 이에 적합화된 하나 이상의 멸균 주사기;
- [0683] c) 하나 또는 복수의 백혈구제거 여과 어셈블리;
- [0684] d) 본 명세서에 제공된 바와 같은 하이알루로니데이스의 하나 이상의 용기;
- [0685] e) 예시적인 실시형태에서, 백 또는 별개의 용기에 항응고제를 포함하는 혈액 수집 백과 같은 하나 이상의 혈액 백, 혈액 처리 완충액 백, 혈액 처리 폐기물 수집 백 및 혈액 처리 세포 샘플 수집 백;
- [0686] f) 본 명세서에 상세히 개시된 바와 같은 T 세포 활성화 요소, 예를 들어, 레트로바이러스 입자를 포함하는 용기 또는 별도의 용기에 용액으로 제공되거나 또는 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자의 표면과 회합된 항-CD3;
- [0687] g) T 세포 및/또는 NK 세포의 형질도입과 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이며, 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된 용액 또는 배지를 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0688] h) T 세포 및/또는 NK 세포를 행구는 것에 대해 양립할 수 있고, 예시적인 실시형태에서 이에 효과적이고/이거나 추가의 예시적인 실시형태에서 이에 적합화된 용액 또는 배지를 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0689] i) pH-조절 약리학적 작용제를 포함하는 하나 이상의 용기;
- [0690] j) T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제2 전사 단위를 포함하는 제2 폴리뉴

클레오타이드, 전형적으로 실질적으로 순수한 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 본 명세서의 임의의 실시형태에 따른 재조합 레트로바이러스 입자 내에서 발견됨)를 포함하는 하나 이상의 용기로서, 제2 전사 단위는 상이한 표적 에피토프 또는 소정의 실시형태에서, 상이한 항원, 예시적인 실시형태에서, 동일한 표적 암세포(예를 들어, B 세포)에서 발견되는 상이한 항원에 대해 지시되는 제2 CAR을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는, 상기 하나 이상의 용기;

- [0691] k) 핵산(예를 들어, 레트로바이러스 입자)에 의해 암호화되는 제1 CAR 및/또는 제2 CAR에 대한 동족 항원을 포함하는 하나 이상의 용기; 및
- [0692] l) 이의 사용을 위한, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 피하로 또는 근육내로 전달하기 위한 그리고/또는 대상체에서 종양 성장 또는 암을 치료하기 위한 다른 키트 성분과 물리적으로 또는 디지털 방식으로 결합된 설명서.
- [0693] 위에 제공된 임의의 키트에서, 제1 및/또는 제2 폴리뉴클레오타이드는 임의의 본 명세서에 제공된 자가-구동 CAR을 포함할 수 있다. 추가적인 키트 양태 및 실시형태는 이 예시적인 실시형태 부문 외부에서 아래 및 본원의 상세한 설명에서 제공된다.
- [0694] 주사기를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 대해, 예시적인 실시형태에서, 주사기는 근육내 및 예시적인 실시형태에서, 피하 전달과 양립할 수 있고, 이에 효과적이고/이거나 이에 적합화되고/되거나 근육내로 주사하는데 효과적이고, 피하로 주사하는데 효과적이며, 근육내로 주사하는데 적합화되고/되거나 피하로 주사하는데 적합화된다. 예를 들어, 주사기는 근육내 전달을 위해 20 내지 22의 게이지와 1인치 내지 1.5인치의 길이를 갖는 바늘 및 피하 전달을 위해 26 내지 30의 게이지와 0.5인치 내지 0.625인치의 길이를 갖는 바늘을 가질 수 있다.
- [0695] 일 양태에서, T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 제2 전사 단위를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며, 제1 전사 단위 및 제2 전사 단위는 서로 다르게 배열되고,
- [0696] 제1 전사 단위는 림프증식성 요소를 암호화하며, 그리고
- [0697] 제2 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하고, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다. 관련 양태에서, 바로 직전의 선행하는 양태의 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 임의의 다른 단리된 폴리뉴클레오타이드 양태를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되며, 단리된 폴리뉴클레오타이드는 CAR 및/또는 림프증식성 요소를 암호화한다. 일부 실시형태에서, 절연체는 발산성 전사 단위 사이에 위치한다.
- [0698] 일 양태에서, T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며,
- [0699] 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고,
- [0700] 림프증식성 요소는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 구성적으로 활성화되며,
- [0701] 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함하고, 그리고
- [0702] 하나 이상의 제1 전사 단위는 신호 펩티데이스 절단 부위를 포함하는 신호 서열을 포함하지 않는다.
- [0703] 또 다른 양태에서, T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 역배향의 제1 서열 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 정배향의 제2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되며, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고,
- [0704] 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 더 포함하고, 역배향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 하며,
- [0705] 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 그리고

- [0706] 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하되, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0707] 또 다른 양태에서, T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 본 명세서에 제공되되, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고,
- [0708] 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 그리고
- [0709] 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0710] 또 다른 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되되, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며,
- [0711] 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고,
- [0712] 림프증식성 요소는 T 세포 또는 NK 세포에서 구성적으로 활성이며,
- [0713] 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함하고, 및
- [0714] 하나 이상의 제1 전사 단위는 신호 펩티데이스 절단 부위를 포함하는 신호 서열을 포함하지 않는다.
- [0715] 또 다른 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되되, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 역배향의 제1 서열 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 정배향의 제2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고,
- [0716] 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 더 포함하고, 역배향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 하며,
- [0717] 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 그리고
- [0718] 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0719] 또 다른 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되되, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고,
- [0720] 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하며, 그리고
- [0721] 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0722] 또 다른 양태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자에 대한 패키징 가능한 RNA 게놈을 포함하는 포유동물 패키징 세포주가 본 명세서에 제공되되, 상기 패키징 가능한 RNA 게놈은 다음을 포함한다:

- [0723] a. 5' 긴 말단 반복부 또는 이들의 활성 단편;
- [0724] b. 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소를 암호화하는 핵산 서열;
- [0725] c. T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 역배향의 제1 서열 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 정배향의 제2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드로서, 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 더 포함하고, 역배향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 하며, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하며, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하고, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는, 상기 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0726] d. 3' 긴 말단 반복부 또는 이들의 활성 단편.
- [0727] 또 다른 양태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자에 대한 패키징 가능한 RNA 게놈을 포함하는 포유동물 패키징 세포주가 본 명세서에 제공되되, 상기 패키징 가능한 RNA 게놈은 다음을 포함한다:
- [0728] a. 5' 긴 말단 반복부 또는 이들의 활성 단편;
- [0729] b. 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소를 암호화하는 핵산 서열;
- [0730] c. T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하며, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하고, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는, 상기 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0731] d. 3' 긴 말단 반복부 또는 이들의 활성 단편.
- [0732] 또 다른 양태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자에 대한 패키징 가능한 RNA 게놈을 포함하는 포유동물 패키징 세포주가 본 명세서에 제공되되, 상기 패키징 가능한 RNA 게놈은 다음을 포함한다:
- [0733] a. 5' 긴 말단 반복부 또는 이들의 활성 단편;
- [0734] b. 레트로바이러스 시스-작용 RNA 패키징 요소를 암호화하는 핵산 서열;
- [0735] c. T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함함); 및
- [0736] d. 3' 긴 말단 반복부 또는 이들의 활성 단편,
- [0737] 여기서 상기 패키징 가능한 RNA 게놈, 슈도타이핑 요소 및 막-결합 T 세포 활성화 요소를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 따라 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시킬 수 있고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소 및 막-결합 T 세포 활성화 요소를 포함하며, 상기 접촉은 T 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키며, 상기 접촉은 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키기 위해 인큐베이션 없이 또는 1분 내지 18시간 동안 인큐베이션함으로써 수행된다.
- [0738] 또 다른 양태에서, 다음을 포함하는 재조합 복제 불능 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다:
- [0739] a. 패키징 세포에 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위를 포함하는 제1 단리된 폴리뉴

클레오타이드로서, 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 외피 폴리펩타이드를 포함하는 제1 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드;

[0740] b. 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위를 포함하는 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 gag 폴리펩타이드 및 pol 폴리펩타이드를 포함하는 제2 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드;

[0741] c. 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위를 포함하는 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 REV 폴리펩타이드를 포함하는 제3 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제3 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드; 및

[0742] d. 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위를 포함하는 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 림프증식성 요소는 T 세포 또는 NK 세포에서 구성적으로 활성이고, 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함하며, 하나 이상의 제1 전사 단위는 신호 펩티데이스 절단 부위를 포함하는 신호 서열을 포함하지 않는, 상기 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드.

[0743] 또 다른 양태에서, 다음을 포함하는 제조합 복제 불능 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다:

[0744] a) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위를 포함하는 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 외피 폴리펩타이드를 포함하는 제1 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드;

[0745] b) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위를 포함하는 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 gag 폴리펩타이드 및 pol 폴리펩타이드를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드;

[0746] c) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위를 포함하는 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 REV 폴리펩타이드를 포함하는 제3 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제3 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드; 및

[0747] d) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위를 포함하는 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 역배향의 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 정배향의 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하고, 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 더 포함하며, 역배향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 하고, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적으며, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는, 상기 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드.

[0748] 또 다른 양태에서, 다음을 포함하는 제조합 복제 불능 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다:

[0749] a) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위를 포함하는 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 외피 폴리펩타이드를

포함하는 제1 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드;

- [0750] b) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위를 포함하는 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 gag 폴리펩타이드 및 pol 폴리펩타이드를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드;
- [0751] c) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위를 포함하는 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 REV 폴리펩타이드를 포함하는 제3 폴리펩타이드를 암호화하는 제3 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0752] d) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위를 포함하는 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하고, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적으며, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는, 상기 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드.
- [0753] 또 다른 양태에서, 다음을 포함하는 제조합 복제 불능 레트로바이러스 입자를 생성하기 위한 키트가 본 명세서에 제공된다:
- [0754] a) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위를 포함하는 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제1 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 외피 폴리펩타이드를 포함하는 제1 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드;
- [0755] b) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위를 포함하는 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제2 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 gag 폴리펩타이드 및 pol 폴리펩타이드를 포함하는 제2 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드;
- [0756] c) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 연결된 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위를 포함하는 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제3 패키징 전사 단위 중 적어도 하나는 레트로바이러스 REV 폴리펩타이드를 포함하는 제3 패키징 폴리펩타이드를 암호화하는 제3 패키징 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 상기 제3 단리된 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0757] d) 패키징 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제4 패키징 전사 단위를 포함하는 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 하나 이상의 제4 전사 단위 중 적어도 하나는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제4 폴리펩타이드를 암호화하는, 상기 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드,
- [0758] 여기서 제1, 제2, 제3 또는 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 슈도타이핑 요소를 포함하는 제5 폴리펩타이드를 암호화하는 제5 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 선택적으로 제1, 제2, 제3 또는 제4 단리된 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 막-결합 T 세포 활성화 요소를 포함하는 제6 폴리펩타이드를 암호화하는 제6 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며;
- [0759] 키트를 사용하여 생성된 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 따라 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시킬 수 있되, 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소 및 막-결합 T 세포 활성화 요소를 포함하고, 상기 접촉은 T 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 제조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키며, 제조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키고, 상기 접촉은 세포 또는 NK

세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키기 위해 인큐베이션 없이 또는 1분 내지 18시간 동안 인큐베이션함으로써 수행된다.

[0760] 또 다른 양태에서, T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 접촉은 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질전환시키며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며,

[0761] 림프증식성 요소는 T 세포 또는 NK 세포에서 구성적으로 활성화되고,

[0762] 림프증식성 요소는 막관통 도메인을 포함하며,

[0763] 하나 이상의 제1 전사 단위는 신호 펩티데이스 절단 부위를 포함하는 신호 서열을 포함하지 않는다.

[0764] 또 다른 양태에서, T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 접촉은 T 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질전환시키며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 역배향의 제1 서열 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 정배향의 제2 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 더 포함하며, 역배향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 하고, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적으며, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.

[0765] 또 다른 양태에서, T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 접촉은 T 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질전환시키며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적으며, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화하고, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.

[0766] 또 다른 양태에서, T 세포 또는 NK 세포를 생체외에서 표면에 슈도타이핑 요소 및 막-결합 T 세포 활성화 요소를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 접촉은 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포를 유전적으로 변형시키며,

[0767] 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 또는 NK 세포 중 적어도 하나에서 유도 가능한 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 제1 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호

화하는 제1 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며,

- [0768] 상기 접촉은 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키기 위해 인큐베이션 없이 또는 1분 내지 18시간 동안 인큐베이션함으로써 수행된다.
- [0769] 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화함)를 포함하는 임의의 양태에 대한 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 제2 서열을 더 포함할 수 있되, 하나 이상의 제2 전사 단위 중 적어도 하나는 키메라 항원 수용체를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고, CAR은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0770] 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드(여기서, 하나 이상의 제1 전사 단위 중 적어도 하나는 림프증식성 요소를 암호화함)를 포함하는 임의의 양태에 대한 일부 실시형태에서, 제1 서열을 포함하는 하나 이상의 제1 전사 단위는 역배향일 수 있되, 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 더 포함하고, 역방향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 한다.
- [0771] 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 양태에 대한 일부 실시형태에서, 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 제2 서열은 정배향일 수 있되, 폴리뉴클레오타이드는 5' LTR 및 3' LTR을 포함하고, 역방향 및 정배향은 5' LTR 및 3' LTR에 의해 확립된 5'에서 3' 배향을 기준으로 한다.
- [0772] 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위 및 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제2 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 양태에 대한 일부 실시형태에서, 하나 이상의 제1 전사 단위의 5' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 5' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수는 하나 이상의 제1 전사 단위의 3' 말단과 하나 이상의 제2 전사 단위의 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드의 수보다 적다.
- [0773] 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 제1 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 양태에 대한 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 NFAT-반응성 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 9개의 NFAT-결합 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, NFAT-결합 부위는 NFAT에 결합하는 능력을 보유하는 기능적 서열 변이체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, NFAT-반응성 프로모터는 유도 신호의 부재하에도 전사 수준이 낮은 상류 NFAT-결합 부위를 갖는 최소 구성적 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 신호의 부재하에, 이러한 NFAT-반응성 프로모터로부터의 림프증식성 요소의 낮은 전사 수준은 구성적 프로모터로부터의 CAR의 전사 수준의 1/2, 1/4, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 2/250, 1/500 또는 1/1,000 미만일 수 있다.
- [0774] 본 발명의 임의의 양태에서, 반응 혼합물은 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 미분획 전혈을 포함할 수 있고, 선택적으로 유효량의 항응고제 또는 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 적어도 하나의 추가적인 혈액 또는 혈액 제제 성분을 더 포함할 수 있으며, 추가의 예시적인 실시형태에서, 이러한 혈액 또는 혈액 제제 성분은 본 명세서에 제공된 주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분 중 하나 이상이다.
- [0775] 또 다른 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자, T 세포 활성화 요소 및 혈액 세포를 포함하는 반응 혼합물이 본 명세서에 제공되되, 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 혈액 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 하나 이상의 핵산 서열, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성화인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드, 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드(LE) 및/또는 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화하며, 반응 혼합물은 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 미분획 전혈을 포함한다. 하나 이상의 저해성 RNA 분자(들)는 이 예시적인 실시형태 부문을 포함하지만 이로 제한되지 않는 본 명세서에 제공된 임의의 표적에 대해 지시될 수 있다.
- [0776] 일 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 및 혈액 세포를 포함하는 반응 혼합물이 본 명세서에 제공되되, 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 혈액 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하며, 반응 혼합물은 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 미분획 전

혈 및 선택적으로 유효량의 항응고제를 포함하거나, 또는 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 적어도 하나의 추가적인 혈액 또는 혈액 제제 성분을 더 포함하고, 예시적인 실시형태에서, 이러한 혈액 또는 혈액 제제 성분은 본 명세서에 제공된 주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분 중 하나 이상이다.

[0777] 또 다른 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자, T 세포 활성화 요소 및 혈액 세포를 포함하는 반응 혼합물이 본 명세서에 제공되며, 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 혈액 세포는 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 하나 이상의 핵산 서열, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드, 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드(LE) 및/또는 하나 이상의 저해성 RNA 분자를 암호화하며, 반응 혼합물은 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 미분획 전혈 및 선택적으로 유효량의 항응고제를 포함하거나, 또는 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 적어도 하나의 추가적인 혈액 또는 혈액 제제 성분을 더 포함하고, 예시적인 실시형태에서, 이러한 혈액 또는 혈액 제제 성분은 본 명세서에 제공된 주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분 중 하나 이상이다. 하나 이상의 저해성 RNA 분자(들)는 이 예시적인 실시형태 부문을 포함하지만 이로 제한되지 않는 본 명세서에 제공된 임의의 표적에 대해 지시될 수 있다.

[0778] 또 다른 양태에서, 반응 혼합물에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 혈액 또는 이의 성분에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하고, 상기 접촉은 T 세포 및/또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진하며, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키고, 반응 혼합물은 적어도 10%, 10%, 20%, 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 미분획 전혈 및 선택적으로 유효량의 항응고제를 포함하거나, 또는 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 적어도 하나의 추가적인 혈액 또는 혈액 제제 성분을 더 포함하며, 예시적인 실시형태에서, 이러한 혈액 또는 혈액 제제 성분은 본 명세서에 제공된 주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분 중 하나 이상이다.

[0779] 또 다른 양태에서, 대상체의 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 반응 혼합물에서 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하며, 상기 접촉은 T 세포 또는 NK 세포와 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 회합을 촉진시키고, 재조합 레트로바이러스 입자는 T 세포 및/또는 NK 세포를 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키며, 혈액 세포는 T 세포, NK 세포를 포함하고, 반응 혼합물은 적어도 10%, 20%, 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 미분획 전혈 및 선택적으로 유효량의 항응고제를 포함하거나, 또는 반응 혼합물은 PBMC가 아닌 적어도 하나의 추가적인 혈액 또는 혈액 제제 성분을 더 포함하고, 예시적인 실시형태에서, 이러한 혈액 또는 혈액 제제 성분은 본 명세서에 제공된 주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분 중 하나 이상이다.

[0780] 이러한 소정의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 적어도 10%의 전혈을 포함하기 때문에, 하나 이상의 주목할 만한 비-PBMC 혈액 또는 혈액 제제 성분은 이 예시적인 실시형태 부문에 제공되는 것들을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 반응 혼합물, 용도, 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포, 또는 본 명세서에 제공된 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 방법의 소정의 예시적인 실시형태에 존재한다. 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 위의 하한에서 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 및 75% 내지 범위의 상한에서 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 또는 99.99%의 전혈 또는 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 또는 99.99%의 미분획 전혈을 포함한다.

[0781] 또 다른 양태에서, 림프구(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포) 또는 이의 집단을 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 게놈 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 림프구(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포) 또는 이의 집단을 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입시키는 방법이 본 명세서에 제공되며, 하나 이상의 핵산 서열의 제1 핵산 서열은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하고, 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 하나 이상의 RNA 표적에 대해 지시된 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자를 암호화하며, 추가로 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 폴리펩타이드

림프증식성 요소를 암호화하고, 상기 접촉은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 림프구(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포) 또는 림프구의 적어도 일부(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 유전적 변형 및/또는 형질도입을 촉진하여 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 생성한다. 이러한 방법에서, 접촉은 전형적으로 림프구의 집단(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)을 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 집단과 접촉되는 반응 혼합물에서 수행되며, 이는 때때로 본 명세서에서 형질도입 반응 혼합물로 지칭된다. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 대한 막 회합 및 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 궁극적인 막 융합을 촉진하기 위해 이 양태에서 사용될 수 있는 이 예시적인 실시형태 부문을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 접촉 시간이 본 명세서에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 접촉은 15분 미만 동안 수행된다.

[0782] 일 양태에서, 대상체의 림프구(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 반응 혼합물에서 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 슈도타이핑 요소를 포함하며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 하나 이상의 핵산 서열, 전형적으로 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 하나 이상의 전사 단위는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드, 림프증식성 요소를 포함하는 제1 폴리펩타이드(LE) 또는 LE를 포함하는 제1 폴리펩타이드 및 CAR을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화하여 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구(예를 들어, 변형된 T 세포 및/또는 변형된 NK 세포)를 생성한다. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 대한 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 막 회합 및 궁극적인 막 융합을 촉진하기 위해 이 양태에서 사용될 수 있는 이 예시적인 실시형태 부문을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 접촉 시간이 본 명세서에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 접촉은 15분 미만 동안 수행된다.

[0783] 또 다른 양태에서, 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한 방법에 사용하기 위한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되며, 방법은 반응 혼합물에서 대상체의 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 게놈 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하고, 하나 이상의 핵산 서열의 제1 핵산 서열은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 하나 이상의 RNA 표적에 대해 지시된 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자를 암호화하고, 추가로 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 폴리펩타이드 림프증식성 요소를 암호화하고, 상기 접촉은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 휴지기 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 일부의 형질도입을 촉진하여 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성한다. 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 대한 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 막 회합 및 궁극적인 막 융합을 촉진하기 위해 이 양태에서 사용될 수 있는 이 예시적인 실시형태 부문을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 접촉 시간이 본 명세서에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 접촉은 15분 미만 동안 수행된다. 일부 실시형태에서, 방법은 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 혈액 세포는 대상체로부터 유래할 수 있으므로, 도입은 재도입이다. 이러한 양태에서, 일부 실시형태에서, 림프구의 집단(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)은 접촉 단계에서 접촉되고, 변형된, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입되고, 도입 단계에서 대상체에게 도입된다.

[0784] 또 다른 양태에서, 대상체의 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 반응 혼합물에서 대상체의 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 게놈 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계를 포함하고, 하나 이상의 핵산 서열의 제1 핵산 서열은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하며, 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 하나 이상의 RNA 표적에 대해 지시된 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자를 암호화하고, 추가로 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 폴리펩타이드 림프증식성 요소를 암호화하며, 상기 접촉은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 일부의 유전적 변형을 촉진하여 변형된 및 예시적인 실시형태에

서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성한다. 본 명세서에 나타난 바와 같이, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 대한 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 막 회합 및 궁극적인 막 융합을 촉진하기 위해 이 양태에서 사용될 수 있는 다양한 접촉 시간이 본 명세서에 제공된다. 예시적인 실시형태에서, 접촉은 15분 미만 동안 수행된다. 예시적인 실시형태에서, 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 포함하는 혈액 세포는 대상체로부터 유래할 수 있으므로, 도입은 재도입이다. 이러한 양태에서, 일부 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 집단은 접촉 단계에서 접촉되고, 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입되고, 도입 단계에서 대상체에게 도입된다.

[0785] 또 다른 양태에서, 대상체의 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한 약제의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 약제의 사용은 다음을 포함한다:

[0786] A) 반응 혼합물에서 대상체의 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 혈액 세포를 생체외에서 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 계층 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계로서, 하나 이상의 핵산 서열의 제1 핵산 서열은 항원-특이적 표적화 영역(ASTR), 막관통 도메인 및 세포내 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하고, 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 하나 이상의 RNA 표적에 대해 지시된 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 저해성 RNA 분자를 암호화하며, 추가로 선택적으로 하나 이상의 핵산 서열 중 다른 하나는 폴리펩타이드 림프증식성 요소를 암호화하고, 상기 접촉은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자에 의한 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 적어도 일부의 유전적 변형을 촉진하여 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 생성하는, 상기 반응 혼합물에서 혈액 세포를 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시키는 단계; 및 선택적으로

[0787] B) 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 도입하여 변형 대상체의 림프구, 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 단계.

[0788] 양립할 수 없거나 또는 달리 표시되지 않는 한, 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 바로 위 또는 그렇지 않으면 본 명세서에 제공된 임의의 양태를 사용하거나 참조하는 예시적인 양태가 다음 단락에 제공된다. 또 다른 양태에서, 본 명세서의 임의의 방법에 따라 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)를 변형시킴으로써 제조된 변형된, 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 그리고 추가의 예시적인 실시형태에서, 안정적으로 형질감염된 또는 안정적으로 전사된 림프구(들)(예를 들어, T 세포(들) 또는 NK 세포(들))가 본 명세서에 제공된다.

[0789] 또 다른 양태에서, 대상체의 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키기 위한 키트 또는 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 본 명세서에 제공된 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 임의의 방법을 포함한다. 또 다른 양태에서, 변형된 림프구를 대상체에게 전달하고, 대상체에게 투여하고, 대상체에게 주사하고/하거나 대상체에 생착시키기 위한 키트 또는 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 대상체에게 전달하고, 대상체에게 투여하고, 대상체에게 주사하고/하거나 대상체에 생착시키기 위한 본 명세서에 제공된 임의의 방법을 포함한다. 또 다른 양태에서, 세포 제형을 제조하기 위한 키트 또는 키트의 제조에서의 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되며, 키트의 사용은 변형 본 명세서에 제공된 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형시키는 단계를 포함하는 세포 제형을 제조하는 임의의 방법을 포함한다. 또 다른 양태에서, 대상체에 대한 피하 전달에 사용하기 위한 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자가 본 명세서에 제공되며, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 사용은 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 피하 전달을 위한 본 명세서에 제공된 임의의 방법을 포함한다.

[0790] 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 양립할 수 없거나 또는 달리 표시되지 않는 한, 바로 위에 또는 그렇지 않으면 본 명세서에 제공된 임의의 양태에 대해 사용될 수 있는 예시적인 실시형태, 예를 들어, 예시적인 범위 및 목록이 다음 단락에 제공된다. 추가적인 양태 및 실시형태는 이 예시적인 실시형태 부문 외부의 본 명세서에서 제공된다.

[0791] 본 발명의 임의의 양태에서, 세포(들) 또는 림프구(들)는 NK 세포(들) 또는 예시적인 실시형태에서, T 세포(들)이다. 혈액을 수집하는 것을 포함하는 양태에서 이러한 방법은 미분획 혈액 샘플과 같은 혈액 샘플일 수 있거나 또는 성분채집에 의해 수집된 혈액 세포(예를 들어, 백혈구 또는 림프구)일 수 있는 혈액-유래 생성물 또는 말초 혈액-유래 생성물을 수집하는 것을 포함할 수 있음이 이해될 것이다.

[0792] 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 하나 이상의 전

사 단위는 림프증식성 요소(LE)를 포함하는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프증식성 요소는 예시적인 실시형태에서, 야누스 카이네이스/신호 변환인자 및 전사의 활성인자(JAK/ STAT) 경로 및/또는 종양 괴사 인자 수용체(TNF-R)-관련 인자(TRAF) 경로를 활성화하는 사이토카인 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 구성적으로 활성이며, 박스1 및 선택적으로 박스2 JAK-결합 모티프, 및 타이로신 잔기를 포함하는 STAT-결합 모티프를 포함한다. 일부 예시적인 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외 리간드 결합 도메인 또는 소분자 결합 도메인을 포함하지 않는다. 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩타이드 림프증식성 요소, 예를 들어, 이로 제한되는 것은 아니지만 본 명세서의 "림프증식성 요소" 부문에 개시된 것들 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편이 암호화될 수 있다. 일부 실시형태에서, LE는 CD2, CD3D, CD3E, CD3G, CD4, CD8A, CD8B, CD27, 돌연변이된 델타 Lck CD28, CD28, CD40, CD79A, CD79B, CRLF2, CSF2RB, CSF2RA, CSF3R, EPOR, FCER1G, FCGR2C, FCGRA2, GHR, ICOS, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IFNLR1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL7RA, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL17RE, IL18R1, IL18RAP, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL31RA, LEPR, LIFR, LMP1, MPL, MYD88, OSMR, PRLR, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, TNFRSF14 또는 TNFRSF18 또는 이들의 기능적 돌연변이체 및/또는 단편으로부터의 세포내 도메인을 포함한다. 본 명세서에 개시된 임의의 실시형태에서, 림프증식성 요소는 세포외 리간드 결합 도메인 또는 소분자 결합 도메인을 포함하지 않는다.

[0793] CAR 및/또는 림프증식성 요소를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드(들)와 같은 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 용기에, 예를 들어, 0.1ml 내지 10ml의 용액으로 포함될 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로-순수한 GMP 등급의 재조합 벡터(예를 들어, 복제 불능 레트로바이러스 입자)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드는 재조합 네이키드 DNA 벡터를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드는 1×10^6 내지 5×10^9 , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^6 내지 1×10^8 , 1×10^6 내지 5×10^7 , 1×10^6 내지 5×10^6 또는 5×10^7 내지 1×10^8 의 레트로바이러스 형질도입 단위(TU) 또는 TU/ml, 또는 적어도 100, 1,000, 2,000 또는 2,500 TU/ng p24를 갖는 복제 불능 레트로바이러스 입자의 용기이다.

[0794] 혈액을 수집하는 단계를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서, 수집되는 혈액 부피는, 예를 들어, 5ml 내지 250ml일 수 있다. 더 많은 부피 및 범위는 본 명세서의 다른 곳에서 제공된다. 일부 실시형태에서, 수집되는 혈액이 필터, 예시적인 실시형태에서, 백혈구감소 필터를 사용하여 처리될 때, 필터에 적용되는 혈액 샘플의 부피는 120ml, 100ml, 75ml, 50ml, 40ml, 30ml, 25ml, 20ml, 15ml, 10ml 또는 5ml 이하이다. 예시적인 실시형태에서, 필터에 적용되는 혈액 샘플의 부피는 10ml, 9ml, 8ml, 7ml, 6ml, 5ml, 4ml, 3ml, 2ml 또는 1ml 이하이다.

[0795] 일부 실시형태에서, 수집된 혈액을 분획하기 위해 백혈구감소 필터가 사용될 때, 필터의 공극 직경은 10 μ m, 7.5 μ m, 5 μ m, 4 μ m 또는 3 μ m 이하 또는 0.5 μ m 내지 4 μ m이다. 일부 실시형태에서, 백혈구감소 필터 어셈블리는 혈액 샘플 내 백혈구의 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9% 또는 99.99%를 수집 및/또는 보유할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 백혈구감소 필터 어셈블리는 혈액 샘플 내 백혈구의 99%, 99.9% 또는 99.99%를 수집할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비-백혈구 세포의 적어도 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 또는 75% 내지 99.99%, 80% 내지 99.99%, 85% 내지 99.99%, 90% 내지 99.99% 또는 95% 내지 99.99%가 필터를 통과하고, 수집되지 않는다.

[0796] 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서, 조합된 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 단계는 14시간, 12시간 또는 10시간 이하 동안, 또는 예시적인 실시형태에서, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간 또는 1시간 이하 동안, 또는 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서, 8시간 미만, 6시간 미만, 4시간 미만, 2시간 미만, 1시간 미만, 30분 미만 또는 15분 미만 동안 수행될 수 있지만(또는 발생할 수 있음), 각 경우에 레트로바이러스 입자와 세포가 형질도입 반응 혼합물에서 현탁액 상태로 접촉되는 적어도 초기 접촉 단계가 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 15분 내지 12시간, 15분 내지 10시간, 15분 내지 8시간, 15분 내지 6시간, 15분 내지 4시간, 15분 내지 2시간, 15분 내지 1시간, 15분 내지 45분 또는 15분 내지 30분 동안 인큐베이션될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 30분 내지 12시간, 30분 내지 10시간, 30분 내지 8시간, 30분 내지 6시간, 30분 내지 4시간, 30분 내지 2시간, 30분 내지 1시간 또는 30분 내지 45분 동안 인큐베이션될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 1시간 내지 12시간, 1시간 내지 8시간, 1시간 내지 4시간 또는 1시간 내지 2시간 동안 인큐베이션될 수 있다. 또 다른 예시적인 실시형태에서, 접촉은 반응 혼합물에서 임의의 추가의 인큐베이션 없이 단지 초기 접촉

단계(레트로바이러스 입자를 포함하지 않는 현탁액 및 현탁액 중 세포를 포함하는 반응 혼합물에서의 임의의 추가의 인큐베이션 없음) 사이 또는 반응 혼합물에서 5분, 10분, 15분, 30분 또는 1시간 인큐베이션 동안 수행된다. 소정의 실시형태에서, 접촉은 범위의 하한에서 30초 또는 1분, 2분, 5분, 10분, 15분, 30분 또는 45분 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 사이 및 범위의 상한에서 10분, 15분, 30분 또는 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간 및 72시간 사이 동안 수행될 수 있다(또는 발생할 수 있음). 예시적인 실시형태에서, 접촉은 범위의 하한에서 30초 또는 1분, 2분, 5분, 10분, 15분, 30분 또는 45분 또는 1시간 사이 및 범위의 상한에서 2시간, 4시간, 6시간 및 8시간 사이 동안만 수행될 수 있다(또는 발생할 수 있음). 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 씻어내는 데 걸리는 시간만큼 접촉 시간이 수행되도록 변형, 유전적으로 변형 및/또는 형질도입될 세포(들)에 첨가한 후 즉시 세척될 수 있다. 따라서, 전형적으로, 접촉은 레트로바이러스 입자(들) 및 세포(들)가 형질도입 반응 혼합물에 현탁액 상태로 접촉되는 적어도 초기 접촉 단계를 포함한다. 이러한 방법은 사전 활성화 없이 수행될 수 있다.

[0797] 본 명세서에 제공된 방법의 예시적인 실시형태에서, 선택적 인큐베이션이 포함된 접촉 단계는 본 명세서에서 보다 상세하게 제공되는 바와 같이 32℃ 내지 42℃, 예컨대, 37℃의 온도에서 수행된다. 다른 예시적인 실시형태에서, 선택적 인큐베이션이 포함된 접촉 단계는 1℃ 내지 25℃, 2℃ 내지 20℃, 2℃ 내지 15℃, 2℃ 내지 6℃ 또는 3℃ 내지 6℃와 같은 37℃보다 낮은 온도에서 수행된다. 이러한 온도에서 접촉 단계와 관련된 선택적 인큐베이션은 본 명세서에서 논의된 임의의 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 이러한 온도와 관련된 선택적 인큐베이션은 1시간 이하 동안, 예컨대, 0분 내지 55분(즉, 55분 이하), 0분 내지 45분(즉, 45분 이하), 0분 내지 30분(즉, 30분 이하), 0분 내지 15분(즉, 15분 이하), 0분 내지 10분(즉, 10분 이하), 0분 내지 5분(즉, 5분 이하), 5분 내지 30분, 5분 내지 15분 또는 10분 내지 30분 동안 수행된다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 냉간 접촉 및 인큐베이션은 2℃ 내지 15℃의 온도에서 0분 내지 55분, 0분 내지 45분, 0분 내지 30분, 0분 내지 15분, 0분 내지 10분, 0분 내지 5분, 5분 내지 15분 또는 10분 내지 30분 동안 수행된다. 다른 추가의 예시적인 실시형태에서, 냉간 접촉 및 인큐베이션은 1℃ 내지 25℃, 2℃ 내지 20℃, 2℃ 내지 15℃, 2℃ 내지 6℃ 또는 3℃ 내지 6℃의 온도에서 5분 내지 30분 동안 수행된다.

[0798] 바로 위에 제공된 더 낮은 온도에서의 접촉 단계를 포함하는 소정의 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 전형적으로 재조합 벡터, 예시적인 실시형태에서 레트로바이러스 입자를 포함하는 용액에 선택적 세척 단계 후에 세포를 현탁시킴으로써 수행된다. 예시적인 실시형태에서, 2차 인큐베이션은 32℃ 내지 42℃, 예컨대, 37℃의 온도에서 수행된다. 선택적 2차 인큐베이션은 본 명세서에서 논의된 임의의 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 선택적 2차 인큐베이션은 6시간 이하 동안, 예컨대, 1시간 내지 6시간, 1시간 내지 5시간, 1시간 내지 4시간, 1시간 내지 3시간, 1시간 내지 2시간, 2시간 내지 4시간, 30분 내지 4시간, 10분 내지 4시간, 5분 내지 4시간, 5분 내지 1시간, 1분 내지 5분 또는 5분 미만 동안 수행된다. 따라서, 일부 예시적인 실시형태에서, 선택적으로 T 세포 및/또는 NK 세포 활성화 요소는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 표면에 있고, 접촉은 선택적으로 TNC가 32℃ 내지 42℃에서 5분 내지 8시간 동안 또는 예시적인 실시형태에서, 5분 내지 4시간 동안 인큐베이션 후, 그리고 선택적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 필터에서 수집되어 세포 제형을 형성한 후, 2℃ 내지 15℃ 및 선택적으로 2℃ 내지 6℃에서 1시간 미만 동안 수행된다.

[0799] 일부 실시형태에서, 혈액, TNC 또는 PBMC가 예시적인 실시형태에서 복제 불능 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터와 접촉되는 시간과 변형된 세포가 현탁되어 전달 용액에 제형화되고 세포 제형을 형성하는 시간 사이에 16시간, 14시간, 12시간, 8시간, 4시간, 2시간 또는 1시간, 또는 범위의 하한에서 5분, 10분, 15분, 30분, 45분 또는 60분 사이 및 범위의 상한에서 1.5시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간 및 16시간 사이, 예를 들어, 5분 내지 16시간, 5분 내지 12시간, 5분 내지 8시간, 5분 내지 6시간, 5분 내지 4시간, 5분 내지 3시간, 5분 내지 2시간 또는 5분 내지 1시간을 경과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포가 복제 불능 레트로바이러스 입자와 접촉되는 시간과 변형된 세포가 전달 용액에 제형화되는 시간 사이의 시간은 1시간 내지 16시간, 1시간 내지 14시간, 1시간 내지 12시간, 1시간 내지 8시간, 1시간 내지 6시간, 1시간 내지 4시간 또는 1시간 내지 2시간 사이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체로부터 혈액이 수집되는 시간과 변형된 림프구가 대상체에 재도입되는 시간 사이에 16시간, 14시간, 12시간, 8시간, 4시간, 2시간 또는 1시간이 경과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 혈액이 대상체로부터 수집되는 시간과 변형된 림프구가 대상체에게 재도입되는 시간 사이의 시간은 1시간 내지 16시간, 1시간 내지 14시간, 1시간 내지 12시간, 1시간 내지 8시간, 1시간 내지 6시간, 1시간 내지 4시간 또는 1시간 내지 2시간일 수 있다.

[0800] 본 명세서의 임의의 관련 양태의 일부 실시형태에서, T 세포 및 NK 세포의 일부 또는 전부는 재조합 핵산을 아

직 발현하지 않거나, 또는 사용되기 전에 재조합 핵산을 세포의 게놈에 아직 통합하지 않았거나, 또는 대상체에게 다시 도입 또는 재도입되는 것 또는 세포 제형을 제조하는데 사용되기 전 또는 사용되는 시점을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 본 명세서에 제공된 임의의 방법 또는 조성물에 포함된다. 일부 실시형태에서, 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 CAR 또는 전위효소를 발현하지 않고/않거나 변형된 림프구가 대상체에게 다시 도입 또는 재도입, 예시적인 실시형태에서, 대상체에게 피하로 또는 근육내로 다시 도입 또는 재도입될 때 또는 세포 제형을 제조하는데 사용될 때 세포막과 회합된 CAR을 갖지 않는다. 다른 실시형태에서, 세포 제형이 본 명세서에 제공되되, 세포 제형 내 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부가 재조합 바이러스 역전사효소 및/또는 인테그레이스를 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 CAR을 발현하지 않고/않거나 변형된 림프구가 대상체에게 다시 도입 또는 재도입, 예시적인 실시형태에서, 대상체에게 피하로 또는 근육내로 다시 도입 또는 재도입될 때 또는 세포 제형을 제조하는데 사용될 때 세포막과 회합된 CAR을 갖지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 25%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 림프구가 대상체에게 도입 또는 재도입, 예시적인 실시형태에서, 대상체에게 피하로 또는 근육내로 다시 도입 또는 재도입될 때 또는 세포 제형을 제조하는데 사용될 때 재조합 mRNA(예를 들어, CAR을 암호화함)를 발현하지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 내 세포, NK 세포 및/또는 T 세포의 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 또는 90% 초과가 생존 가능하다.

[0801]

일부 실시형태에서, 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 림프구가 대상체에게 도입 또는 재도입, 예시적인 실시형태에서, 대상체에게 피하로 또는 근육내로 다시 도입 또는 재도입될 때 또는 세포 제형을 제조하는데 사용될 때 게놈에 안정적으로 통합된 재조합 핵산을 갖지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 T 세포 및 NK 세포의 적어도 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 림프구가 대상체에게 도입 또는 재도입, 예시적인 실시형태에서, 대상체에게 피하로 또는 근육내로 다시 도입 또는 재도입될 때 또는 세포 제형을 제조하는데 사용될 때 게놈에 안정적으로 통합된 재조합 핵산을 갖지 않는다. 변형된, 유전적으로 변형된, 형질도입된 및/또는 안정적으로 형질감염된 림프구를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 림프구가 대상체에게 다시 도입 또는 재도입, 예시적인 실시형태에서, 대상체에게 피하로 또는 근육내로 도입 또는 재도입될 때 또는 세포 제형이 제조될 때, 임의의 백분율의 림프구가 변형, 유전적으로 변형, 형질도입 및/또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. 일부 실시형태에서, 림프구의 적어도 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 변형된다. 예시적인 실시형태에서, 범위의 하한에서 림프구의 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이가 변형되고, 범위의 상한에서 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 및 95%가 변형된다. 일부 실시형태에서, 변형된 림프구의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 림프구의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 일부 실시형태에서, 범위의 하한에서 변형된 림프구의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이는 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않고, 범위의 상한(예를 들어, 10% 내지 95%)에서 변형된 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 또는 전부는 유전적으로 변형, 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 재조합 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 림프구는 염색체외 재조합 핵산을 갖거나 또는 게놈에 통합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 염색체외 재조합 핵산을 갖는다. 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 염색체외 재조합 핵산을 갖는다. 일부 실시형태에서, 범위의 하한에서 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이는 염색체외 재조합 핵산을 갖고, 범위의 상한(예를 들어, 10% 내지 95%)에서 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및

99% 또는 전부는 염색체의 재조합 핵산을 갖는다. 일부 실시형태에서, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 전부는 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다. 일부 실시형태에서, 범위의 하한에서 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% 및 70% 사이는 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되고, 범위의 상한에서 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99% 또는 전부는 형질도입 또는 안정적으로 형질감염되지 않는다.

[0802] 세포 제형의 피하 또는 근육내 전달을 포함하는 본 명세서에 개시된 소정의 실시형태에서, 세포는 피하로 전달될 때와 비교하여 정맥내로 전달되는 경우 더 적은 수의 변형된 또는 유전적으로 변형된 림프구가 생략될 수 있도록 피하 또는 근육내 전달에 대해 양립할 수 있고, 이에 효과적이고/이거나 이에 적합화된 방식으로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 피하로 또는 근육내로 전달될 때와 비교하여 정맥내로 전달되는 경우 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 더 적은 림프구가 생략한다. 일부 실시형태에서, 용액은 적어도 2개의 비변형된 림프구, 변형된 림프구 및 유전적으로 변형된 림프구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용액은 변형된 림프구보다 비변형된 림프구를 더 많이 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된, 유전적으로 변형된, 형질도입된 그리고/또는 안정적으로 형질감염된 T 세포 및 NK 세포의 백분율은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15% 또는 적어도 20%이다. 본 명세서의 실시예에 예시된 바와 같이, 전혈에서 림프구를 형질도입시키기 위한 본 명세서에 제공된 예시적인 방법에서, 림프구의 1% 내지 20% 또는 1% 내지 15% 또는 5% 내지 15% 또는 7% 내지 12% 또는 약 10%는 유전적으로 변형되고/되거나 형질도입된다. 일부 실시형태에서, 림프구는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉되지 않고, 변형되지 않는다. 예시적인 실시형태에서, 림프구는 종양 침윤 림프구이다.

[0803] 세포 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 세포 혼합물 내 임의의 세포는 농축될 수 있다. 예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포의 하나 이상의 세포 집단과 같은 입양 세포 요법에 유용한 세포는 전달을 위해 제형화되기 전에 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은 세포 혼합물이 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉된 후에 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단을 농축하는 것은 본 명세서에 개시된 유전적 변형, 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자를 이용한 유전적 변형의 임의의 방법과 동시에 수행될 수 있다.

[0804] 단핵 세포(예컨대, PBMC) 또는 TNC를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 단핵 세포 또는 TNC는 각각 밀도-구배 원심분리 또는 백혈구감소 필터 어셈블리의 역관류에 의해 전혈과 같은 보다 복잡한 세포 혼합물로부터 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 미경험, 효과기, 기억, 억제 T-세포 및/또는 조절 T 세포를 포함하는 NK 세포, T 세포 및/또는 T 세포 서브세트와 같은 특정 세포 계통은 하나 이상의 표면 분자를 발현하는 세포의 선택을 통해 농축될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 하나 이상의 표면 분자는 CD4, CD8, CD16, CD25, CD27, CD28, CD44, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CCR7, KIRs, FoxP3 및/또는 TCR 성분, 예컨대, CD3을 포함할 수 있다. 하나 이상의 표면 분자에 대한 항체에 접합된 비드를 사용하는 방법이 자기, 밀도 및 크기-기반 분리를 사용하여 목적하는 세포를 풍부하게 하는데 사용될 수 있다. 이러한 항체-기반 양성 선택 방법의 과정에서, 하나 이상의 세포 표면 분자의 결합은 결합 세포의 생물학의 신호 전달 및 변경을 초래할 수 있다. 예를 들어, CD3에 대한 항체가 부착된 비드를 사용한 T 세포의 선택은 CD3 신호 전달 및 T 세포 활성화로 이어질 수 있다. 다른 예에서, 결합 및 신호 전달은 미경험 또는 기억 T 세포와 같은 세포의 추가 세포 분화로 이어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 양성 선택은 목적하는 세포가 접촉되지 않고 오히려 그대로 유지되는 것이 바람직한 경우와 같이 목적하는 세포를 풍부하게 하는데 사용되지 않는다. 이 단락의 실시형태에 제공되는 양성 선택을 위한 임의의 이러한 방법은 접촉 단계 전, 동안 또는 후에 수행될 수 있다.

[0805] 세포 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 하나 이상의 원치 않는 세포 집단이 고갈되어 세포 혼합물에서 목적하는 세포가 농축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉되기 전에 음성 선택에 의해 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단은 세포 혼합물이 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터와 접촉된 후 음성 선택에 의해 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 세포 집단을 고갈시키는 것은 본 명세서에 개시된 유전적 변형, 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자를 이용한 유전적 변형의 임의의 방법 전에 또는 이와 동시에 수행될 수 있다.

- [0806] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 암세포를 포함한다. 많은 유형의 암으로부터의 암세포가 혈액에 들어갈 수 있으며, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 림프구와 함께 낮은 빈도로 의도하지 않게 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 암세포는 신세포 암종, 위암, 육종, 유방암, B 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 B-세포 림프종(B-NHL), 신경아세포종, 신경교종, 교아종, 수모세포종, 결장직장암, 난소암, 전립선암, 중피종, 폐암(예를 들어, 소세포 폐암), 흑색종, 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병 또는 만성 골수성 백혈병을 포함하지만 이들로 제한되지 않은 임의의 암으로부터 유래될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, CAR-암세포는 B-세포 림프종으로부터 유래될 수 있다.
- [0807] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 단핵구를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단핵구는 세포 혼합물을 표준 플라스틱 조직 배양 플라스틱, 나일론 또는 유리솜 또는 세파텍스 수지와 같은 고정된 단핵구-결합 기질과 함께 인큐베이션함으로써 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 37°C에서 적어도 1시간 동안 수행되거나 또는 세포 혼합물을 수지에 통과시킴으로써 수행될 수 있다. 인큐베이션 후, 현탁액 내 목적하는 비-부착 세포는 추가 처리를 위해 수집될 수 있다. 본 명세서에 제공된 림프구의 신속한 생체외 처리의 예시적인 실시형태에서, 전혈, TNC 또는 PBMC는 고정된 단핵구-결합 기질과 인큐베이션 되지 않는다.
- [0808] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 하나 이상의 표면 분자를 발현하는 세포의 음성 선택에 의해 고갈될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 표면 분자는 종양-관련 항원, 종양-특이적 항원이거나, 또는 그렇지 않으면 암세포에서 발현된다. 예시적인 실시형태에서, 표면 분자는 Ax1, ROR1, ROR2, Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), PSMA(전립선-특이적 막 항원), B 세포 성숙 항원(BCMA), 알파-태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), 암 항원-125(CA-125), CA19-9, MUC-1, 상피 막 단백질(EMA), 상피 종양 항원(ETA), CD34, CD45, CD99, CD117, 태반 알칼리 포스파테이스, 사이로글로불린, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2(강글리오사이드 G2), EphA2, CSPG4, CD138, FAP(섬유아세포 활성화 단백질), CD171, 카파, 람다, 5T4, $\alpha\text{v}\beta 6$ 인테그린, 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 3$ (CD61), 갈락틴, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD20, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, EGFR, EGP2, EGP40, EpCAM, 태아 AchR, FR α , GD3, IL-11R α , IL-13R $\alpha 2$, 루이스-Y, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, TAG72, TEM, VEGFR2, EGFRvIII(표피 성장 인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파테이스), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 감마 대체 리딩 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선의 6개-막관통 상피 항원)을 포함할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 표면 분자는 CD19, CD20, CD22, CD25, CD32, CD34, CD38, CD123, BCMA 또는 TIM3과 같은 혈액 암 항원이다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 비드에 의해 전혈, PBMC 또는 TNC와 같은 세포 혼합물로부터 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 칼럼-기반 분리에 의해 고갈될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 세포 표면 분자에 결합하는 리간드 또는 항체는 비드 또는 칼럼에 부착된다. 일부 실시형태에서, 비드에 부착된 항체는 CAR과 동일한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드에 부착된 항체는 환자에서 발현될 CAR과 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 비드에 부착된 항체는 CAR과 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 원치 않는 세포의 표면 상의 항원에 결합하는 하나 이상의 부착된 항체를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 서로 다른 항체가 부착된 비드가 조합하여 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 자성 비드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 세포 혼합물을 부착된 항체가 있는 자성 비드와 인큐베이션한 후 자성 분리에 의해 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 자성이 아니다.
- [0809] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 표면 분자를 발현하는 원치 않는 세포는 항체 코팅된 비드에 의해 전혈, PBMC 또는 TNC와 같은 세포 혼합물로부터 고갈되고, 크기 별로 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비드는 폴리스타이렌이다. 예시적인 실시형태에서, 비드는 직경이 적어도 약 30 μm , 약 35 μm , 약 40 μm , 약 50 μm , 약 60 μm , 약 70 μm 또는 약 80 μm 이다. 일부 실시형태에서, 항체 코팅된 비드는 예시적인 실시형태에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터가 세포 혼합물과 함께 인큐베이션되는 시간 동안 세포 혼합물에 첨가된다. 이러한 실시형태에서, 다음을 포함하는 반응 혼합물이 형성된다: (A) 전혈, 농축된 TNC 또는 단리된 PBMC와 같은 세포 혼합물; (B) CAR과 같은 관심 이식 유전자를 암호화하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터; 및 (C) 원치 않는 세포의 표면에서 발현된 하나 이상의 표면 분자 또는 항원에 결합하는 항체 코팅된 비드. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 또는 45분 미만, 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 미만 동안 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 후, 밀도-구배 원심분리-기반 세포 농축 절차는 항체 코팅된 비드에 복합체화된 원치 않는 세포가 고갈된 총 단핵 세포를 풍부하게 하기 위해 수행될 수 있다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 항체 코팅된 비드에 복합체화된 원치 않는 세포를 고갈시키기 위해 필터에 통과될 수 있다. 일부 실시형태에서, 필터는 비드의 직경보다 약 5 μm , 10 μm 또는 15 μm 더 작은 공극 직경을

가질 수 있다. 이러한 필터는 비드에 결합된 원치 않는 세포를 포획하고, 목적하는 세포가 하류를 통해 더 작은 공극 직경을 갖는 백혈구감소 필터 어셈블리로 흐르게 할 수 있다.

- [0810] 일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 적혈구 항체 로세팅(EA-로세팅)에 의해 전혈과 같은 림프구 및 적혈구를 포함하는 세포 혼합물로부터 고갈될 수 있다. 일부 실시형태에서, EA-로세팅을 매개하는 항체는 예시적인 실시형태에서 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자인 재조합 핵산 벡터가 세포 혼합물과 인큐베이션되는 시간 동안 세포 혼합물에 첨가된다. 예시적인 실시형태에서, 다음을 포함하는 반응 혼합물이 형성된다: (A) 전혈과 같은 림프구 및 적혈구의 세포 혼합물; (B) 관심 이식 유전자 및 추가의 예시적인 실시형태에서, CAR을 암호화하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 같은 재조합 핵산 벡터; (C) 원치 않는 세포, 예를 들어, 혈액 압항원 CD19, CD20, CD22, CD25, CD32, CD34, CD38, CD123, BCMA 또는 TIM3과 같은 종양 항원의 표면 상의 항원에 대한 제1 항체; (D) 글리코포린 A와 같은 적혈구의 표면 상의 항원에 대한 제2 항원; 및 (E) 제1 및 제2 항체를 가교하는 제3 항체. 추가의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 원치 않는 세포의 표면 상의 하나 이상의 항원에 대한 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항체는 CAR과 동일한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 반응 혼합물은 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분 또는 45분 미만, 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간 또는 8시간 미만 동안 인큐베이션된다. 예시적인 실시형태에서, 인큐베이션 후, 밀도-구배 원심분리-기반 PBMC 농축 절차는 EA-로세팅에 의해 고갈 또는 제거된 집단을 뺀 총 PBMC를 분리하기 위해 수행된다. 예시적인 실시형태에서, 인큐베이션 후, 밀도-구배 원심분리-기반 PBMC 농축 절차는 적혈구와 함께 펠릿이 될 EA-로세팅에 의해 고갈 또는 제거된 집단을 뺀 총 PBMC를 분리하기 위해 수행된다.
- [0811] 혈액 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 반응 혼합물 내 백혈구의 백분율로서 적어도 10%의 호중구와 적어도 0.5%의 호산구를 포함한다.
- [0812] 반응 혼합물 및/또는 세포 제형을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 및/또는 세포 제형은 반응 혼합물 또는 세포 제형 내 세포의 백분율로서 적어도 5%, 10%, 20%, 25%, 30% 또는 40%의 호중구 또는 반응 혼합물 또는 세포 제형 내 백혈구의 백분율로서 20% 내지 80%, 25% 내지 75% 또는 40% 내지 60%의 호중구를 포함한다.
- [0813] 반응 혼합물 및/또는 세포 제형을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 및/또는 세포 제형은 반응 혼합물 또는 세포 제형 내 백혈구의 백분율로서 적어도 0.1%의 호산구 또는 0.25% 내지 8%의 호산구 또는 0.5% 내지 4%의 호산구를 포함한다.
- [0814] 혈액 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 접촉 전에 PBMC 농축 절차를 거치지 않는다.
- [0815] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 재조합 레트로바이러스 입자를 전혈에 첨가함으로써 형성된다.
- [0816] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 재조합 레트로바이러스 입자를 유효량의 항응고제를 포함하는 실질적으로 전혈에 첨가함으로써 형성된다.
- [0817] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 폐쇄형 세포 처리 시스템에 있다. 이러한 반응 혼합물, 용도, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포, 또는 T 세포 및/또는 NK 세포를 변형 및/또는 유전적으로 변형시키는 방법의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 PBMC이고, 반응 혼합물은 폐쇄형 세포 처리 시스템에서 백혈구감소 필터 어셈블리, 선택적인 추가의 실시형태에서, HemaTrate 필터 또는 Acrodisc 필터를 포함하는 백혈구감소 필터 어셈블리와 접촉한다. 일 양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자 및 Hematrater 필터 또는 Acrodisc 필터를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또 다른 양태에서, 일부 실시형태에서, HemaTrate 필터에 적용되는 혈액 샘플의 부피는 120ml, 100ml, 75ml, 50ml, 40ml, 30ml, 25ml, 20ml, 15ml, 10ml 또는 5ml 이하이다. 일부 실시형태에서, 혈액 샘플은 Acrodisc 필터를 포함하는 백혈구감소 필터 어셈블리에 적용된다. 일부 실시형태에서, Acrodisc 필터에 적용되는 혈액 샘플의 부피는 15ml, 14ml, 13ml, 12ml, 11ml, 10ml, 9ml, 8ml, 7ml, 6ml, 5ml, 4ml, 3ml, 2ml 또는 1ml 이하이다.
- [0818] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 항응고제를 포함한다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 항응고제는 산 시트레이트 텍스트로스, EDTA 또는 헤파린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서, 항응고제는 산 시트레이트 텍스트로스가 아니다. 소정의 실시형태에서,

항응고제는 유효량의 헤파린을 포함한다.

- [0819] 반응 혼합물을 포함하는 임의의 본 명세서의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 접촉하는 동안 혈액 배에 있다.
- [0820] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 접촉 전에 폐쇄형 세포 처리 시스템에서 T 림프구 및/또는 NK 세포-농축 필터와 접촉하되, 반응 혼합물은 과립구를 포함하고, 과립구는 반응 혼합물 내 백혈구의 적어도 10%를 포함하거나 또는 반응 혼합물은 T 세포만큼 많은 과립구를 적어도 10% 포함하고, 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 림프구(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)는 접촉 후 PBMC 농축 과정을 거친다.
- [0821] 반응 혼합물에 혈액 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 PBMC이고, 반응 혼합물은 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 후 폐쇄형 세포 처리 시스템에서 백혈구감소 필터 어셈블리와 접촉한다.
- [0822] 미분획 전혈을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 미분획 전혈은 제대혈이 아니다.
- [0823] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 접촉 전, 제조함 레트로바이러스 입자 및 혈액 세포가 접촉될 때, 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 동안 및/또는 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 후 폐쇄형 세포 처리 시스템에서 백혈구감소 필터 어셈블리와 접촉하고 있되, T 세포 및/또는 NK 세포, 또는 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 추가로 PBMC 농축 절차를 거친다.
- [0824] 방법이거나 또는 이를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 방법은 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 피하로 투여하는 단계를 더 포함한다. 선택적으로 이러한 소정의 실시형태에서, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 호중구를 더 포함하는 세포 제형에 전달된다. 또한, 선택적으로 이러한 소정의 실시형태, 호중구는 안전한 정맥내 전달을 위해 너무 높은 농도로 세포 제형에 존재하고/하거나 세포 제형은 10%의 호중구를 포함한다.
- [0825] 방법을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 방법은 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 하이알루로니데이스의 존재하에 대상체에게 피하로 투여하는 단계를 더 포함한다. 추가의 예시적인 하위 실시형태에서, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포가 대상체로부터 얻어졌다.
- [0826] 변형된 및 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 하이알루로니데이스의 존재하에 대상체 피하로 투여하는 단계를 포함하는 이러한 실시형태의 추가의 하위 실시형태에서, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 1ml 내지 5ml의 부피로 대상체에게 피하로 전달된다. 추가의 하위 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포는 대상체로부터 채취한 혈액에 있고, 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 추가의 실시형태에서, 1시간 내지 14시간, 1시간 내지 8시간, 1시간 내지 6시간, 1시간 내지 4시간, 1시간 내지 2시간 이내에 또는 대상체로부터 혈액을 채취한 후 1시간 이내에 대상체에게 다시 전달된다.
- [0827] 반응 혼합물을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 접촉 전, 제조함 레트로바이러스 입자 및 혈액 세포가 접촉될 때, 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 동안 및/또는 반응 혼합물에서의 선택적 인큐베이션을 포함하는 접촉 후 폐쇄형 세포 처리 시스템에서 백혈구감소 필터 어셈블리와 접촉하고 있다.
- [0828] 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자와 결합하여 반응 혼합물을 형성할 때 T 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%는 휴지기 T 세포이거나, 또는 NK 세포의 대부분은 휴지기 NK 세포이다.
- [0829] 변형 세포를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 세포 또는 세포들은 원심집중 절차를 거치지 않고, 예를 들어, 적어도 30분 동안 적어도 800g의 원심집중을 거치지 않는다.
- [0830] 방법을 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, 방법은 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하되, 선택적으로 대상체는 혈액 세포의 공급원이다. 이 예시적인 실시형태 부분의 것들을 포함하는 본 명세서의 임의의 방법 및 용도의 이들 및 실시형태의 일부 하위 실시형태에서, 변형된, 유전적으로 변형된 그리고/또는 형질도입된 림프구(예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포) 또는 이의 집단과 양립할 수 없거나 또는 이미 명시되어 있지 않다면, 대상체에게 도입 또는 재도입되기 전에 생체외에서 4회 이하의 세포 분열을 겪는다. 일부 실시형태에서, 대상체로부터 혈액이 수집된 시간과 변형된 림프구가 대상

체에게 재도입되는 시간 사이에 8시간, 6시간, 4시간, 2시간 또는 1시간을 경과하지 않는다. 일부 실시형태에서, 혈액이 수집된 후와 혈액이 재도입되기 전의 모든 단계는 폐쇄형 시스템에서 수행되며, 선택적으로 사람이 처리 전반에 걸쳐 폐쇄형 시스템을 모니터링한다. 일부 실시형태에서, 용액 내 변형된 림프구의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 표면에 슈도타이핑 요소 또는 T 세포 활성화 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 항체는, 예를 들어, T 세포 수용체를 통해 변형된 림프구의 표면에 결합될 수 있고/있거나 슈도타이핑 요소 및/또는 T 세포 활성화 항체는 변형된 림프구의 원형질막에 존재할 수 있다.

[0831] 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자(들)는 표면에 막-결합 T 세포 활성화 요소를 포함한다. 이 예시적인 실시형태 부문에 있는 것들을 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태의 이들 및 실시형태의 일부 하위 실시형태에서, 양립할 수 없거나 또는 이미 명시되어 있지 않다면, T 세포 활성화 요소는 항-CD3 항체 또는 항-CD28 항체 중 하나 이상일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD3에 결합할 수 있는 막-결합 폴리펩타이드는 이중 GPI 앵커 부착 서열에 융합되고/되거나 CD28에 결합할 수 있는 막-결합 폴리펩타이드는 이중 GPI 앵커 부착 서열에 융합된다. 예시적인 실시형태에서, CD28에 결합할 수 있는 막-결합 폴리펩타이드는 CD16B GPI 앵커 부착 서열에 결합된 CD80 또는 이의 세포외 도메인이다. 일부 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 CD3에 결합할 수 있는 하나 이상의 폴리펩타이드를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포 활성화 요소는 막-결합 항-CD3 항체이되, 항-CD3 항체는 재조합 레트로바이러스 입자의 막에 결합된다. 일부 실시형태에서, 막-결합 항-CD3 항체는 항-CD3 scFv 또는 항-CD3 scFvFc이다. 일부 실시형태에서, 막-결합 항-CD3 항체는 이중 GPI 앵커에 의해 막에 결합된다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 바이러스 외피 단백질과의 재조합 융합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 항-CD3 항체는 MuLV로부터의 바이러스 외피 단백질과의 재조합 융합 단백질이다. 일부 실시형태에서, 항-CD3은 퓨린 절단 부위에서 돌연변이된 MuLV로부터의 바이러스 외피 단백질과의 재조합 융합 단백질이다.

[0832] 유전적 변형 및/또는 형질도입을 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, ABC 수송 저해제 및/또는 기질, 추가의 하위 실시형태에서 외인성 ABC 수송 저해제 및/또는 기질은 유전적 변형 및/또는 형질도입 전, 동안 또는 그 전과 동안에 존재하지 않는다.

[0833] 용기 및/또는 반응 혼합물 내에 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 재조합 레트로바이러스 입자는 0.1 내지 50, 0.5 내지 50, 0.5 내지 20, 0.5 내지 10, 1 내지 25, 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 5, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 7, 2 내지 3, 3 내지 10, 3 내지 15 또는 5 내지 15, 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 또는 15의 MOI로 용기 및/또는 반응 혼합물에 존재하거나 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 또는 15의 MOI로 반응 혼합물에 존재한다. 키트 및 단리된 레트로바이러스 입자 실시형태의 경우, 이러한 MOI는 1×10^6 표적 세포/ml을 가정하여, 예를 들어, 전혈의 경우, 1×10^6 PBMC/ml의 혈액을 가정하여 1ml, 2.5ml, 5ml, 10ml, 20ml, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml 또는 1,000ml를 기준으로 할 수 있다.

[0834] 접촉 세포와 레트로바이러스 입자를 접촉시키는 것을 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 0.1 내지 50, 0.5 내지 50, 0.5 내지 20, 0.5 내지 10, 1 내지 25, 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 5, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 7, 2 내지 3, 3 내지 10, 3 내지 15 또는 5 내지 15, 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 또는 15의 MOI를 달성하기 위해 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10 또는 15의 MOI를 달성하기 위해 충분한 레트로바이러스 입자가 반응물에 존재한다.

[0835] 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, T 세포 및/또는 NK 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15% 또는 적어도 20%, 또는 범위의 하한에서 5% 내지 85%, 또는 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 내지 범위의 상한에서 20%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 85%가 유전적으로 변형된다.

[0836] 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 변형된 세포는 변형된 T 세포 또는 변형된 NKT 세포이다.

[0837] 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 발명의 임의의 양태에서, 하나 이상의 전사 단위는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR은 미세환경 제한된 생물체제(MRB)-CAR이다. 다른 실시형태에서, CAR의 ASTR은 종양 관련 항원에 결합한다. 다른 실시형태에서, CAR의 ASTR은 미세환경-제한된 생물체제(MRB)-ASTR이다.

- [0838] 소정의 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성화인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 및 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 폴리펩타이드 림프증식성 요소를 암호화한다. 예시적인 실시형태에서, 폴리펩타이드 림프증식성 요소는 본 명세서에 개시된 임의의 폴리펩타이드 림프증식성 요소이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 핵산 서열 중 일부 또는 전부는 리보스위치에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 리보스위치는 뉴클레오시드 유사체에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오시드 유사체는 항바이러스 약물이다.
- [0839] 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 및 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 T 세포 및/또는 NK 세포에 결합할 수 있고, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자의 막 융합을 촉진할 수 있는 슈도타이핑 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 바이러스 외피 단백질이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 외피 단백질은 고양이 내인성 바이러스(RD114) 외피 단백질, 온코레트로바이러스 양쪽 숙주역 외피 단백질, 온코레트로바이러스 동종숙주역 외피 단백질, 수포성 구내염 바이러스 외피 단백질(VSV-G), 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질(BaEV), 무린 백혈병 외피 단백질(MuLV) 및/또는 파라믹소바이러스 홍역 외피 단백질 H 및 F, 투파이아 파라믹소바이러스(TPMV) 외피 단백질 H, TPMV 외피 단백질 F, 니파 바이러스(NiV) 외피 단백질 H, NiV 외피 단백질 G, 신드비스 바이러스(SINV) 단백질 E1, SINV 단백질 E2 또는 휴지기 T 세포 및/또는 휴지기 NK 세포에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 이의 단편 중 하나 이상이다. 예시적인 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 VSV-G이다. 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 슈도타이핑 요소는 T 세포 활성화 요소와의 융합을 포함할 수 있으며, 이는 예시적인 실시형태에서, 임의의 외피 단백질 슈도타이핑 요소, 예를 들어, MuLV 또는 VSV-G와 항-CD3 항체와의 융합할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 슈도타이핑 요소는 VSV-G 및 MuLV에 대한 항CD3scFv의 융합을 모두 포함한다.
- [0840] 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자를 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태에서, 일부 실시형태에서, 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자는 표면에 단일클론 항체 승인 생물체제에 의해 인식되는 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.
- [0841] 반응 혼합물에 혈액 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 소정의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 PBMC 농축 절차에 의해 생성되며 PBMC를 포함하는 혈액 세포거나 또는 예시적인 실시형태에서 혈액 세포는 PBMC이다. 예시적인 실시형태에서, PBMC 농축을 포함하는 이러한 실시형태는 반응 혼합물이 적어도 10%의 전혈을 포함하는 실시형태와 조합되지 않는다. 따라서, 본 발명의 소정의 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 반응 혼합물을 형성하기 위해 레트로바이러스 입자가 첨가된 PBMC 농축 절차로부터의 PBMC 세포 분획이고, 다른 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물 내 혈액 세포는 반응 혼합물을 형성하기 위해 레트로바이러스 입자가 첨가된 전혈로부터 유래한다.
- [0842] 저해성 RNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하거나 또는 선택적으로 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 및 실시형태에서, 저해성 RNA 분자는, 예를 들어, 본 명세서의 저해성 RNA 분자 부문에서 확인된 임의의 유전자(예를 들어, 이를 암호화하는 mRNA) 표적을 표적으로 하거나; 또는 소정의 실시형태에서, TCRa, TCRb, SOCS1, miR155 표적, IFN 감마, cCBL, TRAIL2, PP2A, ABCG1, cCBL, CD3z, CD3z, PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, SMAD2, TNFRSF10B, PPP2CA, TNFRSF6(FAS), BTLA, TIGIT, A2AR, AHR, EOMES, SMAD3, SMAD4, TGFB2, PPP2R2D, TNFSF6(FASL), CASP3, SOCS2, TIEG1, JunB, Cbx3, Tet2, HK2, SHP1, SHP2 또는 CSF2(GM-CSF)를 표적으로 하거나; 또는 소정의 실시형태에서, cCBL, CD3z, CD3z, PD1, CTLA4, TIM3, LAG3, SMAD2, TNFRSF10B, PPP2CA, TNFRSF6(FAS), BTLA, TIGIT, A2AR, AHR, EOMES, SMAD3, SMAD4, TGFB2, PPP2R2D, TNFSF6(FASL), CASP3, SOCS2, TIEG1, JunB, Cbx3, Tet2, HK2, SHP1 또는 SHP2를 표적으로 하거나; 또는 소정의 실시형태에서, TIM3, LAG3, TNFRSF10B, PPP2CA, TNFRSF6(FAS), BTLA, TIGIT, A2AR, AHR, EOMES, SMAD3, SMAD4, PPP2R2D, TNFSF6(FASL), CASP3, SOCS2, TIEG1, JunB, Cbx3, Tet2, HK2, SHP1 또는 SHP2를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하거나; 또는 소정의 예시적인 실시형태에서, FAS, AHR, CD3z, cCBL, Cbx, HK2, FASL, SMAD4 또는 EOMES를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하거나; 또는 소정의 예시적인 실시형태에서, FAS, AHR, Cbx3, HK2, FASL, SMAD4 또는 EOMES를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하거나; 또는 추가의 예시적인 실시형태에서, AHR, Cbx3, HK2, SMAD4 또는 EOMES를 암호화하는 mRNA를 표적으로 한다.
- [0843] 저해성 RNA 분자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하거나 또는 선택적으로 포함하는 본 명세서에 제공된 임의의 양태 및 실시형태에서, 이러한 저해성 RNA 분자는 소정의 실시형태에서 2개 이상, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 저해성 RNA 또는 본 명세서에서 확인된 표적화된 저해성 RNA(예를 들어, miRNA) 중 2개 이상, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개를 포함하거나; 또는 소정의 실시형태에서, 이러한 폴리뉴클

레오타이드는 FAS, cCBL, AHR, CD3z, Cbx, EOMES 또는 HK2를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하는 2개 이상, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 저해성 RNA(예를 들어, miRNA) 또는 이러한 mRNA를 표적으로 하는 하나 이상의 저해성 RNA의 조합을 포함하거나; 또는 소정의 추가의 예시적인 실시형태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드는 FAS, AHR, Cbx3, EOMES 또는 HK2를 암호화하는 mRNA를 표적으로 하는 2개 이상, 2개 내지 10개, 2개 내지 8개, 2개 내지 6개, 3개 내지 5개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 저해성 RNA(예를 들어, miRNA) 또는 이러한 mRNA를 표적으로 하는 하나 이상의 저해성 RNA의 조합을 포함한다. 저해성 RNA 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 본 명세서에 제공된 이러한 양태 및 실시형태는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터, 예를 들어, 단리된 세포 또는 복제 불능 레트로바이러스 입자와 같은 계능을 포함하는 복제 불능 레트로바이러스 입자 또는 양태에 대해 본 명세서에 제공된 양태 및 실시형태를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0844] 본 명세서에 제공된 임의의 키트, 전달 용액 및/또는 세포 제형, 특히 근육내 및 예시적인 실시형태에서, 피하 전달에 효과적이거나 또는 이에 적합화된 것들의 예시적인 실시형태에서, 전달 용액 및/또는 세포 제형은 데포 제형이거나 또는 세포 제형은 세포 응집을 촉진하는 세포의 에멀션이다. 일부 실시형태에서, 데포 전달 용액은 데포 제형을 형성하기 위해 유효량의 알기네이트, 하이드로겔, PLGA, 가교된 및/또는 중합체 하이알루론산, PEG, 콜라겐 및/또는 텍스트란을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 용액 및/또는 세포 제형은 제어 방출 또는 지연 방출을 위해 설계된다. 일부 실시형태에서, 전달 용액 및/또는 세포 제형은 하이드로겔과 같은 인공 세포 외 매트릭스를 형성하는 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 용액 및/또는 세포 제형은 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21과 같은 사이토카인의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포 제형 및/또는 전달 용액은 결합 CD3, CD28, OX40, 4-1BB, ICOS, CD9, CD53, CD63, CD81 및/또는 CD82에 결합할 수 있는 항체 또는 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 사이토카인, 항체 또는 폴리펩타이드는 하이드로겔의 성분 에 가교된다. 예시적인 실시형태에서, 전달 용액 및/또는 세포 제형은 DMSO가 포함되어 있으며 결코 냉동되지 않는다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 인간 대상체에게 근육내 또는 피하 전달하기 위해 양립할 수 있거나, 이에 적합화되거나 또는 이에 대해 작동하는 전달 장치 내에 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 장치는 본 명세서에 제공된 바와 같이 근육내 또는 피하로 세포를 전달하는데 효과적인 크기의 바늘을 갖는다.

[0845] 일부 실시형태에서, 세포 제형은 고갈 또는 실질적으로 고갈된, 또는 표적 항원을 발현하는 세포의 적어도 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 99%가 고갈된 혈액 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 항원은 CAR에 의해 인식되는 항원이다. 일부 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 제공된 임의의 고갈 방법을 사용하여 고갈된다.

[0846] 일부 실시형태에서, 세포 제형은 재조합 핵산 벡터, 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형된 제2 변형된 림프구 또는 이의 집단으로 제형화되되, 하나 이상의 전사 단위는 제1 CAR에 의해 인식되는 종양 항원의 상이한 에피토프를 인식하거나 또는 제1 CAR과 상이한 종양 항원을 인식하는 제2 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 암호화한다. 예시적인 실시형태에서, 변형된 림프구는 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함한다.

[0847] 일부 실시형태에서, 한 쌍의 세포 제형 또는 이러한 한 쌍의 세포 제형을 제조하기 위한 한 쌍의 재조합 핵산 벡터, 예시적인 실시형태에서, 복제 불능 레트로바이러스 입자의 용도가 본 명세서에 제공되되, 한 쌍의 세포 제형의 각 세포 제형은 변형된 림프구의 집단으로 제형화되고, 각 집단은 상이한 재조합 핵산 벡터, 예시적인 실시형태에서, 상이한 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되며, 각 집단은 T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 상이한 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되고, 각 집단에 대한 하나 이상의 전사 단위는 동일한 종양 항원의 상이한 에피토프를 인식하거나 또는 각각 상이한 종양 항원을 인식하는 상이한 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 상이한 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0848] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 전달 용액 및/또는 세포 제형은 본 명세서에 제공된 바와 같은 응집제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 전달 용액 및/또는 세포 제형은 하이알루론산 매트릭스 및/또는 콜라겐 매트릭스와 같은 세포 매트릭스를 포함한다. 이러한 세포 제형은 대상체 내에서 근육 또는 피하로 국제화된 생체의 세포 제형 또는 생체내 세포 제형일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 하이알루론산 및/또는 콜라겐 매트릭스는 피하로 국제화되며, 일부 실시형태에서, 이러한 매트릭스는 대상체에서 발견되는 천연 피하 매트릭스이다. 본 명세서에 제공된 바와 같은 종양 침윤 림프구 및/또는 변형된 림프구와 같은 외인성 림프구를 포함할 때 대상체에서 발견되거나 또는 피하로 국제화된, 선택적으로 본 명세서에 제공된 다른 세포 제형 성분을 포함하는 이러한 매트릭스는 인공 림프절로 간주될 수 있다. 이와 같이, 세포 제형이 응집제 및/또는 세포 매트릭스를 포함하

는 경우 세포 제형을 대상체에게 피하로 투여하기 위해 본 명세서에 제공된 방법은 인공 림프절을 형성하는 방법으로 지칭될 수 있다.

[0849]

일부 실시형태에서, 원치 않는 세포는 CAR 및 CAR이 결합하는 항원 모두를 발현하는 에피토프-차폐 표적 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 에피토프-차폐 표적 세포는 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 세포를 유전적으로 변형시킨 후 표적 세포가 본 명세서에 제공된 방법에서 차폐하지 않는 상이한 에피토프 또는 항원에 대한 CAR을 발현하는 CAR-T 세포와 접촉시킴으로써 고갈, 제거 또는 살해될 수 있다. 이러한 실시형태에서 이러한 제 1 CAR 및 제2 CAR은 CAR-쌍으로 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 별개의 CAR, 예시적인 실시형태에서, 2개의 세포 집단에서 발현된 2개의 CAR을 발현하는 세포는 에피토프 중 하나만을 차폐하는 에피토프-차폐 표적 세포를 죽이는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 2개의 세포 집단은 개별적으로 형질도입 또는 형질감염되어 각 집단은 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현한다. 예시적인 실시형태에서, 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현하는 에피토프-차폐 표적 세포는 제2 및 제1 CAR이 각각 결합하는 에피토프를 차폐하지 않는다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 에피토프-차폐 표적 세포에서 발현되는 동일한 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 항원을 포함하는 동일한 에피토프-차폐 표적 세포에서 발현되는 상이한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 CD19, CD22, CD25, CD32, CD34, CD38, CD123, BCMA 또는 TIM3의 상이한 에피토프 또는 이들로부터 선택되는 또는 상이한 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 동일한 표적 세포에서 발현되는 2개의 상이한 에피토프 또는 항원에 대한 CAR 쌍의 CAR 중 하나를 각각 암호화하는 별개의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 2개의 용기가 본 명세서의 키트에 제공된다. 다른 실시형태에서, 하나의 CAR은 암 항원에 결합하는 세포의 리간드 또는 수용체일 수 있고, 다른 하나는 항체 단편으로부터 유래되는 CAR일 수 있다. 다른 실시형태에서, 두 CAR은 상이한 암 항원에 대한 세포의 리간드 또는 수용체일 수 있다. 일례에서, CAR은 BCMA이고, April은 TACI 및 BCMA 수용체에 대한 리간드 결합 단백질이다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 제1 CAR은 CD19에 결합할 수 있고, 제2 CAR은 CD22에 결합할 수 있으며, 둘 다 B 세포 및 림프종에서 발현된다. 예시적인 실시형태에서, 제1 CAR을 발현하는 변형된 세포 집단 및 제2 CAR을 발현하는 변형된 세포 집단은 별도로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 별개의 세포 제형은 상이한 부위에서 대상체에게 다시 도입 또는 재도입된다. 일부 실시형태에서, 별개의 세포 제형은 동일한 부위에서 대상체에게 다시 별도로 도입 또는 재도입된다. 다른 실시형태에서, 변형된 세포 집단은 선택적으로 대상체에게 다시 도입 또는 재도입되는 하나의 제형으로 조합된다. 세포 집단이 조합되는 예시적인 실시형태에서, 세포 집단은 세포가 재조합 핵산 벡터로부터 세척되는 세척 단계 이후까지 조합되지 않는다.

[0850]

변형된 또는 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및 생존은 CAR의 ASTR이 결합하는 항원을 세포 제형과 같은 조성물 또는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 피하 환경 또는 근육내 환경과 같은 환경에 첨가함으로써 촉진될 수 있다. 소정의 예시적인 실시형태에서, 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포는 CAR을 암호화하는 핵산으로 유전적으로 변형되지만, 림프증식성 요소를 암호화하는 핵산으로 유전적으로 변형되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 항원은 본 명세서에 제공된 세포 제형 및 방법에서 변형된 그리고/또는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하거나 이와 함께 공동-투여되는 세포 제형에 첨가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 가용성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원은 하이드로겔과 같은 인공 매트릭스의 표면에 고정될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 항원은 표적 세포의 표면에 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 표적 세포는 전혈에 다량으로 존재하며, 첨가할 필요 없이 세포 제형에 자연적으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 전혈에 존재하는 B 세포, 단리된 TNC 및 세포 제형에 자연적으로 존재하는 단리된 PBMC는 둘 다 B 세포에서 발현되는 CD19 또는 CD22에 대해 지시된 T 세포 및/또는 NK CAR을 발현하는 세포에 대한 표적 세포일 수 있다. 다른 실시형태에서, 이러한 표적 세포는 전혈에 존재하지 않거나 또는 전혈에 다량으로 존재하지 않으며, 본 명세서에 제공된 세포 제형에 외인성으로 첨가될 필요가 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 종양 샘플과 같은 대상체로부터 단리 또는 농축될 수 있다. 다른 실시형태에서, 대상체로부터의 세포는 표적 항원을 발현하도록 변형된다. 예시적인 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 항원을 포함하는 단백질의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 항원을 포함하는 단백질의 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 이를 세포 표면에 고정하는 막관통 도메인과의 융합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 막관통 도메인이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 세포 상에서 발현된 항원은 줄기 도메인과의 융합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서의 다른 곳에 개시된 임의의 줄기 도메인이 사용될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 항원은 CD8

줄기 및 막관통 도메인(서열번호 24)과의 융합일 수 있다.

[0851] 일부 실시형태에서, 제1 세포 혼합물 내 세포, 예시적인 실시형태에서, 대상체로부터의 제1 세포 혼합물 내 세포는 항원을 암호화하는 재조합 핵산 벡터로 변형되고, 대상체로부터의 별개의 제2 세포 혼합물 내 세포, 예시적인 실시형태에서, 동일한 대상체로부터의 제2 혼합물 내 세포는 항원에 결합하는 CAR을 발현하도록 변형된다. 추가의 예시적인 실시형태에서, 세포 혼합물 중 하나 또는 둘 모두는 전혈, 단리된 TNC 또는 단리된 PBMC이다. 예시적인 실시형태에서, 제1 세포 혼합물은 Her2의 세포의 도메인과 PDGF의 막관통 도메인의 융합 단백질을 암호화하는 재조합 핵산 벡터로 변형될 수 있고, 제2 세포 혼합물은 HER2에 대해 지시된 CAR을 암호화하는 재조합 핵산 벡터로 변형될 수 있다. 그런 다음, 세포는 세포 제형을 형성하기 위해 전달 용액으로 제형화될 수 있다. 따라서, 일 양태에서, 한 쌍의 이러한 세포 혼합물 또는 한 쌍의 세포 제형이 본 명세서에 제공되며, 각각은 세포 혼합물 또는 세포 제형 중 하나를 포함하고, 전형적으로 세포 제형을 담기 위해 본 명세서에 제공된 세포 백과 같은 임의의 용기에 물리적으로 분리되어 있다. 선택적으로, 세포 제형은 다양한 CAR 효과기 세포-대-표적-세포 비로 대상체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 제형화 또는 투여 시점에서 효과기-대-표적 비는 약 10:1, 약 9:1, 약 8:1, 약 7:1, 약 6:1, 약 5:1, 약 4:1, 약 3:1, 약 2:1, 약 1:1, 약 1:2, 약 1:3, 약 1:5, 약 1:6, 약 1:7, 약 1:8, 약 1:9 또는 약 1:10이다. 예시적인 실시형태에서, 항원은 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포와 함께 피하로 또는 근육내로 공동-투여된다.

[0852] 변형된 또는 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 본 명세서의 임의의 양태의 일부 실시형태에서, CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포 및/또는 NK 세포의 증식 및 생존은 동종 항원에 결합하는 CAR 분자의 부재하에 유전적으로 변형된 T 세포 또는 NK 세포 내에서 CAR 분자를 가교함으로써 촉진될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, T 세포 또는 NK 세포는 항체에 의해 결합되고 동일한 T 세포 또는 NK 세포 상의 제2 CAR의 에피토프 태그에 가교된 에피토프 태그를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR의 세포의 도메인은 에피토프 태그를 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 에피토프 태그는 줄기 도메인에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 에피토프 태그는 His5(HHHHHH; 서열번호 76), HisX6(HHHHHH; 서열번호 77), c-myc(EQKLISEEDL; 서열번호 75), Flag(DYKDDDDK; 서열번호 74), Strep Tag(WSHPQFEK; 서열번호 78), HA Tag(YPYDVPDYA; 서열번호 73), RYIRS(서열번호 79), Phe-His-His-Thr(서열번호 80) 또는 WEAAAREACRECCARA(서열번호 81)일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 에피토프 태그는 HisX6 태그(서열번호 77)일 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR은 에피토프 태그에 결합하는 가용성 항체를 첨가함으로써 또는 예시적인 실시형태에서, 본 명세서에서 영양 세포로도 지칭되는 에피토프 태그에 결합하는 항체를 표면 상에 발현하는 세포를 첨가함으로써 가교되고 활성화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 동일한 영양 세포, 예를 들어, 항-HisX6 항체를 발현하는 영양 세포는 상이한 항원에 결합하지만 동일한 에피토프 태그, 예를 들어, HisX6을 포함하는 CAR을 발현하는 세포와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 영양 세포는 범용 영양 세포일 수 있다.

[0853] 일 양태에서, 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte: TIL) 및/또는 변형된 또는 비변형된 림프구, 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포로 제형화된 전달 용액을 포함하는 세포 제형(즉, 전달 조성물)이 본 명세서에 제공되며, 세포 제형은 피하 또는 근육내 전달에 대해 양립할 수 있고, 이에 효과적이고/이거나 이에 적합화된다. 임의의 본 명세서에 제공된 세포 제형에 대한 일부 실시형태에서, 세포 제형은 피하로 국재화되거나, 또는 대부분의 세포 제형은 대상체에서 피하로 국재화된다. 일부 실시형태에서, 세포 제형은 피하로 또는 근육내로 국재화되거나, 또는 대부분의 세포 제형은 대상체에서 피하로 또는 근육내로 국재화된다. 세포 제형이 TIL을 포함하는 일부 실시형태에서, 세포 제형은 재조합 핵산 벡터, 예시적인 실시형태에서, T 세포 및/또는 NK 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 전사 단위를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 복제 불능 재조합 레트로바이러스 입자와 회합되거나, 또는 폴리뉴클레오타이드로 유전적으로 변형되거나 또는 둘 모두에 의해 변형된 림프구를 더 포함할 수 있되, 하나 이상의 전사 단위는 제1 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 제1 폴리펩타이드를 암호화한다. 세포 제형이 TIL을 포함하는 일부 실시형태에서, 세포 제형은 TIL에 의해 인식되는 종양 항원의 공급원을 더 포함한다.

[0854] 다음의 비제한적인 예는 순수하게 예시적인 실시형태의 예시로서 제공되며, 본 개시내용의 범주 및 사상을 어떠한 방식으로도 제한하지 않는다. 또한, 본 명세서에 개시되거나 또는 청구된 임의의 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 하나 이상의 특징의 모든 변형, 조합 및 순열을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 특정 제외사항이 본 명세서에 명시적으로 제시되어 있지 않은 경우에도, 임의의 하나 이상의 특징이 청구범위로부터 명시적으로 제외될 수 있다. 또한, 방법에 사용하기 위한 시약의 개시는 본 명세서에 개시된 특정 방법 또는 당업자가 달리 이해하지 않는 한 당업계에 공지된 다른 방법에 따른 해당 시약의 사용을 포함하는 방법과 동의어(및 이에 대한 지원을 제공함)로 의도된다는 것을 이해하여야 한다. 또한, 명세서 및/또는 청구항이 방법을 개시하고 있는 경

우, 당업자가 달리 이해하지 않는 한, 본 명세서에 개시된 시약 중 임의의 하나 이상이 방법에 사용될 수 있다.

[0855] 실시예

[0856] 실시예 1. 형질도입 실험을 위한 물질 및 방법.

[0857] 이 실시예는 본 명세서의 후속 실시예에 개시된 실험에 사용되는 물질 및 방법을 제공한다.

[0858] 일시적 형질감염에 의한 재조합 렌티바이러스 입자 생산.

[0859] 293T 세포(Lenti-X™ 293T, 클론테크(Clontech))를 Freestyle™ 293 발현 배지(동물 기원-무포함, 화학적으로 정의됨, 단백질-무포함)(써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific))에서 연속으로 확장시킨 후 96 웰 플레이트에서 연속 희석에 의해 반복된 단일 세포로 화학적으로 정의된 현탁 배양에 적응시켜 마스터 세포 및 F1XT 세포라는 세포의 작업 세포 은행을 생성하고, 달리 명시되지 않는 한 본 명세서에서 실험을 위한 패키징 세포로 사용하였다.

[0860] 언급된 경우, 전형적인 4종 벡터 패키징 시스템은 (i) gag/pol, (ii) rev 및 (iii) 슈도타이핑 요소, 예컨대, VSV-G를 암호화하는 3개의 패키징 플라스미드를 포함하였다. 이러한 패키징 시스템의 제4종 벡터는 하나 이상의 관심 유전자를 암호화하는 제3세대 렌티바이러스 발현 벡터(자가-비활성화로 이어지는 3' LTR에 결실을 포함)인 게놈 플라스미드이다. 4종의 플라스미드를 사용하는 형질감염의 경우, 사용된 총 DNA(1 µg/ml의 배양 부피)는 다음 물비의 4종의 플라스미드의 혼합물이었다: 달리 명시되지 않는 한, 1x gag/pol-함유 플라스미드, 1x Rev-함유 플라스미드, 1x 바이러스 외피 함유 플라스미드(달리 명시되지 않는 한 VSV-G) 및 2x 게놈 플라스미드. 언급된 경우, 예를 들어, 항CD3-scFvFc-GPI와 같은 T 세포 활성화 요소를 암호화하는 제5 벡터가 다른 4종 벡터 패키징 시스템에 추가된 전형적인 5종 벡터 패키징 시스템을 사용하였다. 5종의 플라스미드를 사용하는 형질감염의 경우, 사용된 총 DNA(1 µg/ml의 배양 부피)는 다음의 물비의 5종의 플라스미드의 혼합물이었다: 달리 명시되지 않는 한, 1x gag/pol-함유 플라스미드, 1x Rev-함유 플라스미드, 1x VSV-G 함유 플라스미드, 2x 게놈 플라스미드 및 1x의 제5 벡터.

[0861] 소규모(3ml) 렌티바이러스의 생산을 위해, 플라스미드 DNA를 Freestyle™ 293 발현 배지에 패키징 세포를 포함하는 배양물 30ml마다 1.5ml의 Gibco™ Opti-MEM™ 성장 배지에 용해하였다. 폴리에틸렌이민(PEI)(폴리사이언시스(Polysciences))(약산에 용해됨)을 1.5ml의 Gibco™ Opti-MEM™에 2 µg/ml로 희석하였다. 2µg의 PEI 대 1µg의 DNA의 비로 준비된 두 시약을 합하여 PEI와 DNA의 3ml 혼합물을 제조하였다. 실온에서 5분 인큐베이션 후, 두 용액을 완전히 혼합하고, 실온에서 20분 더 인큐베이션하였다. 최종 부피(3ml)를 125ml Erlenmeyer 플라스크에 1×10⁶개 세포/ml의 현탁액의 30ml의 패키징 세포에 첨가하였다. 그런 다음, 세포를 형질감염을 위해 125rpm에서 회전시키면서 8% CO₂와 함께 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 대규모 렌티바이러스의 생산을 위해 (6.6ℓ 내지 10ℓ), 세포가 1×10⁶개 세포/ml에 도달했을 때 최종 반응기 접종 및 형질감염 물질의 추가까지 크기가 증가하는 Erlenmeyer 플라스크를 통해 확장된 F1XT 세포의 더 큰 반응기에서 형질감염 및 발효를 지원하기 위해 시약의 부피 및 비를 비례적으로 증가시켰다. 이러한 모든 방법으로 제조한 레트로바이러스 입자는 비-인간 유래 동물 단백질을 포함하지 않는다.

[0862] 72시간 후, 소규모 렌티바이러스 생산을 위해, 상청액을 수집하고, 1,200g에서 10분 동안 원심분리에 의해 정화하였다. 정화된 상청액을 멸균-여과하여 새로운 용기에 넣었다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 첨가 후 원심분리에 의해 이러한 정화된 상청액으로부터 실질적으로 정제된 바이러스를 얻었다. PEG 침전을 위해, ¼ 부피 PEG(타카라 Lenti-X™ 농축기)를 정화된 상청액에 첨가하고, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 혼합물을 1600g에서 1시간(50ml 코니칼 튜브의 경우) 동안 또는 1800g에서 1.5시간(500ml 코니칼 튜브의 경우) 동안 원심 분리하였다. 상청액을 버리고, 렌티바이러스 입자 펠릿을 패키징 세포 배양물의 초기 부피의 1:100으로 재현탁시켰다.

[0863] 심층 여과에 의한 대규모 정제를 위해, 배양 배지를 형질감염 용액의 추가 후 72시간에 수확하고, 연동 펌프를 사용하여 Sartorius(#5445306G9 또는 #5445306G8) 또는 Millipore(#MCE50027H1) 심층 필터 카트리지를 사용하여 심층 여과에 의해 정화하였다. 그런 다음, 정화된 배지를 2.0 +/- 0.5 PSI의 TMP를 갖는 KrossFlow TFF 시스템(스펙트럼)에서 500Kd mPES 중공 섬유 TFF 모듈(스펙트럼(Spectrum))을 사용하여 농축시켰다. MgCl₂를 2mM의 최종 부피에 첨가한 후, 벤조네이스(이엠디 밀리포어(EMD Millipore))를 50 U/ml로 첨가하여 잔류 DNA를 단편화하였다. 그런 다음, 농축물을 재순환시킨 다음 10 부피의 PBS 4% 락토스를 사용하여 정용여과하였다. 그런 다음, 실질적으로 정제 농축되고 제형화된 바이러스를 멸균-여과하고, 냉동시켜 사용하였다. 다른 경우에, 벤조

네이스를 형질감염 후 24시간에 배양 배지에 먼저 첨가하고, 심층-여과 후 물질을 농축 Tris NaCl로 희석하여 최종 50mM Tris 300mM NaCl(pH 8.0)이 되도록 하였다. Mustang-Q 수지(폴)에 로딩하고 2M NaCl로 용리한 후, 바이러스를 PBS 락토스로 희석하고 및 상기와 같이 TFF로 처리하였다.

- [0864] 293T 및/또는 저각 세포로의 형질도입에 의한 이식 유전자 발현의 연속 희석 및 분석, 및 타카라의 Lenti-X™ qRT-PCR 적정 키트(#631235) 또는 p24 검정 ELISA 키트(Lenti-X™ p24 신속 역가 키트 #632200)를 사용하여 렌티바이러스 게놈에 대한 FACS 또는 qPCR에 의한 이식 유전자 발현의 분석에 의해 렌티바이러스 입자를 적정하였다. 렌티바이러스 및 인간 RNAeP에 대한 표적 서열을 포함하는 플라스미드 표준에 대해 카피수를 보정하였다.
- [0865] 실시예에서 사용된 게놈 플라스미드
- [0866] 다음 렌티바이러스 게놈 벡터는 표시된 바와 같이 관심 유전자 및 특징을 암호화한다:
- [0867] F1-0-01. EF1-a 프로모터에 의해 구동되는 eTag를 암호화한다.
- [0868] F1-0-03. GFP에 이어 P2A에 이어 항-CD19scFv, CD8 줄기 및 막관통 영역, CD137로부터의 세포내 도메인 및 CD3z로부터의 세포내 도메인으로 구성된 CD19 CAR에 이어, 외인성 프로모터에 의해 구동되는 T2A 및 eTag를 암호화한다. 외인성 프로모터는 다른 프로모터가 명시되지 않는 한 EF1-a이다(GFP - P2A - aCD19:CD8:CD137:CD3z - T2A - eTag). 개략도는 도 10에 나타나 있다.
- [0869] F1-0-03RS. 렌티바이러스 게놈에 역배향으로 삽입되고 또한 역배향인 외인성 프로모터에 의해 구동되는 F1-0-03과 동일한 유전자를 암호화한다. 외인성 프로모터는 다른 프로모터가 명시되지 않는 한 EF1-a이다(eTag - T2A - aCD19:CD8:CD137:CD3z - P2A - GFP). 작제물은 역전사 단위 하류의 단방향 합성 폴리아데닐화된 서열 1(SPA1; 서열번호 317)을 추가로 암호화하며, 이 또한 역배향이다. 개략도는 도 10에 나타나 있다.
- [0870] F1-0-03RS-ΔEF1a. EF1a 프로모터가 결실된 것을 제외하고는 F1-0-03RS와 동일하다. 개략도는 도 10에 나타나 있다.
- [0871] F1-3-23은 항-CD19scFv, CD8 줄기 및 막관통 영역 및 CD3z로부터의 세포내 도메인에 이어 T2A와 eTag로 구성된 CD19 CAR을 암호화한다(aCD19:CD8:CD3z - T2A - eTag).
- [0872] F1-3-247은 CD19 CAR 및 "T/U" 잔기에 T를 갖고 선택적으로 마지막에 G를 갖는 코작-유형 서열 GCCGCCACCAT/UG(G)(서열번호 331)의 아미노에서 카복시 말단, CD8 신호 펩타이드 MALPVTALLPLALLLHAARP(서열번호 72)(코작-유형 서열의 서열 ATGG는 또한 CD8 신호 펩타이드의 처음 4개의 뉴클레오타이드를 암호화함), FLAG-TAG(DYKDDDDK; 서열번호 74), 링커(GSTSGS; 서열번호 349), 항-CD19scFv, CD8 줄기 및 막관통 영역 및 CD3z로부터의 세포내 도메인에 이어 T2A, 및 E006-T016-S186-S050 부분을 포함하는 림프증식성 요소로 구성된 폴리펩타이드 림프증식성 요소를 암호화한다. E006은 류신 지퍼 모티프 및 eTAG, CSF2RA의 막관통 도메인, MPL의 세포내 도메인 및 CD40의 세포내 도메인을 포함하는 c-Jun의 변이체를 포함하는 세포의 도메인을 암호화한다.
- [0873] 실시예에서 사용되는 모든 마우스는 기관 동물 관리 및 사용 위원회 승인 프로토콜(Institutional Animal Care and Use committee approved protocol)에 따라 처리하였다.
- [0874] 추가적인 렌티바이러스 게놈 벡터는 특정 실시예에서 설명된다.
- [0875] **실시예 2. VSV-G 또는 인플루엔자 HA 및 NA로 슈도타이핑되고, 선택적으로 VSV-G, MV 또는 MuLV로부터 유래된 외피로 코슈도타이핑되며, 추가로 선택적으로 표면에 항-CD3 scFv를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자에 4시간 동안 노출된 자극되지 않은 PBMC의 형질도입 효율.**
- [0876] 이 실시예에서, 다양한 상이한 외피 단백질로 슈도타이핑 또는 코슈도타이핑되고, 선택적으로 T 세포 활성화 요소를 디스플레이하는 렌티바이러스 입자를 4시간 동안 자극되지 않은 인간 PBMC에 노출시키고, 형질도입 효율을 평가하였다. 세포 처리 작업흐름은 170A의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160A의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 도 1a에 나타난 것과 같다.
- [0877] 재조합 렌티바이러스 입자를 F1XT 세포에서 생성하였다. 세포를 게놈 플라스미드 및 gag/pol, rev를 암호화하는 별도의 패키징 플라스미드 및 외피 플라스미드를 갖는 PEI를 사용하여 일시적으로 형질감염시켰다. 소정의 샘플의 경우, 형질감염 반응 혼합물에는 또한 UCHT1scFvFc-GPI를 암호화하는 플라스미드, 코슈도타이핑된 외피 또는 항CD3scFv에 융합된 코슈도타이핑된 외피를 포함시켰다. 이 실시예에서 샘플에 사용된 게놈 플라스미드는 실시예 1에 기재된 바와 같은 F1-0-03이었다. 이 실시예에서 샘플에 사용된 슈도타이핑된 및 코슈도타이핑된 플라스

미드는 VSV-G(서열번호 336), UCHT1로부터의 항-CD3 scFv가 VSV-G 외피의 아미노 말단에 융합된 U-VSV-G(서열번호 347), H1N1 PR8 1934로부터의 인플루엔자 HA(서열번호 311) 및 H10N7-HKWF446C-07로부터의 NA(서열번호 312), UCHT1로부터의 항-CD3 scFv가 MuLV 외피의 아미노 말단에 융합된 U-MuLV(서열번호 341), 8개 내지 31개의 C-말단 아미노산이 세포질 꼬리로부터 결실된 U-MuLV 변이체, U-MuLV에서 퓨린-매개성 절단 부위 Lys-Tyr-Lys-Arg가 Ile-Glu-Gly-Arg 펩타이드로 대체된 U-MuLV_{SUX}(서열번호 358) 또는 홍역 바이러스 H 단백질의 c-말단 24개의 아미노산이 제거된 MVH Δ 24(서열번호 315)로부터의 외피 단백질을 암호화한다.

[0878] 소정의 샘플에서, U-MuLV 외피 단백질은 U-MuLV - IRES2 - rev(MuLVIR)의 형식 또는 U-MuLV - T2A - rev(MuLV2R)의 형식으로 일렬로 rev 패키징 플라스미드에서 암호화되었다. rev와 같은 패키징 백터에 코슈도타이핑 요소를 배치함으로써, 5종의 개별 플라스미드가 아닌 4종을 사용하여 패키징 세포를 형질감염시켰다. 본 명세서에서 5종보다 4종의 플라스미드로 형질감염시키면 더 높은 바이러스 역가를 초래하는 것으로 관찰되었다.

[0879] 제0일에, 캘리포니아 샌디에이고 혈액 은행에서 수집되고 배포된 2명의 공여자로부터의 버피 코트로부터 PBMC를 준비하였다. Ficoll-Paque PLUS®(지이 헬스케어 라이프 사이언시스)에서 PBMC의 SepMate™ 50(Stemcell™)-기반 구배 밀도 분리를 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. PBS-2% HIFCS(열 불활성화된 송아지 태아 혈청)에 희석시킨 30ml의 버피 코트를 SepMate™ 튜브마다 적층하였다. 실온에서 1,200g에서 20분 동안 원심분리한 후, PBMC 층을 수집하고, 폴딩하고, 45ml의 PBS-2% HIFCS로 3회 세척하고, 실온에서 400g에서 10분 동안 원심분리하였다. 그런 다음, 펠릿을 10ml의 RBC 용해 완충액(알파 에이사(Alfa Aesar))에서 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고, 45ml의 PBS-2% HIFCS로 2회 더 세척하고, 실온에서 400g에서 10분 동안 원심분리하였다. 형질도입 및 배양 배지인 X-Vivo™ 15에서 최종 세척을 수행하였다. 단백구를 제거하기 위해 추가 단계를 수행하지 않았다.

[0880] 단리 후, 1ml의 X-Vivo15 중 1×10^6 개의 자극되지 않은 PBMC를 96 웰-플레이트의 각 웰에 시딩하였다. 바이러스 입자를 표시된 바와 같이 1 또는 10의 MOI로 첨가하고, 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 노출 후, 세포를 400g에서 5분 동안 펠릿화하고, 2ml의 DPBS + 2% HSA에 세포를 재현탁시키고 400g에서 5분 동안 원심분리하여 3회 세척한 후, 각 웰의 세포를 1ml의 X-Vivo15에 재현탁시키고, 37°C 및 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 어떤 시간에도 샘플에 외인성 사이토카인을 첨가하지 않았다. 2명의 공여자 각각으로부터의 PBMC를 사용하여 각 샘플을 이중으로 실행하였다. 샘플을 제6일에 수집하여 전방 및 측면 산란에 기초한 림프구 게이트를 사용한 FACS 분석에 의해 결정된 바와 같이 eTAG 및 CD3 발현에 기초한 형질도입 효율을 결정하였다.

[0881] 도 3a는 형질도입 후 제6일에 웰당 살아있는 세포의 총 수를 보여준다. VSV-G 단독으로 슈도타이핑된 바이러스 입자에 노출된 샘플과 비교하여, VSV-G로 슈도타이핑된 바이러스 입자에 노출되고 UCHT1도 또한 디스플레이하는 샘플은 웰당 더 많은 수의 세포를 가졌다. 이는 UCHT1scFv가 GPI-연결된 scFvFc로 표시되었을 때와 scFv가 VSV-G 또는 MuLV 바이러스 외피에 융합되었을 때 모두 관찰되었다. 이론에 제한되지 않고, 항CD3 scFv에 의한 CD3+ T 세포 및 NK 세포의 자극은 이러한 세포 수의 증가의 적어도 일부를 설명할 수 있는 증식 및 생존을 유도하는 것으로 여겨진다.

[0882] 도 3b는 eTAG 발현에 의해 측정되는 바와 같이 형질도입된 CD3+ 세포의 백분율을 보여준다. UCHT1scFvFc-GPI를 디스플레이하거나 또는 U-MuLV, U-MuLV_{SUX}, U-VSV-G 또는 MVH Δ 24로 코슈도타이핑된 VSV-G로 슈도타이핑된 바이러스 입자에 노출된 샘플은 항CD3 항체를 디스플레이 하지 않는 VSV-G로 슈도타이핑된 바이러스 입자 단독에 노출된 샘플보다 형질도입 효율이 더 높았다. 10의 MOI로 이 실험에서 테스트된 4개의 샘플 중에서, VSV-G + UCHT1scFvFc-GPI 바이러스 입자가 CD3+ 자극되지 않은 PBMC를 형질도입한 효율은 64.3%, 66.3%, 78.0% 및 76.7%였다. 10의 MOI로 이 실험에서 테스트된 4개의 샘플 중에서, VSV-G + U-MuLV 바이러스 입자가 CD3+ 자극되지 않은 PBMC를 형질도입한 효율은 37.6%, 43.8%, 20.5% 및 30.8%였다. VSV-G로 코슈도타이핑한 경우, 4개, 8개, 12개, 16개, 20개, 24개, 28개 및 31개의 C-말단 아미노산이 결실된 U-MuLV의 개별 변이체는 전장 U-MuLV(제시되지 않음)와 유사한 4시간 이내에 CD3+ 자극되지 않은 PBMC를 형질도입하였다. 유사하게는, VSV-G로 코슈도타이핑한 경우, 막관통(TM)과 표면(SU) 단위 사이의 인자 X 절단 부위(AAAIEGR)가 (G4S)₃ 또는 "AAAIAGA"로 대체된 U-MuLV_{SUX}의 개별 변이체는 U-MuLV_{SUX}(제시되지 않음)와 유사한 4시간 이내에 CD3+ 자극되지 않은 PBMC를 형질도입하였다. 10의 MOI로 이 실험에서 테스트된 4개의 샘플 중에서, VSV-G + MVH Δ 24 바이러스 입자가 CD3+ 자극되지 않은 PBMC를 형질도입한 효율은 64.5%, 62.4%, 72.3% 및 71.5%였다. 별개의 실험에서, H1N1 PR8 1934로부터의 인플루엔자 HA 및 H10N7-HKWF446C-07로부터의 NA로 슈도타이핑된 바이러스 입자는 VSV-G + U-MuLV로 코슈도타이핑된 바이러스 입자와 유사한 효율로 CD3+ 자극되지 않은 PBMC를 형질도입하였다.

- [0883] 실시예 3. 4시간 동안 재조합 레트로바이러스 입자에 전혈을 노출시킨 후 PBMC 농축 절차에 의한 자극되지 않은 림프구의 효율적인 유전적 변형.
- [0884] 이 실시예에서, 자극되지 않은 인간 T 세포 및 NKT 세포를 전혈, 및 VSV-G로 슈도타이핑되고, 표면에 T 세포 활성화 요소를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자를 포함하는 반응 혼합물을 4시간 인큐베이션함으로써 효과적으로 유전적으로 변형시켰다. PBMC를 후속적으로 전통적인 밀도 구배 원심분리-기반 PBMC 농축 절차를 사용하여 형질도입 반응 혼합물로부터 분리하였다. 세포 처리 작업흐름은 170C의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160C의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 도 1c에 나타난 것과 같다. CD3+ 세포의 형질도입은 유세포 분석을 사용하여 eTag 이식 유전자의 발현에 의해 평가하였다.
- [0885] 실시예 1에 기재된 바와 같이 심층 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용여과 및 제형화의 조합에 의해 바이러스 상청액을 정제하여 이 실시예에서 사용된 비-인간 동물 단백질이 없는 하기의 실질적으로 순수한 바이러스 입자를 생성하였다: VSV-G로 슈도타이핑된 F1-3-23(F1-3-23G); 및 VSV-G로 슈도타이핑되고 T 세포 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하는 F1-3-23(F1-3-23GU).
- [0886] 항응고제를 함유하는 Vacutainer 튜브에 담긴 10ml의 신선한 전혈 샘플을 구입하였다(스템익스프레스(StemExpress), 샌디에이고 소재). 개별 샘플의 항응고제는 혈액 ml당 EDTA 1.8 mg/ml 또는 Na-헤파린 16 USP 단위였다. 재조합 레트로바이러스 입자를 5의 MOI(1×10^6 PBMC/ml의 혈액으로 가정)로 전혈이 담긴 Vacutainer 튜브에 직접 첨가하여 전혈의 림프구에 대한 레트로바이러스 입자의 접촉을 개시하고, 매시간 부드럽게 혼합하면서 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하여 임의의 침강을 방해하였다. 4시간 인큐베이션 후, 각 전혈 샘플로부터의 PBMC를 제조업체의 프로토콜에 따라 SepMate50 튜브(스템셀 테크놀로지스)를 사용하여 개별적으로 분리하였다. PBMC를 15ml 코니칼 튜브에 수집하고, 10ml DPBS + 2% HSA에 세포를 재현탁시키고 400g에서 5분 동안 원심분리하여 세척하였다. 이 세척 절차를 3회 반복한 후, 세포를 10ml의 X-Vivo15에 재현탁시키고, 37°C 및 5% CO₂에서 T75의 플라스크에서 다단(upright)으로 배양하였다. 어떤 시간에도 샘플에 외인성 사이토카인을 첨가하지 않았다. 샘플을 제6일에 수집하여 전방 및 측면 산란에 기초한 림프구 게이트를 사용한 FACS 분석에 의해 결정된 바와 같이 살아있는 세포에서 eTag 및 CD3 발현에 기초한 형질도입 효율을 결정하였다.
- [0887] 도 4a 및 도 4b는 전혈의 형질도입 후 제6일에 ml당 절대적인 살아있는 세포 수(도 4a) 및 CD3+eTag+ 세포의 백분율(즉, 형질도입된 T 세포)(도 4b)의 히스토그램을 보여준다. 본 발명자들의 이전 결과 및 분리된 PBMC의 형질도입을 연구하는 다른 연구자들의 결과와 일치하게, 본 발명자들은 이 실시예에서 VSV-G 단독으로 슈도타이핑된 재조합 레트로바이러스 입자가 전혈에서 PBMC를 형질도입시키는데 극도로 비효율적임을 알 수 있었다. 그러나, 본 발명자들은 이전에 VSV-G로 슈도타이핑되고 T 세포 활성화 요소를 디스플레이하는 재조합 레트로바이러스 입자가 분리된 PBMC를 효율적으로 형질도입시킬 수 있음을 보았다. 놀랍게도, 이러한 히스토그램은 레트로바이러스 입자가 전혈에 존재하는 PBMC를 효율적으로 형질도입하는데 PBMC 농축 단계가 필요하지 않음을 보여준다. 오히려, 항응고제를 함유하는 전혈에 직접 첨가될 때, VSV-G로 슈도타이핑되고 항CD3-scFvFc를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자는 그 안의 PBMC를 효과적으로 유전적으로 변형시키고 형질도입할 수 있다. 유전적 변형은 세포를 세척하여 유리 재조합 레트로바이러스 입자를 제거하기 4시간 전인 접촉 및 인큐베이션에 의해 달성될 수 있다. 세포가 유전적으로 변형된 후, 이들은 PBMC 농축 절차를 사용하여 효과적으로 분리될 수 있다. 이 실시예에 나타난 바와 같이, 항응고제는 EDTA 또는 Na-헤파린일 수 있다. 다른 실험에서 항응고제로서 산 시트레이트 텍스트로스(ACD)를 사용하여 유사한 결과를 얻었다.
- [0888] 실시예 4. 4시간 동안 재조합 레트로바이러스 입자에 전혈을 노출시킨 후 여과에 의해 TNC를 분리함으로써 자극되지 않은 림프구의 효율적인 유전적 변형.
- [0889] 실시예 3과 유사하게, 자극되지 않은 인간 T 세포 및 NKT 세포를 전혈 및 VSV-G로 슈도타이핑되고, 표면에 T 세포 활성화 요소를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자를 포함하는 반응 혼합물을 4시간 인큐베이션하여 효과적으로 유전적으로 변형시켰다. 총 유핵 세포(TNC)를 후속적으로 백혈구감소 필터 상에서 형질도입 반응 혼합물로부터 포획하고, 세척하고, 백혈구감소 필터 어셈블리의 역관류에 의해 수집하였다. 세포 처리 작업흐름은 170D 및 180D의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160D의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행하는 것을 제외하고는 도 1d에 나타난 것과 동일하였다. CD3+ 세포의 형질도입을 유세포 분석을 사용하여 eTag의 발현에 의해 평가하였다.
- [0890] 실시예 1에 기재된 바와 같이 심층 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용여과 및 제형화의 조합에 의해 바이러스 상청액을 정제하여 이 실시예에서 사용된 비-인간 동물 단백질이 없는 하기의 실질적으로 순수한 바이러스 입자

를 생성하였다: VSV-G로 슈도타이핑되고, T 세포 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하는 F1-3-23(F1-3-23GU).

[0891] 혈액 1ml당 16 USP 단위의 Na-헤파린을 함유하는 Vacutainer 튜브에 담긴 3개의 10ml의 신선한 전혈 샘플을 구입하고(스탬익스프레스, 샌디에이고), 50ml 코니칼로 합하였다. 제조함 렌티바이러스 입자 F1-3-23GU(2.9ml)를 5의 MOI(1×10^6 PBMC/ml의 혈액으로 가정)로 30ml의 전혈 샘플에 직접 첨가하여 렌티바이러스 입자와 전혈의 림프구의 접촉을 개시하고, 매시간 부드럽게 혼합하면서 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하여 임의의 침강을 방해하였다. 4시간 인큐베이션 후, 제조업체의 지침에 따라 백혈구감소 필터 어셈블리인 HemaTrate® 혈액 여과 시스템(쿡 리젠텍)을 사용하여 혈액을 처리함으로써 TNC를 분리하였다. 그런 다음, TNC를 백혈구감소 필터 어셈블리 위로 90ml의 DPBS + 2% HSA를 통과시켜 세척하였다. TNC를 20ml의 X-Vivo15를 이용한 재관류에 의해 플라스크에 회수하였다. 그런 다음, TNC를 37°C 및 5% CO₂에서 T75 플라스크에서 배양하였다. 어떤 시간에도 샘플에 외인성 사이토카인을 첨가하지 않았다. 샘플을 제7일에 수집하여 전방 및 측면 산란에 기초한 림프구 게이트를 사용한 FACS 분석에 의해 결정된 바와 같이 살아있는 세포에 대한 eTag 및 CD3 발현에 기초하여 형질도입 효율을 결정하였다.

[0892] 도 5는 전혈의 형질도입 후 제7일에 CD3+eTag+ 세포의 FACS 프로파일을 보여준다. 이전 실시예의 놀라운 결과와 일치하게, VSV-G로 슈도타이핑되고 항CD3-scFvFc를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자와 Na-헤파린을 함유하는 전혈의 4시간 인큐베이션은 림프구를 효과적으로 유전적으로 변형시키기에 충분하였다. 또한, 백혈구감소 필터 어셈블리를 사용하는 신속한 TNC 분리 단계는 CD3 및 eTag에 대해 양성으로 염색된 림프구의 17.99%에 의해 입증된 바와 같이 형질도입된 CD3+ T 세포 및 NKT 세포를 포함하는 TNC를 분리하는데 효과적이었다.

[0893] 실시예 5. 변형된 PBMC의 피하 전달은 정맥내 전달과 비교하여 CAR 세포 생착 및 종양 살해를 유의하게 향상시켰다.

[0894] 이 실시예에서, 새로 분리된 전혈로부터 농축된 자극되지 않은 PBMC를 키메라 항원 수용체 및 림프증식성 요소를 발현하도록 예시적인 방법을 사용하여 변형시키고, 혈액 수집 대략 13시간 이내에 마우스에 투여하였다. 세포 처리 작업흐름은 170A의 선택적 단계를 수행하지 않고, 120A 및 130A 단계만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 도 1a에 나타난 것과 동일하였다. 놀랍게도, 생체내 CAR 세포 생착 및 종양 살해는 정맥내 주사와 비교하여 피하 주사에 의한 변형된 PBMC의 전달에 의해 유의하게 향상되었다.

[0895] 물질 및 방법

[0896] VSV-G로 슈도타이핑되고 T 세포 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하는 F1-3-247을 암호화하는 제조함 렌티바이러스 입자(F1-3-247GU)를 6.6 l의 중간 규모에서 5종의 플라스미드 프로토콜을 사용하여 F1XT 세포를 형질감염시켜 생성하고, 심층 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용여과 및 제형화의 조합에 의해 정제하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 비-인간 동물 단백질이 없는 실질적으로 순수한 바이러스 입자를 생성하였다.

[0897] 동의를 얻은 2명의 건강한 자원자로부터 전혈을 얻고, 별도의 날에 처리하였다. 혈액을 1.5ml의 산 시트레이트 텍스트로스 용액 A 항응고제(ACD 말초 혈액)를 함유하는 여러 개의 100mm Vacutainer 튜브(백톤 딕킨슨(Becton Dickinson); 364606)에 수집하였다. 각 자원자에 대해, Vacutainer 튜브의 혈액을 풀링하고(공여자 A의 경우 204ml, 공여자 B의 경우 198ml), 2개의 표준 500ml 혈액 수집 백에 분배하였다.

[0898] PBMC를 농축하기 위해, 각 자원자로부터의 2개의 혈액 백의 혈액을 제조업체의 지침에 따라 2회의 세척 사이클을 사용하여 Sepax 2 S-100 장치(바이오세이프; 14000)에서 CS-900.2 키트(바이오세이프; 1008)를 사용하여 Ficoll-Paque™(제너럴 일렉트릭)로 밀도 구배 원심분리에 의해 폐쇄형 시스템에서 순차적으로 처리하여 각 실행에서 45ml의 분리된 PBMC를 얻었다. Sepax 2 과정에서 사용된 세척 용액은 생리 식염수(케니신 팜(Chenixin Pharm)) + 2% 인간 혈청 알부민(HSA)(쓰촨 위안다 슈양 파마슈티칼(Sichuan Yuanda Shuyang Pharmaceutical))이었다. 최종 세포 재현탁 용액은 45ml의 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM(26ml OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 보충제(썬모 피서, A10484-02), 25ml CTS™ 면역 세포 SR(썬모 피서, A2596101) 및 10ml CTS™ GlutaMAX™-I 보충제(썬모 피서, A1286001))가 보충된 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 기본 배지 1 l(썬모 피서, A10221-03))이었다. Sepax 2 기계의 각 처리 단계는 대략 1시간 20분이었다. 공여자 A로부터 3×10^8 개의 살아있는 PBMC를 얻었고, 공여자 B로부터 1.6×10^8 개의 살아있는 PBMC를 얻었다.

[0899] 형질도입을 위해, 새롭게 농축된 PBMC를 50ml 튜브에 시딩하고, 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM을 첨가

하여 세포 밀도를 1.0×10^6 개 세포/ml로 만들었다. 형질도입 전에 생체외에서 PBMC를 활성화하거나 또는 그렇지 않으면 자극하기 위해 항-CD3, 항-CD28, IL-2, IL-7 또는 다른 외인성 사이토카인은 첨가되지 않았다. F1-3-247GU 바이러스 입자를 샘플에 따라 1 또는 5의 MOI로 비-자극된 PBMC에 첨가하였다. 형질도입 반응 혼합물을 37℃ 및 5% CO₂에서 표준 가슴 조직 배양 인큐베이터에서 네(4)시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 노출 후, 세포를 400g에서 10분 동안 펠릿화하고, 40ml의 DPBS + 2% HSA에 세포를 재현탁시켜 3회 세척하고, 400g에서 10분 동안 원심분리한 후 5ml DPBS + 2% HSA에 재현탁시키고 계수하였다.

[0900] 생체내 연구를 위한 대조군으로서, 형질도입 효율을 시험관내 검정에 의해 결정하였다. 각 형질도입에 대해 1.0×10^6 개 세포를 1ml의 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM이 담긴 24-웰 조직 배양 플레이트의 웰에 시딩하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 표준 가슴 조직 배양 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 어떤 시간에도 샘플에 외인성 사이토카인을 첨가하지 않았다. 샘플을 제6일에 수집하여 전방 및 측면 산란에 기초한 림프구 게이트를 사용한 FACS 분석에 의해 결정된 바와 같이 eTAG 및 CD3 발현에 기초하여 형질도입 효율을 결정하였다.

[0901] 생체내 연구를 위해, 형질도입된(또는 그렇지 않으면 변형된) PBMC의 샘플을 투여를 위해 200 μ l DPBS + 2% HSA 당 1.0×10^6 및 5.0×10^6 PBMC로 재현탁시켰다. 혈액을 수집하고, PBMC를 농축시키고, PBMC를 형질도입 또는 그렇지 않으면 변형시키고, 투여용 PBMC를 제조하는데 소요되는 총 시간은 공여자 A의 경우 12시간 40분이었고, 공여자 B의 경우 13시간이었다.

[0902] 위의 방법에 의해 형질도입된 효과기 PBMC에 의한 생체내 종양의 증식/생존 및 표적 살해

[0903] F1-3-247로 형질도입된 인간 PBMC가 생체내에서 CD19-발현 종양을 생존, 증식 및 살해하는 능력을 조사하기 위해 B-NDG 마우스를 사용한 이중이식 모델을 선택하였다. B-NDG는 성숙 T 세포, NK 세포 및 B 세포가 결핍된 마우스의 계통이며, 현재까지 기술된 가장 면역결핍성인 마우스 계통 중 하나이다. 면역계의 이러한 세포 성분의 제거는 전형적으로 인간 PBMC가 숙주로부터의 선천성, 체액성 또는 후천성 면역 반응 없이 생활할 수 있도록 수행된다. 항상성 사이토카인의 농도는 일반적으로 인간에서 방사선 또는 림프구 제거 화학요법 후에만 존재하며, 이는 입양으로 전달된 인간 세포가 이러한 사이토카인을 받아들일 수 있게 하는 무린 세포의 공통 감마 사슬의 부재로 인해 달성된다. 동시에, 이러한 동물은 또한 표적-발현 종양을 죽이기 위한 CAR의 효능을 조사하기 위해 종양 이중이식 표적을 생착시키는데 이용될 수 있다. 효과기 세포 생성물에 이중반응성 T 세포 수용체 항원이 존재하면 결국 이식편 대 숙주 질환이 발생할 것이지만, 이러한 모델은 동물 약리학 및 급성 내약성의 단기 평가를 가능하게 한다.

[0904] 내인성 인간 CD19를 발현하는 라지 세포(ATCC, 버지니아주 머내서스 소재)를 이용하여 CAR 효과기 세포를 자극하기 위한 항원을 제공하고, CD19-발현 종양을 죽이기 위한 CAR 효과기 세포의 효능을 결정하기 위한 균일한 표적 종양을 생성하였다. 라지 세포는 Matrigel 인공 기저막과 함께 NSG 마우스에 피하 투여로 빠르게 성장하였다.

[0905] 암컷 NOD-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1}/Bgen(B-NDG) 마우스(베이징 바이오사이토젠 컴퍼니 리미티드(Beijing Biocytogen Co. Ltd.))의 뒷 옆구리에 피하(sc) 종양 이중이식편을 확립하였다. 간략하게는, 배양된 라지 세포를 DPBS(씨모 피셔)로 세척하고, 계수하고, 차가운 DPBS에 재현탁시키고, 얼음 위에서 0.5×10^6 개 세포/200 μ l Matrigel의 농도로 적절한 부피의 Matrigel ECM(코닝(Corning); 최종 농도 5 mg/ml)과 혼합하였다. 동물은 주사를 위해 주사 전에 제모용으로 승인된 표준 마취(네어(Nair))를 사용하여 준비하였다. ECM 중 200 μ l의 세포 현탁액을 6주령 마우스의 뒤쪽 옆구리에 피하로 주사하였다.

[0906] 공여자 A로부터의 변형된 PBMC를 정맥내로 마우스에 전달하였다. 종양 접종 14일 후, 평균 부피가 150mm³인 라지 종양을 보유하는 마우스에게 다음과 같이 공여자 A로부터의 200 μ l의 PBMC를 꼬리 정맥 주사에 의해 정맥내로 투여하였다: AG1에는 1×10^6 개의 형질도입되지 않은 PBMC를 투여하였고(n=5), AG2에는 1의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 1×10^6 개의 PBMC를 투여하였고(n=6), AG3에는 1의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 5×10^6 개의 PBMC를 투여하였고(n=6), AG4에는 5의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 1×10^6 개의 PBMC를 투여하였고(n=6), AG5에는 5의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 5×10^6 개의 PBMC를 투여하였다(n=6).

[0907] 공여자 B로부터의 변형된 PBMC를 정맥내보다는 피하로 마우스에 전달하였다. 종양 접종 18일 후, 평균 부피가 148mm³인 라지 종양을 보유하는 마우스에게 다음과 같이 공여자 B로부터의 100 μ l의 PBMC를 종양의 반대쪽 옆구리

에 피하로 투여하였다: BG1에게 5×10^6 개의 형질도입되지 않은 PBMC를 투여하였고(n=5), BG2에게 1의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 5×10^6 개의 PBMC를 투여하였고(n=5), BG3에게 5의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 1×10^6 개의 PBMC를 투여하였고(n=6), BG4에게 5의 MOI로 F1-3-247GU로 형질도입된 5×10^6 개의 PBMC를 투여하였다(n=6).

[0908] 캘리퍼스를 사용하여 1주일에 2회 또는 3회 종양을 측정하고, 다음 방정식을 사용하여 종양 부피를 계산하였다: (가장 긴 직경 * 가장 짧은 직경²)/2. FACS 및 qPCR에 의한 분석을 위해 제7일(또는 제8일), 제14일, 제21일, 제28일 및 제35일에 각 마우스로부터 대략 100 μ l의 혈액을 수집하였다.

[0909] 결과

[0910] 2명의 건강한 자원자로부터 인간 전혈을 수집하고, Sepax 2 S-100 장치에서 Ficoll-PaqueTM에 의해 PBMC에 대해 농축시켰다. FAC 분석을 사용하여 후속적으로 형질도입되고 생체내에서 마우스에 전달되는 농축된 PBMC의 세포 구성을 특성화하였다. 표 2는 선별 마커를 발현하는 세포의 백분율을 보여준다. T 세포 및 NK 세포 외에도, 이러한 농축된 PBMC에는 공여자 A 및 B로부터의 CD14+ 세포(대식세포, 수지상 세포 및 호중구)를 각각 6.9% 및 21.9%, 그리고 공여자 A 및 B로부터의 CD19+ 세포(B 세포)를 각각 1.9% 및 9.8% 포함되었음에 유의한다.

표 2

선별 마커를 발현하는 새롭게 농축된 PBMC의 백분율

집단	마커	공여자 A	공여자 B
살아 있는 림프구의 %	CD3+	77.30%	37.20%
	CD3-CD56+	4.90%	23%
CD3+ 살아 있는 림프구의 %	CD3+CD4+ (CD3+에서)	49.30%	42.30%
	CD3+CD8+ (CD3+에서)	58.80%	52.50%
	CD3+CD56+ (CD3+에서)	6.40%	16.40%
살아 있는 세포의 %	CD14+	6.90%	21.90%
	CD19+	1.90%	9.80%

[0911]

[0912] 농축된 PBMC는 F1-3-247GU로 유전적으로 변형되어 CD19에 대한 CAR, 및 EF1- α 프로모터에 의해 구성적으로 구동되는 부분 E006-T016-S186-S05(표 1)를 포함하는 림프증식성 요소를 발현하였다. PBMC를 유전적으로 변형시키기 위해, 세포를 VSV-G로 슈도타이핑되고 또한 표면에 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하는 F1-3-247를 암호화하는 렌티바이러스 입자와 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. 각 형질도입 반응의 샘플을 외인성 사이토카인의 존재하에 6일 동안 시험관내에서 배양하고, 형질도입 효율을 유세포 분석을 사용하여 CD3+ eTAG+ 살아있는 세포의 백분율로 결정하였다. 공여자 A로부터의 PBMC의 형질도입 효율은 1 및 5의 MOI에서 각각 4.5% 및 51.2%였다. 공여자 B로부터의 PBMC의 형질도입 효율은 1 및 5의 MOI에서 각각 15.7% 및 24.8%였다. 이전 실시예와 일치하게, 이러한 결과는 PBMC가 효과적으로 형질도입되었음을 보여준다.

[0913] 이 실시예의 생체내 암(arm)에 대해, CD19 종양을 보유하는 B-NDG 면역결핍 마우스에 F1-3-247GU에 4시간 노출시켜 변형시킨 PBMC를 투여하였다. 이러한 PBMC는 투여 전에 결코 확장하거나 또는 그렇지 않으면 생체외에서 배양하지 않았다. 오히려, 변형된 PBMC를 사용하여 자원자로부터 전혈을 수집한 후 13시간 이내에 마우스에 투여하였다. 공여자 A로부터의 변형된 PBMC는 전통적으로 정맥내 투여에 의해 투여한 반면, 공여자 B로부터의 변형된 PBMC는 종양과 반대편 옆구리에 피하로 투여하였다.

[0914] 이러한 형질도입된 PBMC가 생체내에서 생장하는 능력을 CAR-T 투여 후 최대 5주 동안 주 1회 조사하였다. 도 6 및 도 7은 CD3+eTAG+ 세포에 대한 유세포 분석에 의해 검출된 바와 같은 60 μ l의 혈액당 CAR-T 세포의 수를 보여준다. 도 6에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 PBMC(AG1)와 비교할 때, F1-3-247GU로 형질도입되고 정맥내로 전달된 PBMC는 5의 MOI로 형질도입을 수행하고 5×10^6 개의 세포를 전달한 경우에도 상당한 생장을 나타내

지 않았다(AG5). 대조적으로, 도 7에 나타난 바와 같이, F1-3-247GU로 형질도입된 PBMC를 피하로 전달하였을 때 모든 마우스에서 상당한 생착이 관찰되었다. CAR-T 투여 후 제21일에, 예를 들어, $60\mu\text{L}$ 의 혈액당 CAR-T 세포의 평균 수는 형질도입되지 않은 PBMC(BG1)가 투여된 마우스에서는 103개에 불과하였지만, 각각 형질도입된 PBMC가 투여된 BG2, BG3 및 BG4에서는 각각 7.3×10^5 개, 4.2×10^5 개 및 7.9×10^5 개의 CAR-T 세포/ $60\mu\text{L}$ 의 혈액이었다.

[0915] 이러한 형질도입된 PBMC가 생체내에서 확립된 라지 종양을 죽이는 능력을 시간 경과에 따라 조사하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, F1-3-247GU로 형질도입되고 정맥내로 전달된 PBMC는 종양 진행을 저해하는데 적당한 능력을 나타낼 수 있다. 이는 샘플 AG2, AG4 및 AG5에서 볼 수 있다. 대조적으로, 도 9에 나타난 바와 같이, F1-3-247GU로 형질도입되고 피하로 전달된 PBMC는 종양 부담을 극적으로 감소시켰다. 이러한 종양 퇴행은 BG2, BG3 및 BG4 그룹의 모든 마우스에서 관찰되었다.

[0916] 이러한 결과는 함께 PBMC 단리되고, CAR 및 림프증식성 요소를 발현하도록 생체외에서 조작되고, 초기 채혈 후 13시간 이내에 생체내 전달되는 PBMC는 생체내에서 생착하고 종양 퇴행을 촉진할 수 있음을 보여준다. 놀랍게도, 변형된 PBMC의 피하 전달은 정맥내 전달과 비교하여 상당히 더 나은 생착 및 종양 퇴행을 유도하였다.

[0917] **실시예 6. EF1-a 프로모터가 렌티바이러스 게놈에서 역배향으로 암호화될 때 감소된 렌티바이러스 역가.**

[0918] 이 실시예에서, EF1-a 프로모터는 렌티바이러스 게놈에 역배향으로 삽입될 때 바이러스 역가를 크게 감소시키는 것으로 나타났다. EF1-a와 대조적으로, PGK, SV40hCD3 또는 MSCVU3이 렌티바이러스 게놈에 역배향으로 삽입되었을 때 동일한 프로모터가 정배향으로 삽입되었을 때와 비교하여 바이러스 역가에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. Lenti-X™ 293T 패키징 세포에서 GFP 발현의 분석은 EF1-a는 강한 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터인 반면, PGK, SV40hCD3 및 MSCVU3은 Lenti-X™ 293T 세포에서 보다 약한 프로모터임을 보여주었다.

[0919] 실시예 1에 기재된 바와 같이 렌티바이러스 입자를 제조하였다. 4종 벡터 패키징 시스템을 사용하여 Lenti-X™ 293T 세포를 형질감염시켰다. 이 실시예에서 사용된 렌티바이러스 게놈 벡터는 총 8종의 고유한 벡터에 대해 정배향 또는 역배향으로 EF1-a, PGK, SV40hCD3 또는 MSCVU3 프로모터로 구성된 F1-0-03 및 F1-0-03RS였다. 또한, F1-0-03RS-ΔEF1a를 관련된 별도의 실험에도 사용하였다. 형질감염 24시간 후, 세포 샘플을 채취하여 FACS에 의해 GFP 발현을 평가하였다. 형질감염 72시간 후, 바이러스를 PEG 침전에 의해 정제하고, Lenti-X™ 293T에서 FACS로 기능적 역가를 측정하고, 저각 세포에서 별도로 측정하였다.

[0920] 이 실시예에서 제조된 렌티바이러스 입자의 바이러스 역가는 도 11a에 나타나 있다. 프로모터가 EF1-a인 경우, F1-0-03의 역가는 6.14×10^7 이었고, F1-0-03RS의 역가는 1.32×10^6 이었다. EF1-a 프로모터가 역배향으로 놓일 때 역가는 46-배 감소하였다. 프로모터가 PGK인 경우, F1-0-03의 역가는 7.39×10^6 이었고, F1-0-03RS의 역가는 8.50×10^6 이었다. 이는 PGK 프로모터를 렌티바이러스 게놈에서 역배향으로 배치하는 것이 바이러스 역가에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 프로모터가 SV40hCD3인 경우, F1-0-03의 역가는 5.10×10^6 이었고, F1-0-03RS의 역가는 2.82×10^6 이었다. SV40hCD3 프로모터가 역배향으로 놓일 때 역가가 1.8-배 감소한 것은 샘플 제제 사이의 정상적인 변동 때문일 수 있다. 이는 SV40hCD3 프로모터를 렌티바이러스 게놈에서 역배향으로 배치하는 것이 바이러스 역가에 최소한의 부정적인 영향을 미친다는 것을 보여준다. 프로모터가 MSCVU3인 경우, F1-0-03의 역가는 1.56×10^7 이었고, F1-0-03RS의 역가는 5.93×10^6 이었다. MSCVU3 프로모터가 역배향으로 놓일 때 역가가 2.6-배 감소한 것은 샘플 제제 사이의 정상적인 변동 때문일 수 있다. 이는 MSCVU3 프로모터를 렌티바이러스 게놈에서 역배향으로 배치하는 것이 바이러스 역가에 최소한의 부정적인 영향을 미친다는 것을 보여준다. 바이러스 역가에 대한 EF1-a의 효과를 F1-0-03, F1-0-03RS 및 F1-0-03RS-ΔEF1a의 역가를 직접 비교하는 별도의 실험에서 추가로 연구하였다. 이러한 별도의 실험에서, 역배향(F1-0-03RS-EF1)의 EF1-a 프로모터의 결실은 게놈 벡터가 역배향일 때 관찰된 바이러스 역가에 대한 저해 효과를 완전하게 제거하였다.

[0921] 평균 형광 강도(MFI)에 의해 측정된 Lenti-X™ 293T 패키징 세포에서 GFP 발현 수준은 도 11b에 나타나 있다. 이 도면은 EF1-a가 Lenti-X™ 293T 세포에서 강력한 프로모터이고, PGK, SV40hCD3 및 MSCVU3은 Lenti-X™ 293T 세포에서 더 약한 프로모터임을 보여준다.

[0922] 이 실시예에서, 패키징 세포주에서 강력한 프로모터인 EF1-a 프로모터는 렌티바이러스 게놈에서 역배향으로 삽입될 때 바이러스 역가를 크게 감소시키는 것으로 나타났다. 대조적으로, 패키징 세포주에서 더 약한 프로모터

인 PGK, SV40hCD3 및 MSCVU3 프로모터는 역배향으로 삽입되었을 때 바이러스 역가에 저해 효과가 없었다. 높은 바이러스 역가를 유지하기 위해, 바이시스트론 벡터를 설계할 때, 패키징 세포주에서 강하게 활성인 임의의 프로모터(예를 들어, EF1-a 프로모터)는 정배향으로 배치하는 한편, 패키징 세포주에서 비활성이거나 단지 약한 활성인 프로모터(예를 들어, 유도성 NFAT-반응성 프로모터 또는 조직-특이적 프로모터)는 역배향으로 배치되도록 주의를 기울였다.

[0923] 실시예 7. 높은 역가, 제1 전사 단위의 유도성 발현 및 프로모터 간섭에 의해 감소되지 않는 제2 전사 단위의 구성적 발현을 나타내는 발산성 전사 단위를 갖는 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터.

[0924] 이 실시예에서, 각 벡터가 유도성 및 구성적으로 발현된 전사 단위를 모두 포함하도록 자가-구동 CAR을 암호화하는 일련의 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터를 생성하였다. 이러한 바이시스트론 벡터는 높은 바이러스 역가에 의해 입증된 바와 같이 바이러스 입자로 효율적으로 패키징할 수 있었다. 이러한 바이러스 입자로 형질도입된 저각 세포에서 전사 단위의 구성적 및 유도성 발현을 조사하였다. 프로모터 간섭의 임의의 바람직하지 않은 특성을 나타내지 않는 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터 구성을 확인하였다. 제1 전사 단위로부터의 유도성 전사는 제2 전사 단위로부터의 구성적 전사의 존재하에 광범위한 동적 범위의 유도성을 나타내었다. 또한, CAR-발현 전사 단위에서 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터에 의해 구동된 단백질 발현의 수준은 유도성 전사 단위의 존재에 의해 감소되지 않았다.

[0925] 도 12a의 개략도에 나타난 구조를 갖는 발산성 전사 단위를 갖는 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터를 생성하였다. 각 벡터는 5'에서 3'로, 유도성 프로모터로 역배향으로 암호화된 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터로 정배향으로 암호화된 제2 전사 단위로 구성된다. 제1 전사 단위는 6개의 NFAT-결합 부위(서열번호 355)를 갖는 최소 IL-2 프로모터의 전사 제어하에 림프증식성 요소에 이어 폴리아데닐화된 서열을 암호화하였다. 이 실시예에서 사용된 각 테스트 벡터의 림프증식성 요소는 동일하였고, eTag 및 c-Jun 도메인의 5' 말단을 포함하는 세포의 도메인(P1)(서열번호 104), CSF2RA로부터의 막관통 도메인(P2)(서열번호 129), MPL로부터의 제1 세포내 도메인(P3)(서열번호 283) 및 CD40으로부터의 제2 세포내 도메인(P4)(서열번호 208)에 해당하는 4개 부분 E006-T016-S186-S050을 포함하였다. 제2 전사 단위는 EF1-a 또는 PGK 프로모터의 전사 제어하에 제1세대 CAR을 암호화하였다. 이 실시예에서 사용된 각 테스트 벡터의 CAR은 동일하였고, CD19에 대해 지시된 ASTR, CD8의 줄기 및 막관통 부분 및 CD3z로부터의 세포내 활성화 도메인을 포함하였다. 달리 나타내지 않는 한, 벡터는 제1 전사 단위 및 제2 전사 단위 사이에 절연체 요소를 포함하였다. 테스트된 다양한 바이시스트론 렌티바이러스 벡터는 hGH 폴리A(서열번호 316) 또는 SPA2(서열번호 318)인 제1 전사 단위의 말단에 있는 폴리아데닐화 신호;뿐만 아니라 제1 전사 단위 및 제2 전사 단위 사이에 다음의 다양한 절연체를 포함하였다: b-글로빈 폴리A 스페이스 B(서열번호 356), b-글로빈 폴리A 스페이스 A(서열번호 357), 250 cHS4 절연체 v1(서열번호 358), 250 cHS4 절연체 v2(서열번호 359), 650 cHS4 절연체(서열번호 360), 400 cHS4 절연체(서열번호 361), 650 cHS4 절연체 및 b-글로빈 폴리A 스페이스 B(서열번호 362), b-글로빈 폴리A 스페이스 B 및 650 cHS4 절연체(서열번호 363) 또는 절연체 스페이스 C 없음(서열번호 365).

[0926] 4종 벡터 패키징 시스템을 사용하여 30ml의 FIXT의 일시적 형질감염에 의해 재조합 렌티바이러스 입자를 생성하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 PEG 침전에 의해 정제하였다. 각 샘플을 3 mg/ml HSA가 포함된 0.3ml PBS에 재현탁시켰다.

[0927] 형질도입을 위해, 저각 세포를 0.2ml 배양 배지(RPMI 1640 + 10% FBS) 중 웰당 1×10^6 개의 세포로 96 웰 플레이트의 웰에 시딩하였다. 바이러스 입자를 5의 MOI로 첨가하고, 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 48시간 후, 샘플을 펠릿화하고, 자극되지 않은 샘플의 경우 단독으로 0.2ml의 배양 배지에 재현탁시키거나 또는 자극된 샘플의 경우 20nM 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트(PMA) 및 1 µg/ml 아이오노마이신에 보충된 배양 배지에 재현탁시키고, 37°C 및 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 샘플을 자극 후 24시간에 수확하였다. 세포를 eTag 및 CD19 CAR에 대해 각각 염색하기 위해 바이오틴화-세탁시말에 이어 PE-스트렙타비딘 및 FITC-hCD19와 함께 인큐베이션하고, 림프구 게이트를 사용하여 유세포 분석에 의해 분석하였다.

[0928] 결과

[0929] 도 12b는 이 실시예에서 테스트된 각 렌티바이러스 게놈 벡터의 정제, 특징 및 전체 크기와 함께 역가를 보여준다. 6개의 작제물(F1-3-635, F1-3-637, F1-3-645, F1-3-654, F1-3-655 및 F1-3-662)의 바이러스 패키징은 9.0×10^7 TU/ml 초과 역가를 산출하였다. 이러한 역가는 벡터가 제1 전사 단위는 NFAT-반응성 유도성 프로모터의 제어하에 역배향으로 암호화되고, 제2 전사 단위는 강한 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터인 EF1-a의 제어

하에 정배향으로 암호화되는 발산성 전사 단위를 암호화할 때, 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터가 높은 역가를 산출할 수 있음을 보여준다. 또한, 이러한 높은 역가는 8.49kb만큼 큰 게놈 벡터로 달성되었다. 이 실시예의 대조군은 EF1-a 프로모터를 사용하여 정배향으로 단일 전사 단위만을 암호화하였다. eTag가 있는 CD19 CAR을 암호화하는 F1-3-23은 1.24×10^8 의 역가를 가졌다. eTag를 암호화하는 F1-0-01은 2.53×10^8 의 역가를 가졌다. 이러한 더 작은 대조군 벡터는 상당히 더 큰 바이시스트론 벡터로 얻어진 가장 높은 역가와 유사한 역가를 가졌다.

[0930]

eTag 및 CD19 CAR의 발현은 샘플을 림프구 게이트를 사용하여 살아있는 세포의 유세포 분석에 의해 PMA 및 아이오노마이신으로 자극한(또는 비-자극된 상태로 남겨진) 후 24시간에 측정하였다. 테스트된 각각의 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터는 eTag를 발현하는 세포의 백분율 및 세포 표면 상의 eTag의 양 모두에 의해 측정되는 바와 같이 제1 전사 단위의 유도성 발현을 나타내었다. eTag를 발현하는 CD19 CAR+ 세포의 백분율은 도 13 및 표 3에 나타나 있다. 테스트된 각 벡터에 대해, eTag를 발현하는 세포의 백분율은 자극에 대한 반응으로 증가하였다. 배수 유도는 1.4-배(F1-3-658)에서 35.0-배(F1-3-643)까지 다양하였다. 배수 유도에 대한 가장 중요한 기여는 2.25%(F1-3-655)에서 50.23%(F1-3-657)까지 다양한 eTag를 발현하는 비-자극된 세포의 백분율이었다. 유도성 프로모터의 제어하에 제1 전사 단위로부터 eTag의 일러한 백그라운드 발현은 제2 전사 단위를 구동하는 특정 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터 및 제1 전사 단위와 제2 전사 단위 사이의 절연체 모두에 의해 영향을 받았다. PGK 프로모터를 사용한 작제물과 비교하여 EF1-a 프로모터를 사용한 작제물에서 eTag의 더 적은 백그라운드 발현이 관찰되었다. EF1-a 프로모터 및 절연체를 사용하는 벡터로 형질도입된 비-자극된 CD19 CAR+ 세포에서 eTag의 백그라운드 발현은 1차 실험에서 2.25%(F1-3-655)에서 5.97%(F1-3-638)까지 다양하였다(표 3 및 도 13). 2차 실험에서, EF1-a 프로모터를 사용하고 절연체를 포함하지 않는 벡터로 형질도입된 비-자극된 세포에서 eTag의 백그라운드 발현은 10.91%였다(표 3). 대조적으로, PGK 프로모터 및 절연체를 포함하는 벡터로 형질도입된 비-자극된 CD19 CAR+ 세포에서 eTag의 백그라운드 발현은 12.25%(F1-3-659)에서 50.23%(F1-3-657)까지 다양하였다(표 3 및 도 13). 이러한 결과는 절연체의 부재와 비교할 때 테스트된 절연체 각각이 제1 전사 단위의 유도성 프로모터로부터 백그라운드 전사를 감소시켰음을 보여준다. 제2 전사 단위의 발현을 구동하는 PGK 프로모터가 있는 벡터에서 테스트된 절연체 중에서, 650 cHS4 절연체를 역배향으로 암호화하는 F1-3-659는 e-Tag 발현의 가장 낮은 백그라운드 및 가장 큰 배수 유도를 가졌다. 세포 표면에 발현된 eTag의 양은 또한 평균 형광 강도에 의해 측정된 바와 같이 자극에 대한 반응으로 유도되었다(도 14). 벡터 F1-3-635 및 F1-3-637은 가장 높은 수준의 eTag를 발현하였다(도 14).

표 3

eTag 를 발현하는 CD19 CAR+저각 세포의 백분율

ID#	비-자극된 eTag%	자극된 eTag%	배수 변화	비-자극된 eTag%	자극된 eTag%	배수 변화
	1 차 실험			2 차 실험		
F1-3-635	3.67	84.53	23.0	-	-	-
F1-3-636	4.41	75.35	17.1	-	-	-
F1-3-637	5.61	82.14	14.6	3.64	70.16	19.3
F1-3-638	5.97	83.52	14.0	4.77	75.61	15.9
F1-3-642	3.17	70.57	22.3	2.59	65.91	25.4
F1-3-643	2.79	75.44	27.0	1.99	69.61	35.0
F1-3-644	3.74	75.13	20.1	-	-	-
F1-3-645	3.12	75.3	24.1	-	-	-
F1-3-654	2.56	60.81	23.8	-	-	-
F1-3-655	2.25	69.59	30.9	-	-	-
F1-3-657	50.23	90.47	1.8	-	-	-
F1-3-658	43.63	60.05	1.4	-	-	-
F1-3-659	12.25	88.17	7.2	-	-	-
F1-3-662	-	-	-	10.91	76.61	7.0
F1-3-23	99.90	99.94	1.0	99.30	99.00	1.0

[0931]

[0932]

제2 전사 단위로부터의 발현은 FITC-표지된 인간 CD19를 사용하여 CD19 CAR을 검출함으로써 측정하였다. 도 15에 나타난 바와 같이, CD19 CAR을 발현하는 세포의 백분율은 자극 여부에 관계없이 임의의 주어진 백터에 대해 거의 동일하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, F1-3-636을 제외하고, 자극의 부재하에 세포 표면 상의 CAR 발현의 양은 대조군 F1-3-23과 비교할 때 EF1-a 프로모터의 제어하에 CAR 발현을 나타내는 세포에 대해 감소하지 않았다. 세포 표면 상의 CAR 발현은 CAR이 EF1-a 프로모터의 제어하에 있는 바이시스트론 백터로 형질도입된 저각 세포의 자극 후에 증가하였다(도 16). 이론에 얽매이지 않고, 이러한 증가된 수준의 표면 발현은 PMA 및 아이오노마이신으로 자극된 저각 세포의 증가된 대사 상태의 결과일 수 있다.

[0933]

이 실시예는 5'에서 3'로, 유도성인 역배향으로 암호화된 제1 전사 단위 및 구성적인 정배향으로 암호화된 제2 전사 단위를 포함하고, 선택적으로 제1 전사 단위와 제2 전사 단위 사이에 절연체가 있는 발산성 전사 단위를 갖는 신규한 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 백터 구성을 개시한다. 적어도 9.0×10^7 TU/ml의 바이러스 역가에 의해 입증된 바와 같이 바이러스 입자로 효율적으로 패키징되고, 저각 세포에 형질도입될 때 구성적 전사 단위로부터의 발현 감소 없이 유도성 전사 단위의 발현의 적어도 14-배의 증가를 유도할 수 있는 5개의 특정 백터 설계가 개시되어 있다.

[0934]

실시예 8. 자가-구동 CAR을 생성하기 위한 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 백터를 암호화하는 재조합 레트로바이러스 입자를 사용한 활성화된 PBMC의 형질도입.

[0935]

이 실시예에서, PBMC를 실시예 7로부터의 2개의 대표적인 바이시스트론 백터(F1-3-635 및 F1-3-637)로 형질도입시키고, 2개의 모노시스트론 백터(F1-3-23 및 F1-3-247)와 비교하였다. 형질도입된 PBMC를 CD19 CAR에 대한 CD19 표적을 발현하는 라지 세포로 시간이 경과함에 따라 반복적으로 자극하였다. 이러한 자극은 림프증식성 요소의 유도된 발현 및 형질도입된 세포의 증식을 초래하였다.

[0936]

이 실시예에서 사용된 작제물은 F1-3-23, F1-3-247, F1-3-635 및 F1-3-637이었다. 간략하게는, 각 작제물은 항-CD19scFv, CD8 줄기 및 막관통 영역, 및 T 세포 및 NK 세포에서 구성적으로 활성화된 EF1-a 프로모터에 의해 구동되는 CD3z로부터의 세포내 도메인을 포함한 동일한 제1세대 CAR을 암호화하였다. F1-3-23 및 F1-3-247은 CAR

다음에 T2A 및 eTag(F1-3-23) 또는 표 1의 E006-T016-S186-S050 부분으로 구성된 림프증식성 요소(eTag 0A JUN-CSF2RA-MPL-CD40)(F1-3-247)가 뒤따르는 모노시스트론 벡터였다. F1-3-635 및 F1-3-637은 실시예 7에 기재된 바와 같이 발산성 전사 단위를 갖는 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터였다. 간략하게는, F1-3-635 및 F1-3-637은 F1-3-247에서 발견되는 동일한 E006-T016-S186-S050 림프증식성 요소로 구성된 제1 전사 단위를 포함하지만, NFAT-반응성 최소 IL-2 프로모터의 제어하에 있으며 역배향으로 암호화되었다. 제2 전사 단위는 구성적 EF1-a 프로모터하에 CD19 CAR을 암호화하였다. 제1 전사 단위 및 제2 전사 단위는 F1-3-635의 경우 b-글로빈 폴리A 스페이서 A인 절연체(서열번호 357) 또는 F1-3-637의 경우 정배향의 250 cHS4 절연체(서열번호 358)에 의해 분리되었다.

[0937] 4종 벡터 패키징 시스템을 사용하여 30ml의 F1XT의 일시적 형질감염에 의해 재조합 렌티바이러스 입자를 생성하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 PEG 침전에 의해 정제하였다. 각 샘플을 3 mg/ml HSA가 포함된 0.3ml PBS로 재현탁시켰다.

[0938] 제0일에, 단일 공여자로부터의 PBMC를 제조업체의 지침에 따라 Ficoll-Paque PREMIUM®(지이 헬스케어 라이프 사이언시스(GE Healthcare Life Sciences))로 밀도 구배 원심분리 후 적혈구를 용해에 의해 버퍼 코트(샌디에이고 혈액 은행)로부터 농축시켰다. 1.5×10^6 개의 생존 가능한 PBMC를 100 IU/ml(IL-2), 10 ng/ml IL-7 및 50 ng/ml 항-CD3 항체(317326, 바이올레전드(Biolegend))가 보충된 3ml의 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM이 담긴 G-Rex 6 웰 플레이트(윌슨 울프, 80240M)의 웰에 시딩하여 바이러스 형질도입을 위해 PBMC를 활성화하였다. 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션 후, 위에 기재된 작제물을 포함하는 렌티바이러스 입자를 5의 MOI로 활성화된 PBMC에 직접 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM을 사용하여 각 웰의 배지 부피를 30ml로 만들고, 플레이트를 인큐베이터에 되돌려 놓았다.

[0939] 제7일에 각 웰로부터 세포를 수집하고, 세척하고, 1ml의 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM이 담긴 G-Rex 24 웰 플레이트의 웰에 0.5×10^6 개의 세포로 다시 시딩하였다. CD19 CAR에 의해 인식되는 CD19를 발현하는 1×10^6 라지를 "유가"로 지정된 샘플에 첨가하거나 또는 라지 세포를 "비유가"로 지정된 샘플에 첨가하지 않았다. 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM을 사용하여 각 웰의 부피를 최대 7ml로 만들었다. 이 단계 또는 후속 세포 배양 단계에서 IL-2, IL-7 또는 기타 외인성 사이토카인을 첨가하지 않았다. 3ml의 배지를 제거하고 1×10^6 개의 라지 세포를 포함하는 새로운 배지로 교체함으로써 15일까지 격일로 공급된 형질도입된 PBMC 샘플에 라지 세포를 첨가하였다. 형질도입된 PBMC의 세포 밀도는 제15일에 매우 높았으므로 공급 프로토콜을 수정하였다. 제15일에 시작하여, 1.0×10^6 개의 CAR+ 세포를 새로운 G-Rex 24 웰 플레이트의 웰에 다시 시딩하고, 1×10^6 개의 라지 세포를 첨가하고, 부피를 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 배지를 사용하여 7ml로 만들었다.

[0940] CAR+ T 세포 및 NK 세포의 확장을 분석하기 위해, 100μl의 세포를 각 시점에서 제거하고, CD3, eTag 및 CD19 CAR의 발현에 대해 염색하였다. 유세포 분석을 사용하여 총 살아있는 세포 및 CD3, eTag 및 CD19 CAR을 발현하는 세포의 백분율을 계산하였다. 총 CD3+CAR+ 세포는 림프구 게이트의 총 살아있는 세포에 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 곱하여 계산하였다. eTAG%는 살아있는 CD3+CAR+ 집단 내에서 결정하였다.

[0941] 결과

[0942] 이 실시예에서, 활성화된 PBMC는 역배향으로 NFAT-반응성 최소 IL-2 프로모터에 이어 절연체의 제어하에 eTag된 림프증식성 요소 E006-T016-S186-S050을 포함하는 제1 전사 단위 및 정배향으로 EF1-a 프로모터의 제어하에 제1 세대 CD19 CAR을 암호화하는 제2 전사 단위를 암호화하는 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터를 포함하는 바이러스 입자로 형질도입되었다. 그런 다음, 이러한 형질도입된 PBMC를 CAR을 발현하는 세포 표적, 이 경우 CD19-발현 라지 세포로 격일로 자극(본 명세서에서 "공급(feeding)"으로 지칭됨)하거나 또는 비유가 상태로 두었다. 도 17에 나타난 바와 같이, 제2 전사 단위로부터 발현된 CAR의 활성화는 제2 전사 단위로부터 eTag된 림프증식성 요소의 유도성 발현을 유도하였다. 이 실시예에서, eTag를 발현하는 세포의 백분율은 자극 후 24시간에 증가한 다음 자극 후 48시간까지 원래의 백분율 근처로 감소하였으며, 이때 세포는 공급에 의해 다시 자극되었다. 이러한 패턴은 각각 6회의 공급 동안 반복되었다.

[0943] 격일로 공급함으로써 구성적으로 발현된 CAR의 활성화는 eTag된 림프증식성 요소의 유도성 발현을 유도하였고, 이는 이어서 CD3+CAR+ 세포의 증식을 초래하였다. F1-3-635로 형질도입된 PBMC는 도 18a에 나타난 바와 같이 23일에 걸쳐 15,000-배 이상 확장되었다. F1-3-637로 형질도입된 PBMC는 도 18b에 나타난 바와 같이 23일에 걸쳐

3,000-배 이상 확장되었다. 대조적으로, CD19 CAR을 갖지만 림프증식성 요소는 결여된 F1-3-23으로 형질도입된 PBMC는 도 18c에 나타난 바와 같이 23일까지 40-배 미만으로 확장되었다. 림프증식성 요소를 구성적으로 발현하는 F1-3-247로 형질도입된 PBMC는 도 18d에 나타난 바와 같이 190,000-배 확장되었다. F1-3-635, F1-3-637 및 F1-3-247로 형질도입된 PBMC에 의한 가장 많은 확장이 15에서 23일 사이의 8일 동안 발생하였다는 점은 주목할 만하다. 이는 세포가 15일 이전에 고밀도였고, 각 후속 공급에서 웰당 1.0×10^6 개의 CAR+ 세포로 세포를 다시 시딩하여 확장할 공간을 허용하였기 때문일 수 있다. 대조적으로, 공급에 의한 사이토카인의 첨가 및 CAR 활성화의 부재하에, 림프증식성 요소의 발현은 F1-3-635 또는 F1-3-637로 형질도입된 PBMC에서 유도되지 않았고, 이러한 세포의 증식(FIG 19에 도시됨) 및 생존능력 백분율(도 20에 도시됨)은 F1-3-23으로 형질도입된 PBMC보다 크지 않았다. 그러나, 림프증식성 요소를 구성적으로 발현하는 F1-3-247로 형질도입된 PBMC는 F1-3-23으로 형질도입된 세포보다 더 크게 확장되었고, 생존 능력은 10일에서 23일까지 대략 50%로 유지되었다. 비유가 샘플에서, F1-3-635 또는 F1-3-637로 형질도입된 PBMC는 9일 전에 F1-3-247로 형질도입된 PBMC와 유사한 초기 확장 및 생존능력 백분율을 나타내었다. 이러한 효과는 CD3z를 통해 NFAT를 활성화하는 항-CD3 항체를 이용한 PBMC의 활성화에 의해 유발된 NFAT-반응성 프로모터로부터의 전사 때문일 수 있다(도 19).

[0944] 이 실시예는 CAR-자극 유도성 프로모터의 전사 제어하에 림프증식성 요소를 암호화하는 제1 전사 단위 및 구성적 T 세포 또는 NK 세포 프로모터의 전사 제어하에 CAR을 암호화하는 제2 전사 단위를 포함하는 발산성 전사 단위를 갖는 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 사용하여 림프구를 형질도입하여 항원의 존재하에서만 증식하고 생존하는 자가-구동 CAR T 세포를 생성할 수 있음을 입증한다. 따라서, 자가-구동 CAR T 세포는 항원-발현 세포에 대한 면역 반응을 일으킬 것이고, 자가-구동 CAR T 세포가 CAR T 세포를 자극하기 위해 항원-발현 세포를 제거하여 고갈되면 면역 반응은 해결될 것이다.

[0945] **실시예 9. 전혈을 바이시스트론 게놈 벡터를 암호화하는 렌티바이러스 입자에 4시간 동안 노출시킨 후 PBMC 농축 절차를 거쳐 피하로 투여하여 제조된 자가-구동 CAR은 무린 모델에서 전신 인간 버킷 림프종에 대한 효능을 나타낸다**

[0946] 이 실시예에서, 자극되지 않은 인간 T 및 NKT 세포를 바이시스트론 게놈 벡터를 암호화하는 복제 불능 재조합(RIR) 레트로바이러스 입자를 사용하는 rPOC 세포 처리 방법에 의해 유전적으로 변형시켜 CD19 또는 CD22에 대해 지시된 CAR 및 림프증식성 요소를 발현하는 자가-구동 CAR 세포를 생성하였다. 세포 처리 작업흐름은 170C의 선택적 단계를 수행하지 않고, 모든 단계를 폐쇄형 시스템에서 수행하지 않은 것을 제외하고는 도 1c에 나타난 바와 같이 수행하였다. 자가-구동 PBMC를 전신 라지-luc 종양이 있는 NSG MHC I/II 녹아웃 마우스에 피하로 주사하였다. 마우스를 종양 부담 및 생존에 대해 평가하였다.

[0947] 이 실시예에서 사용된 재조합 렌티바이러스 입자는 F1-3-637 또는 F1-4-713 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터를 포함하였다. F1-3-637은 실시예 8에 설명되어 있다. 두 작제물은 모두 각각 F1-3-637 및 F1-4-713에 대해 CD19 및 CD22에 대해 지시된 CAR의 ASTR을 제외하고는 동일하였다. 두 레트로바이러스 입자는 모두 VSV-G로 슈도타이핑되고, T 세포 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하며, 실시예 1에 기재된 바와 같이 10리터의 중간 규모로 5종의 플라스미드 프로토콜을 사용하여 F1XT 세포를 형질감염시켜 생산되었다. 바이러스 상청액을 침출 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용여과 및 제형화의 조합에 의해 정제하여 비-인간 동물 단백질이 없는 실질적으로 순수한 바이러스 입자(F1-3-637GU 및 F1-4-713GU)를 생성하였다.

[0948] 동의를 얻은 건강한 자원자로부터의 전혈을 헤파린이 담긴 튜브에 수집하였다. 75ml을 2개의 혈액 백에 각각 옮겼다. 전혈이 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 혈구 분별 또는 농축을 수행하지 않았다. 1.0×10^6 개 CD3+ 세포/ml의 혈액이 있다는 가정에 기초하여 5의 MOI로 바이러스가 첨가되도록 3.75×10^8 TU의 F1-3-637GU(7.31ml)를 하나의 혈액 백에 첨가하고, 3.75×10^8 TU의 F1-3-713GU(13.07ml)을 다른 백에 첨가하였다. 백을 5회 뒤집어 내용물을 혼합한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 접촉 시간 후, PBMC를 제조업체의 지침에 따라 2회 세척 사이클을 사용하는 Sepax 2 S-100 장치(바이오세이프; 14000)에서 CS-900.2 키트(바이오세이프; 1008)를 사용하여 Ficoll-Paque™(제너럴 일렉트릭)로 농축된 밀도 구배 원심분리하여 각 실험으로부터 45ml의 분리된 PBMC를 얻었다. Sepax 2 과정에서 사용된 세척 및 최종 재현탁 용액은 생리 식염수(케니신 팜) + 2% 인간 혈청 알부민(HSA)(쓰촨 위안다 슈양 파마슈티칼)이었다. 세포를 계수하고, 각 형질도입으로부터의 7.5×10^7 개의 세포를 400g에서 5분 동안 펠릿화하고, 3ml 생리 식염수 + 2% HSA에 2.5×10^7 개 세포/ml를 재현탁시켰다.

- [0949] 항-CD19, 항-CD22 및 항-CD19와 항-CD22 자가-구동 CAR의 조합이 전신 인간 버킷 림프종의 모델을 치료하는 능력을 마우스 모델에서 조사하였다. 암컷 NSG-(KbDb)넬(IA)넬(MHC I 및 II 이중 넉아웃) 마우스를 이 연구에서 사용하였다. -4일에 종양 발생을 위해 각 마우스에 $100\mu\text{L}$ 의 PBS 중 3.0×10^5 개의 라지-루시퍼레이스 세포를 정맥내 꼬리 정맥 주사를 통해 접종하였다. 라지 세포는 자연적으로 CD19 및 CD22를 모두 발현한다. 25마리의 마우스를 $200\mu\text{L}$ 의 PBS 중 테스트 약품을 피하로 투여하기 위해 무작위로 5개의 그룹(5마리의 마우스/그룹)으로 할당하였다. 각 그룹의 마우스에 제0일에 다음 테스트 약품을 투여하였다: G1, PBS; G2, 5.0×10^6 개의 형질도입되지 않은 PBMC; G3, F1-3-637GU로 형질도입된 5.0×10^6 개의 PBMC; G4, F1-4-713으로 형질도입된 5.0×10^6 개의 PBMC; 및 G5, F1-3-637GU로 형질도입된 2.5×10^6 개의 PBMC 및 F1-4-713GU로 형질도입된 2.5×10^6 개의 PBMC.
- [0950] 마우스를 생물방광 이미징(파킨엘머(PerkinElmer), IVIS Lumina Series II)에 의해 종양 성장에 대해 평가하고, LivingImage 소프트웨어로 분석하였다. 도 21에 나타난 바와 같이, F1-3-637GU로 형질도입된 PBMC 단독 또는 F1-4-713GU로 형질도입된 PBMC와 조합된 F1-3-637GU로 형질도입된 PBMC는 이러한 자가-구동 CAR의 피하 전달 후 15일까지 전신 라지 종양을 해결하였다. 유사하게는, F1-3-637GU로 형질도입된 PBMC 단독은 28일까지 전신 라지 종양을 해결하였다. 대조적으로, 형질도입되지 않은 PBMC 또는 PBS를 투여 받고 아직 살아 있는 마우스는 10^8 p/s보다 큰 총 평균 플럭스로 표시된 바와 같이 14일부터 28일까지 상당한 종양 부담을 가졌다.
- [0951] 생존 분석은 도 22에 나타나 있다. G4 및 G5의 5마리 모두 8주 동안 생존하였다. G3에서, GVHD의 조직학적 징후를 보인 종양 부담이 제15일에 해결된 후 제30일과 제50일에 한 마리의 마우스가 죽은 채로 발견되었다. 대조적으로, G2 및 G1의 어떠한 마우스도 각각 49일 및 16일 후에 생존하지 못하였다.
- [0952] 이 실시예는 바이시스트론 계능 백터를 암호화하고 표면에 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하는 렌티바이러스 입자가 4시간 동안 전혈과 함께 인큐베이션될 때 PBMC를 형질도입시킬 수 있음을 보여준다. 피하로 전달되었을 때, 림프증식성 요소를 발현하는 자가 구동 CAR 및 CD19 또는 CD22에 대해 지시된 CAR인 이러한 형질도입된 PBMC는 생체내에서 확장하며 전신 라지 종양을 제거할 수 있다. 전신 라지 종양을 제거하는 능력은 CD19 단독, CD20 단독에 대해 지시된 자가-구동 CAR 또는 두 CD19 및 CD22에 대해 지시된 CAR의 조합이 마우스에 전달되었을 때 관찰되었다.
- [0953] **실시예 10. 4시간 동안 재조합 레트로바이러스 입자에 대한 백혈구감소 필터 상의 TNC의 노출에 의한 자극되지 않은 림프구의 유전적 변형.**
- [0954] 이 실시예에서, TNC 포획을 포함하는 2가지 상이한 세포 처리 작업 흐름에 의한 림프구의 유전적 변형을 나란히 비교하였다. 제1 세포 처리 작업흐름("1D")은 170D 및 180D의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160D의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 실시예 4에 기재된 바와 같고 도 1d에 나타난 바와 같았다. 이러한 제1 과정에서, 자극되지 않은 인간 T 세포 및 NKT 세포는 전혈 및 VSV-G로 슈도타이핑되고, 표면에 T 세포 활성화 요소를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자가 포함된 반응 혼합물의 37°C , 5% CO_2 에서 4시간 인큐베이션에 의해 효과적으로 유전적으로 변형되었다. 총 유핵 세포(TNC)를 백혈구감소 필터 상의 형질도입 반응 혼합물로부터 포획하고, 세척하고, 백혈구제거 필터 어셈블리의 역관류에 의해 수집하였다. 제2 세포 처리 작업흐름("1B")은 170B 및 180B의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160B의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 도 1b에 나타난 바와 같았다. 이러한 과정에서, 전혈을 백혈구감소 필터에 전혈을 통과시켜 TNC를 포획하고, 자극되지 않은 인간 T 세포 및 NKT 세포는 TNC 및 제1 세포 과정에서 사용된 동일한 레트로바이러스 입자가 포함된 필터 상의 반응 혼합물의 4시간 인큐베이션에 의해 효과적으로 유전적으로 변형되었다. 필터에서 4시간 후, 세포를 세척하고, 백혈구제거 필터 어셈블리의 역관류에 의해 수집하였다. 각 경우에, 형질도입된 TNC를 rIL-2와 함께 배양물에 넣었다. CD3+ 세포의 형질도입을 유세포 분석을 사용하여 CAR 폴리클로나이드의 발현에 의해 제6일에 평가하였다. CAR-T 기능을 제7일에 IFN 감마 생산에 의해 테스트하였다.
- [0955] 이 실시예에서, TNC 포획을 포함하는 2가지 상이한 세포 처리 작업 흐름에 의한 림프구의 유전적 변형을 나란히 비교하였다. 제1 세포 처리 작업흐름("1D")은 170D 및 180D의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160D의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 실시예 4에 기재된 바와 같고 도 1d에 나타난 것과 같았다. 이러한 제1 과정에서, 자극되지 않은 인간 T 세포 및 NKT 세포는 전혈 및 VSV-G로 슈도타이핑되고, 표면에 T 세포 활성화 요소를 디스플레이하는 레트로바이러스 입자가 포함된 반응 혼합물의 37°C , 5% CO_2 에서 4시간 인큐베이션에 의해 효과적으로 유전적으로 변형되었다. 총 유핵 세포(TNC)를 후속적

으로 백혈구감소 필터 상의 형질도입 반응 혼합물로부터 포획하고, 세척하고, 백혈구제거 필터 어셈블리의 역관류에 의해 수집하였다. 제2 세포 처리 작업흐름("1B")은 170B 및 180B의 선택적 단계를 수행하지 않고, 단계 160B의 최종 세포를 배양물에 넣고, 과정의 일부만을 폐쇄형 시스템에서 수행한 것을 제외하고는 도 1b에 나타난 바와 같았다. 이러한 과정에서, 전혈을 백혈구감소 필터에 통과시켜 TNC를 포획하고, 자극되지 않은 인간 T 세포 및 NKT 세포를 TNC 및 제1 세포 과정에서 사용된 동일한 레트로바이러스 입자가 포함된 필터 상의 반응 혼합물의 4시간 인큐베이션에 의해 효과적으로 유전적으로 변형되었다. 필터에서 4시간 후, 세포를 세척하고, 백혈구제거 필터 어셈블리의 역관류에 의해 수집하였다. 각 경우에, 형질도입된 TNC를 rIL-2와 함께 배양물에 넣었다. CD3+ 세포의 형질도입을 유세포 분석을 사용하여 CAR 폴리펩타이드의 발현에 의해 제6일에 평가하였다. CAR-T 기능을 제7일에 IFN 감마 생산에 의해 테스트하였다.

[0956] VSV-G로 슈도타이핑되고 T 세포 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI(F1-3-637GU)를 디스플레이하는, F1-3-637(실시에 8에 기재됨)을 암호화하는 재조합 렌티바이러스 입자를 10리터의 중간 규모로 5종의 플라스미드 프로토콜을 사용하여 F1XT 세포를 형질감염시킴으로써 생성하였다. 바이러스 상청액을 실시에 1에 기재된 바와 같이 심층 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용여과 및 제형화의 조합에 의해 정제하여 비-인간 동물 단백질이 없는 실질적으로 순수한 F1-3-637GU 바이러스 입자를 생성하였다.

[0957] 세포 처리 작업흐름 1D의 경우, 건강한 인간 공여자로부터의 12ml의 헤파린 처리된 전혈을 혈액 백(CS50, 오리젠(Origen))으로 옮겼다. 1.17ml의 재조합 렌티바이러스 입자 F1-3-637GU($5.13 \times 10^{7\text{TU/ml}}$)를 5의 MOI(1×10^6 개 PBMC/ml의 혈액으로 가정)로 12ml의 전혈 샘플에 직접 첨가하여 전혈의 림프구에 대한 렌티바이러스 입자의 접촉을 개시하고, 매시간 부드럽게 혼합하면서 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하여 임의의 침강을 방해하였다. 4시간 인큐베이션 후, Acrodisc® 백혈구제거 필터를 통해 혈액을 처리하여 TNC를 분리하였다. 그런 다음, 백혈구감소 필터(AP-4952, 폴) 어셈블리 위로 50ml의 NS-HSA 2%-헤파린 50 U/ml를 통과시켜 TNC를 세척하였다. 8ml NS-HSA 2%를 이용한 재관류에 의해 TNC를 20ml 주사기에 회수하고, 400g에서 5분 동안 원심분리하고, 완전 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증식 SFM("CTS 배지")에 재현탁시켰다. 3×10^6 개의 세포를 웰당 10 ng/ml rhIL-2이 포함된 3ml의 CTS 배지에서 배양하였다. 23ml의 추가적인 CTS 배지 및 10 ng/ml의 rhIL-2를 제2일 및 제4일에 첨가하였다.

[0958] 세포 처리 작업흐름 1B의 경우, 건강한 인간 공여자로부터의 12ml의 헤파린 처리된 전혈을 혈액 백으로 옮겼다. Acrodisc®을 통해 혈액을 처리하여 TNC를 분리하였다. 그런 다음, 백혈구감소 필터 위에 10ml의 NS-HSA 2%-헤파린 50 U/ml를 통과시켜 TNC를 3회 세척하였다. 1.17ml의 재조합 렌티바이러스 입자 F1-3-637GU(5.13×10^7 TU/ml)를 650μl의 HSA 및 780μl의 CTS 배지와 혼합하고, 37°C에서 유지된 650μl의 이러한 바이러스 용액을 0시간, 1시간, 2시간 및 3시간에 필터에 첨가하였다. 형질도입 혼합물과 함께 백혈구제거 필터를 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, Acrodisc® 위로 50ml의 NS-HSA 2%-헤파린 50 U/ml를 통과시켜 TNC를 세척하였다. 8ml의 NS-HSA2%를 이용한 재관류에 의해 TNC를 20ml 주사기에 회수하고, 400g에서 5분 동안 원심분리하고, CTS 배지에 재현탁시키고, 계수하였다(제0일). 1.5×10^6 개의 생존 TNC를 10 ng/ml rhIL-2가 보충된 3ml CTS 배지가 담긴 G-Rex 6 웰 플레이트(월슨 울프, 80240M)의 웰에 시딩하였다.

[0959] 일부 웰의 세포를 제6일에 수확하고, 유세포 분석에 의해 형질도입 효율 및 세포 표면 마커에 대해 분석하였다. IFN감마 방출에 의한 CAR-T 세포 기능의 분석을 위해, 제6일에, 세포를 처리하지 않은 상태로 두거나 또는 5:1 PBMC:표적의 비로 PMA(100mM) + 아이오노마이신(1μg/ml), CHO-S 또는 라지 표적 세포로 처리하고, 37°C, 5%CO₂에서 인큐베이션하였다. 16시간 후, 세포 배양 상청액을 수집하고, IFN감마에 대해 ELISA로 분석하였다.

[0960] 두 세포 과정은 동일한 공여자로부터의 12ml의 헤파린 처리된 전혈로 시작하였다. 제0일에 백혈구감소 필터에서 살아있는 TNC의 회수는 과정 1B의 경우 10.3×10^6 개의 세포였고, 과정 1D의 경우 5.0×10^6 개의 세포였다. 이러한 결과는 37°C, 5%CO₂에서 4시간 동안 형질도입 반응을 수행하면 TNC가 필터에 부착된다는 것을 시사한다. 이러한 부착은 회수를 방해하여, 더 짧은 인큐베이션 기간, 감소된 온도 및/또는 접촉 단계(도 1E 및 도 1F에 기재됨) 전에 백혈구감소 필터에서 세포를 용리하는 것을 포함하는 것과 같은 대안적 과정의 개발로 이어졌다. rhIL-2가 보충된 CTS 배지에서의 배양 6일 후 수확된 TNC의 세포 표면 마커 발현은 도 23에 나타나 있다. CD56+ 세포, CD3+CD4+ 및 CD3+CD8+ 세포의 백분율은 방법 1B 및 방법 1D에 의해 처리된 세포에서 대략 동등하였다. CD3 및 CAR 발현에 의해 결정된 바와 같이 형질도입된 T 세포의 백분율은 전혈(1B)에서의 형질도입의 경우 10.30%이고, 필터(1D) 상의 형질도입의 경우 14.28%였다. 이는 세포가 필터에 농축된 상태에서 형질도입될 때 형질도입 효율

이 38% 향상되었음을 나타낸다. 도 24는 과정 1B 또는 과정 1D에 의해 형질도입된 TNC가 라지 세포(F1-3-637에 의해 암호화된 항CD19 CAR의 CD19 표적을 발현함) 또는 PMA로의 자극에 유사한 정도로 반응하였으며, 이 수준은 이러한 방법으로 F1-3-637GU 레트로바이러스 입자에 의해 형질도입된 T 세포가 기능함을 나타내는 백그라운드 이상이었음을 보여준다.

[0961] 이러한 결과는 도 B1 및 도 D1에 나타난 세포 처리 작업 흐름이 세포 요법을 위한 실행 가능한 rPOC 작업 흐름임을 보여준다. 37℃에서 4시간 동안 백혈구감소 필터 상의 농축된 세포에 대해 형질도입 반응을 수행하면 형질도입 효율이 증가할 수 있지만, 필터에서 세포의 회수는 필터에 대한 세포의 부착으로 인해 방해받는다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 부착 세포는 활성화되어 그 결과 부착 분자를 발현하는 T 세포인 것으로 여겨진다. 이러한 세포의 높은 비율이 또한 형질도입된 것으로 여겨진다. 따라서, 과정의 개선은 인큐베이션 시간 및/또는 온도를 줄이고, 세척 및/또는 전달 용액을 수정하여 필터에 결합된 세포의 방출을 촉진하는 것과 같은 필터에 대한 세포의 부착을 저해하는 방법을 포함한다.

[0962] 실시예 11. 바이시스트론 게놈 벡터를 암호화하는 렌티바이러스 입자에 4시간 동안 노출시킨 후 TNC 농축 절차 또는 PBMC 농축 절차를 거쳐 제조된 자가-구동 CAR은 피하로 투여될 때 무린 모델에서 전신 인간 버킷 림프종을 제거할 수 있다

[0963] 이 실시예에서, 정제된 PBMC 대 TNC 접종의 효과를 비교하기 위해, 말초 혈액으로부터 새롭게 채취한 자극되지 않은 인간 T 및 NKT 세포를 바이시스트론 게놈 벡터를 암호화하는 복제 불능 제조합(RIR) 레트로바이러스 입자를 사용하여 해파린 처리된 전혈로부터 rPOC 세포 처리 방법에 의해 유전적으로 변형시켜 CD19에 대해 지시된 CAR 및 림프증식성 요소를 발현하는 자가-구동 CAR 세포를 생성하였다. 세포 처리 작업 흐름은 170C, 170D 및 180D의 선택적 단계를 수행하지 않고, 모든 단계를 완전 폐쇄형 시스템에서 수행하지 않은 것을 제외하고는 도 1c 및 도 1d에 나타난 것과 같이 수행하였다. 변형된 PBMC 또는 TNC 또는 대조군을 전신 라지-luc 종양이 있는 NSG 마우스에 피하로 주사하였다. 마우스를 종양 부담 및 생존에 대해 평가하였다.

[0964] 이 실시예에서 사용된 제조합 렌티바이러스 입자는 F1-3-637 바이시스트론 렌티바이러스 게놈 벡터를 포함하였다. F1-3-637은 실시예 8에 설명되어 있다. 레트로바이러스 입자는 VSV-G로 슈도타이핑되고, T 세포 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하며, 실시예 1에 기재된 바와 같이 10리터의 중간 규모로 5종의 플라스미드 프로토콜을 사용하여 F1XT 세포를 형질감염시킴으로써 생성되었다. 바이러스 상청액을 침출 여과, TFF, 벤조네이스 처리, 정용여과 및 제형화의 조합에 의해 정제하여 비-인간 동물 단백질이 없는 실질적으로 순수한 바이러스 입자(F1-3-637GU)를 생성하였다.

[0965] 동의를 얻은 건강한 자원자로부터의 전혈을 해파린이 담긴 튜브에 수집하였다. 각 실험 그룹에 대해 50ml를 사용하였다. 해파린 처리된 전혈이 레트로바이러스 입자와 접촉하기 전에 혈구 분별 또는 농축을 수행하지 않았다. 2.5×10^8 TU의 F1-3-637GU(5.13×10^7 TU/ml의 바이러스 입자를 갖는 4.87ml의 바이러스)를 바이러스가 1.0×10^6 개 CD3+ 세포/ml의 혈액의 가정에 기초하여 5의 MOI로 첨가되도록 2개의 그룹의 50ml의 해파린 처리된 혈액에 첨가하였다. 백을 5회 뒤집어 내용물을 혼합한 다음, 37℃, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 4시간 접촉 시간 후, 50ml의 대조군 혈액 또는 50ml의 F1-3-637GU TNC 샘플을 hematrate 필터에 로딩하고, 식염수 HSA 해파린으로 세척한 후, 동물에게 주사하기 위해 식염수 HSA로 용리하였다. PBMC의 경우, F1-3-637GU 및 50ml의 대조군 혈액을 제조업체의 지침에 따라 2회 세척 사이클을 사용하는 Sepax 2 S-100 장치(바이오세이프; 14000)에서 CS-900.2 키트(바이오세이프; 1008)를 사용하여 Ficoll-Paque™(제너럴 일렉트릭)로 밀도 구배 원심분리에 의해 농축시켜 각 실행으로부터 45ml의 단리된 PBMC를 얻었다. Sepax 2 과정에서 사용된 세척 및 최종 재현탁 용액은 생리 식염수(케니신 팜) + 2% 인간 혈청 알부민(HSA)(쓰촨 위안다 슈양 파마슈티칼)이었다. 세포를 계수하고, 각 그룹으로부터의 2.5×10^7 개의 세포를 생리 식염수 + 2% HSA에 2.5×10^7 개 세포/ml로 희석하였다.

[0966] 항-CD19 자가-구동 CAR-T 세포가 전신 인간 버킷 림프종의 모델을 치료하는 능력을 마우스 모델에서 조사하였다. 암컷 NSG 마우스를 이 연구에서 사용하였다. -4일에 종양 발생을 위해 각 마우스에 100μl의 PBS 중 3.0×10^5 개의 라지-루시퍼레이스 세포를 정맥내 꼬리 정맥 주사를 통해 접종하였다. 라지 세포는 자연적으로 CD19를 발현한다. 25마리의 마우스를 200μl의 테스트 약품을 피하로 투여하기 위해 무작위로 5개의 그룹(5마리의 마우스/그룹)으로 할당하였다. 각 그룹의 마우스에 제0일에 다음 테스트 약품을 투여하였다: G1, PBS; G2, 5×10^6 개의 형질도입되지 않은 TNC; G3, 5.0×10^6 개의 형질도입되지 않은 PBMC G4; F1-3-637로 형질도입된 $5.0 \times$

10^6 개의 TNC; 및 G5, F1-3-637GU로 형질도입된 5×10^6 개의 PBMC.

- [0967] 마우스를 생물방광 이미징(퍼킨엘머, IVIS Lumina Series II)에 의해 종양 성장에 대해 평가하고, LivingImage 소프트웨어로 분석하였다. 도 25에 나타난 바와 같이, 투여 후 2주까지, F1-3-637GU로 형질도입된 TNC 및 PBMC는 모두 자가-구동 CAR로 전신 라지 종양을 퇴행시키고 있었다. 대조적으로, PBS TNC 또는 PBMC를 투여받은 마우스는 종 플럭스에 의해 측정된 바와 같이 제14일에 상당한 종양 부담을 가졌다.
- [0968] 이 실시예는 바이시스트론 계놈 벡터를 암호화하고 표면에 활성화 요소 UCHT1-scFvFc-GPI를 디스플레이하는 렌티바이러스 입자가 전혈과 함께 4시간 동안 인큐베이션될 때 PBMC 또는 TNC를 형질도입시킬 수 있고, 대상체에 게 효과적으로 투여되어 항-종양 효과를 유도할 수 있음을 보여준다. 피하로 전달되었을 때, 림프증식성 요소 및 CD19에 대해 지시된 CAR을 발현하는 자가 구동 CAR인 형질도입된 PBMC 및 TNC 모두 생체내에서 확장되고 전신 라지 종양을 제거할 수 있었다.
- [0969] 개시된 실시형태, 실시예 및 실험은 본 개시내용의 범주를 제한하거나 또는 아래의 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험임을 나타내도록 의도되지 않았다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력하였지만 일부 실험 오류 및 편차를 고려하여야 한다. 기재된 방법의 변형은 실험이 설명하도록 의도된 기본 양태를 변경하지 않고 이루어질 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0970] 당업자는 본 개시내용의 범주 및 사상 내에서 많은 수정 및 다른 실시형태를 고안할 수 있다. 실제로, 기술된 물질, 방법, 도면, 실험, 실시예 및 실시형태의 변형은 본 개시내용의 기본적인 양태를 변경하지 않고 당업자에 의해 이루어질 수 있다. 임의의 개시된 실시형태는 임의의 다른 개시된 실시형태와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0971] 일부 예에서, 일부 개념은 특정 실시형태를 참조하여 설명되었다. 그러나, 당업자는 하기 특허청구범위에 기재된 본 발명의 범주를 벗어나지 않고 다양한 수정 및 변경이 이루어질 수 있음을 이해한다. 따라서, 명세서 및 도면은 제한적인 의미가 아니라 예시적인 것으로 간주되어야 하며, 이러한 모든 변형은 본 발명의 범주 내에 포함되도록 의도된다.

표 1

림프증식성 부분 P1-P2, P1, P2, P3 및 P4 의 도메인에 대한 부분, 명칭 및 아미노산 서열

부분	명칭	아미노산 서열
M001	eTAG IL7RA Ins PPCL (인러류긴 7 수용체)	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEDRCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVVMGENNITLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPINGPEINSSGEMDPILLPCLTISILSFFSVALLVILA CVL (서열번호 84)
M002	eTAG IL7RA Ins PPCL (인러류긴 7 수용체)	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQPEDNNSGEMDPILLPCLTISILSFFSVALLVILACVL (서열번호 85)
M007	Myc Tag LMP1 NC_007605_1	MEQKLISEEDLEHDLERGPPGPRRPPRGPPSSSLGLALLILLLIALLFWLYTVMSDWTGG ALLVLYSFALMILMILIFFRDILLCPLGALCILLMTLLIALWNLHGQALFLGVLFFGCLLV GWIYLLLEMLWRLGATWQLLAFFLAFFLDLILHIALYLOQNWWTLLVDLLWLL LFLAILIWM (서열번호 86)
M008	Myc LMP1 NC_007605_1	MEQKLISEEDLSSSLGLALLILLLIALLFWLYTVMSDWTGGALLVLYSFALMILMILIFR RDILLCPLGALCILLMTLLIALWNLHGQALFLGVLFFGCLLVGWIYLLLEMLWRLG ATWQLLAFFLAFFLDLILHIALYLOQNWWTLLVDLLWLLFLAILIWM (서열번호 87)
M009	LMP1 NC_007605_1	MEHDLERGPPGPRRPPRGPPSSSLGLALLILLLIALLFWLYTVMSDWTGGALLVLYSFAL MLMILMILIFFRDILLCPLGALCILLMTLLIALWNLHGQALFLGVLFFGCLLVGWIY LLEMLWRLGATWQLLAFFLAFFLDLILHIALYLOQNWWTLLVDLLWLLFLAILIWM (서열번호 88)
M010	LMP1 NC_007605_1	MSLGLAILILLLIALLFWLYTVMSDWTGGALLVLYSFALMILMILIFFRDILLCPLGALC ILLMTLLIALWNLHGQALFLGVLFFGCLLVGWIYLLLEMLWRLGATWQLLAFFLDLIL HIALYLOQNWWTLLVDLLWLLFLAILIWM (서열번호 89)
M012	eTAG CRLF2 전사체 변이체 1 NM_022148_3	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEDRCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVVMGENNITLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPINGAETPTPKPKLSKCLISSLAILLMVSLILSLW (서열번호 90)
M013	eTAG CRLF2 전사체 변이체 1 NM_022148_3	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQAEPTTPPKPKLSKCLISSLAILLMVSLILSLW (서열번호 91)
M018	eTAG CSF2RB NM_000395_2	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEDRCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVVMGENNITLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPINGTESVLPMMWVLAIEIFLIIAVLLAL (서열번호 92)
M019	eTAG CSF2RB NM_000395_2	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQTESVLPMMWVLAIEIFLIIAVLLAL (서열번호 93)
M024	eTAG CSF3R 전사체 변이체 1 NM_000760_3	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEDRCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVVMGENNITLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPINGTEGSELHILGLFGLLLLNCLCGTAWLCC (서열번호 94)
M025	eTAG CSF3R 전사체 변이체 1 NM_000760_3	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQTEGSELHILGLFGLLLLNCLCGTAWLCC (서열번호 95)
M030	eTAG EPOR 전사체 변이체 1 NM_000121_3	MLLIVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLIIQAWPENRIDLHAFENLEIIRGRTKQHGG FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWGPEDRCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVVMGENNITLVWKYADAG HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPINGTSDLPCCILSLILVVILVLLTVLALLS (서열번호 96)

[0972]

M031	eTAG EPOR 전사체 변이체 1 NM_000121_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQTPSLDPCCLTSLILVVLVLLTVLALLS (서열번호 97)
M036	eTAG GHR 전사체 변이체 1 NM_000163_4	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLPQMSQFTCCEDFYFPWLLCIFGIFGLTVMLF VFLFS (서열번호 98)
M037	eTAG GHR 전사체 변이체 1 NM_000163_4	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQTPQMSQFTCCEDFYFPWLLCIFGIFGLTVMLFVFLFS (서열번호 99)
M042	Fa F523C 다음에 eTAG 가 절단됨 IL27RA NM_004843_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLPNDNLRWVLPGLCLWGLFLLGCLSLA (서열번호 100)
M043	Fa F523C 다음에 eTAG 가 절단됨 IL27RA NM_004843_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQHLPDNLRWVLPGLCLWGLFLLGCLSLA (서열번호 101)
M048	Fa S505N MPL 다음에 eTAG 가 절단됨 NM_005373_2	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLLGLLL (서열번호 102)
M049	Fa S505N 다음에 eTAG 가 절단됨 MPL NM_005373_2	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQETATETAWISLVTALHLVLGLNAVLLGLLL (서열번호 103)
E006	eTag 0A JUN NM_002228_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLERARLEEKVKTILKAQNSELASTANMLREQVA QLKQKV (서열번호 104)
E007	eTag 1A JUN NM_002228_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLERARLEEKVKTILKAQNSELASTANMLREQVA QLKQKVA (서열번호 105)
E008	eTag 2A JUN NM_002228_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLERARLEEKVKTILKAQNSELASTANMLREQVA LQKQVAA (서열번호 106)
E009	eTag 3A JUN NM_002228_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLERARLEEKVKTILKAQNSELASTANMLREQVA QLKQKAAA (서열번호 107)
E010	eTag 4A JUN NM_002228_3	MLLLVTSLLLCCLPAPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPV AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDLHAFENLEIRGRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVITSGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGECVDCNLLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENNLTWVKYADAG HVCHLCHPNCTYGTCTGPGLEGCPNTGLERARLEEKVKTILKAQNSELASTANMLREQVA

[0973]

		QLKQKVAAAA (서열번호 108)
E011	Myc Tag 0A JUN NM_002228_3	MTILGTTFGMVFSLLQVVSGEQKLISEEDLLERARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLRE QVAQLKQKV (서열번호 109)
E012	Myc Tag 1A JUN NM_002228_3	MTILGTTFGMVFSLLQVVSGEQKLISEEDLLERARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLRE QVAQLKQKVA (서열번호 110)
E013	Myc Tag 2A JUN NM_002228_3	MTILGTTFGMVFSLLQVVSGEQKLISEEDLLERARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLRE QVAQLKQKVAA (서열번호 111)
E014	Myc Tag 3A JUN NM_002228_3	MTILGTTFGMVFSLLQVVSGEQKLISEEDLLERARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLRE QVAQLKQKVAAA (서열번호 112)
E015	Myc Tag 4A JUN NM_002228_3	MTILGTTFGMVFSLLQVVSGEQKLISEEDLLERARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLRE QVAQLKQKVAAAA (서열번호 113)
T001	CD2 전사제 변이체 1 NM_001328609_1	LIIGCGGGSLLMVFVALLVFI (서열번호 114)
T002	CD3D 전사제 변이체 1 NM_000732_4	GIVTDVIATLLALGVFCFA (서열번호 115)
T003	CD3E NM_000733_3	VMSVATIVDKITGGLLLVYYWS (서열번호 116)
T004	CD3G NM_000073_2	GFLFAEIVSIFVLAVGVYFIA (서열번호 117)
T005	CD3Z CD247 전사제 변이체 1 NM_198053_2	LCYLLDGLFTYGVILTALFL (서열번호 118)
T006	CD4 전사제 변이체 1 및 2 NM_000616_4	MALIVLGGVAGLLIFIGTGLGIF (서열번호 119)
T007	CD8A 전사제 변이체 1 NM_001768_6	IYIWAFLAGTCGVLLLSLVIT (서열번호 120)
T008	CD8B 전사제 변이체 2 NM_172213_3	LGILVAGVLLVLSLGVAIHLCC (서열번호 121)
T009	CD27 NM_001242_4	ILVIFSGMFLVFTLAGALFLH (서열번호 122)
T010	CD28 전사제 변이체 1 NM_006139_3	FWVLVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWV (서열번호 123)
T011	CD40 전사제 변이체 1 및 6 NM_001250_5	ALVVPFIIFGLFAILLVLVFI (서열번호 124)
T012	CD79A 전사제 변이체 1 NM_001783_3	ITAEGHLLFCVVPGLTLLF (서열번호 125)
T013	CD79B 전사제 변이체 3 NM_001039933_2	GIMQTLILFLIIVPIFLL (서열번호 126)
T014	CRLF2 전사제 변이체 1 NM_022148_3	FILISSLAHLMVSLLLLSLW (서열번호 127)
T015	CRLF2 전사제 변이체 1 NM_022148_3	CILISSLAHLMVSLLLLSLW (서열번호 128)
T016	CSF2RA 전사제 변이체 7 및 8 NM_001161529_1	NLGSVYYTVLLIVGTIVCGIVLGLF (서열번호 129)
T017	CSF2RB NM_000395_2	MWVLALIVFLTIIVLLAL (서열번호 130)
T018	CSF2RB NM_000395_2	MWVLALIEFLTIIVLLAL (서열번호 131)
T019	CSF3R 전사제 변이체 1 NM_000760_3	ILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC (서열번호 132)
T020	CSF3R 전사제 변이체 1 NM_000760_3	ILGLFGLLLLLNCLCGTAWLCC (서열번호 133)
T021	EPOR 전사제	LILTLILVVLVLLTVLALLS (서열번호 134)

[0974]

	변이체 1 NM_000121_3	
T022	EPOR 전사체 변이체 1 NM_000121_3	CCLTSLILVVTLVLLTVLALLS (서열번호 135)
T023	FCER1G NM_004106_1	LCYILDAILFLYGVLTLLYC (서열번호 136)
T024	FCGR2C NM_201563_5	IVAVVTGIAVAANVAAVVALTY (서열번호 137)
T025	FCGRA2 전사체 변이체 1 NM_001136219_1	IVAVVIATAVAANVAAVVALTY (서열번호 138)
T026	GHR 전사체 변이체 1 NM_000163_4	FPWLIIHIFGIFGLTVMLFVFLFS (서열번호 139)
T027	GHR 전사체 변이체 1 NM_000163_4	FPWLIIHIFGIFGLTVMLFVFLFS (서열번호 140)
T028	ICOS NM_012092_3	FWLPIGCAAFVVVCILGCILI (서열번호 141)
T029	IFNAR1 NM_000629_2	IWLIVGICIAFALPFVITYAA (서열번호 142)
T030	IFNAR2 전사체 변이체 1 NM_207585_2	IGGIITVFLIALVLTSTIVTL (서열번호 143)
T031	IFNGR1 NM_000416_2	SLWIPVVAALLFLVLSLVFI (서열번호 144)
T032	IFNGR2 전사체 변이체 1 NM_001329128_1	VILISVGTFSLLSVLGACFF (서열번호 145)
T033	IFNLR1 NM_170743_3	FLVLPSSLIIILVIAAGGVTW (서열번호 146)
T034	IL1R1 전사체 변이체 2 NM_001288706_1	HMIGICVTLTVIVCSVFTYKIF (서열번호 147)
T035	IL1RAP 전사체 변이체 1 NM_002182_3	VLLVVILIVVYHVYWLEMVLF (서열번호 148)
T036	IL1RL1 전사체 변이체 1 NM_016232_4	IYCHAVCSVFLMLNVLVII (서열번호 149)
T037	IL1RL2 NM_003854_2	AYLIGGLIALVAVAVSVVITY (서열번호 150)
T038	IL2RA 전사체 변이체 1 NM_000417_2	VAVAGCVFLISVLLSGL (서열번호 151)
T039	IL2RB 전사체 변이체 1 NM_000878_4	FWLGHLLVGLSGAFGFILVYLLI (서열번호 152)
T040	IL2RG NM_000206_2	VVISVGSMLHSILCVYFWL (서열번호 153)
T041	IL3RA 전사체 변이체 1 및 2 NM_002183_3	TSLIIALGTLALVCVFVIC (서열번호 154)
T042	IL4R 전사체 변이체 1 NM_000418_3	ILLGVSVCIVLAVCLCYVSIT (서열번호 155)
T043	IL5RA 전사체 변이체 1 NM_000564_4	FVIVMATICFILLILSLIC (서열번호 156)
T044	IL6R 전사체 변이체 1 NM_000565_3	TFLVAGGSLAFGTLLCIAIVL (서열번호 157)
T045	IL6ST 전사체 변이체 1 및 3 NM_002184_3	AIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCE (서열번호 158)
T046	IL7RA NM_002185_3	ILLTISILSFFSVALLVILACVL (서열번호 159)

[0975]

T047	IL7RA Ins PPCL (인터루킨 7 수용체)	ILPPCLTISILSFFSVALLVILACVL (서열번호 160)
T048	IL9R 전사체 변이체 1 NM_002186_2	GNILVAVSIFLLLTGPTYLLF (서열번호 161)
T049	IL10RA 전사체 변이체 1 NM_001558_3	VIIFAFVLLLSGALAYCLAL (서열번호 162)
T050	IL10RB NM_000628_4	WMVAVILMASVFMVCLALLGCF (서열번호 163)
T051	IL11RA NM_001142784_2	SLGILSFLGLVAGALALGLWL (서열번호 164)
T052	IL12RB1 전사체 변이체 1 및 4 NM_005535_2	WLFFASLGSFLSILLVGVLYLGL (서열번호 165)
T053	IL12RB2 전사체 변이체 1 및 3 NM_001559_2	WMAFVAPSICIAIMVGIFST (서열번호 166)
T054	IL13RA1 NM_001560_2	LYTMLLIVPVTVAGAITVLLYL (서열번호 167)
T055	IL13RA2 NM_000640_2	FWLPFGFILILVIFVTGLLL (서열번호 168)
T056	IL15RA 전사체 변이체 4 NM_001256765_1	VAISTSTVLLCGLSAVSLACYL (서열번호 169)
T057	IL17RA NM_014339_6	VYWFITGISILLVGSVILLIV (서열번호 170)
T058	IL17RB NM_018725_3	LIILSLLVATWVLVAGHYLMW (서열번호 171)
T059	IL17RC 전사체 변이체 1 NM_153460_3	WALVWLACILFAAALSILLL (서열번호 172)
T060	IL17RD 전사체 변이체 2 NM_017563_4	AVAITVPLVVISAFATLFTVM (서열번호 173)
T061	IL17RE 전사체 변이체 1 NM_153480_1	LGILILAILALLTLGGVVLAL (서열번호 174)
T062	IL18R1 전사체 변이체 1 NM_003855_3	GMIHAILVAVVCLVVCVI (서열번호 175)
T063	IL18RAP NM_003853_3	GVVLLYLILGTIGTLVAVLAA (서열번호 176)
T064	IL20RA 전사체 변이체 1 NM_014432_3	IFWYVLPISITVFLFSVMGY (서열번호 177)
T065	IL20RB NM_144717_3	VLALFAFVGFMILVVVPLFV (서열번호 178)
T066	IL21R 전사체 변이체 2 NM_181078_2	GWNPHELLLLLLLVTFIPAFW (서열번호 179)
T067	IL22RA1 NM_021258_3	YSFSGAFLFSMGFLVAVLCYL (서열번호 180)
T068	IL23R NM_144701_2	LLGGMVFAVMLSILSLIGIF (서열번호 181)
T069	IL27RA NM_004843_3	VLPGLFLWGLFLGCGLSLA (서열번호 182)
T070	IL27RA NM_004843_3	VLPGLCLWGLFLGCGLSLA (서열번호 183)
T071	IL31RA 전사체 변이체 1 NM_139017_5	ILITSLIGGGLILILTVAYGL (서열번호 184)
T072	LEPR 전사체 변이체 1 NM_002303_5	AGLYVTVPISSSILLLGTLII (서열번호 185)
T073	LIFR NM_001127671_1	VGLIIAILIPVAVAVTVGVVTSILC (서열번호 186)

[0976]

T074	MPL NM_005373_2	ISLVTALHLVLGLSAVLGLILL (서열번호 187)
T075	MPL NM_005373_2	ISLVTALHLVLGLNAVLGLILL (서열번호 188)
T076	OSMR 전사체 변이체 4 NM_001323505_1	LIHILLPMVFCVLLIMVMCYL (서열번호 189)
T077	PRIR 전사체 변이체 1 NM_000949_6	TTVVISVAVLSAVICLIIVWAVAL (서열번호 190)
T078	TNFRSF4 NM_003327_3	VAAILGLGLVLGLLPLAILL (서열번호 191)
T079	TNFRSF8 전사체 변이체 1 NM_001243_4	PVLDAGPVLFWVLVLVVVGSSAFLIC (서열번호 192)
T080	TNFRSF9 NM_001561_5	ISFFLALTSTAILLFLFLTLRFSVV (서열번호 193)
T081	TNFRSF14 전사체 변이체 1 NM_003820_3	WWFLSGSLVTIVCSTVGLII (서열번호 194)
T082	TNFRSF18 전사체 변이체 1 NM_004195_2	LGWLTIVLLAVAACVLLTSA (서열번호 195)
S036	CD2 전사체 변이체 1 NM_001328609_1	TKRKKQSRNRNDEELETAKHRVATEERGRKPHQIPASTQNPATSQHPPPPGHRSQAPS HRPPPPGHRVQHQPQKRPPAPSGTQVHQKGPPLPRFRVQPKPPHGAENSLSPSSN (서열번호 196)
S037	CD3D 전사체 변이체 1 NM_000732_4	GHEGTGRISGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK (서열번호 197)
S038	CD3E NM_000733_3	KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNGKERPPVPNPDPYEPKRGQRDLYSGLNQRR
S039	CD3G NM_000073_2	GQDGVQRQSRASDKQTLPLNDQLYQPLKDRDDQYSHLQGNQLRRN (서열번호 199)
S042	CD4 전사체 변이체 1 및 2 NM_000616_4	CVRCRHRRRQAERMSSQIKRLSEKKTQCQPHRFQKTCSP (서열번호 200)
S043	CD8A 전사체 변이체 1 NM_001768_6	LYCNHRNRNRVCKCPRPVVKSGBKPSLSARYV (서열번호 201)
S044	CD8B 전사체 변이체 2 NM_172213_3	RRRRARLRFMKQPQGEISGTFVPQCCLHGYYSNTTTSQKLLNPWILKT (서열번호 202)
S045	CD8B 전사체 변이체 3 NM_172101_3	RRRRARLRFMKQLRLHPLEKCSMDY (서열번호 203)
S046	CD8B 전사체 변이체 5 NM_004931_4	RRRRARLRFMKQFYK (서열번호 204)
S047	CD27 NM_001242_4	QRRKYRSNKGESPVPEAEPYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (서열번호 205)
S048	불연변이된 텔라 Lek CD28 전사체 변이체 1 NM_006139_3	RSKRRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQAYAAARDFAAYRS (서열번호 206)
S049	CD28 전사체 변이체 1 NM_006139_3	RSKRRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS (서열번호 207)
S050	CD40 전사체 변이체 1 및 6 NM_001250_5	KKVAKKPTNKAPHKQEPQEQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVQTQEDGKESRJSVQE RQ (서열번호 208)
S051	CD40 전사체 변이체 5 NM_001322421_1	SESSEKVAKKPTNKAPHKQEPQEQEINFDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVQTQEDGKESRI SVQERQ (서열번호 209)
S052	CD79A 전사체 변이체 1 NM_001783_3	RKRWQNEKGLDAGDEYEDENLYEGLNLDDCSMYEDISRLGQGYQDVGSLNIGDVQL EKP (서열번호 210)
S053	CD79B 전사체 변이체 3	LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE (서열번호 211)

[0977]

	NM_001039933_2	
S054	CRLF2 전사체 변이체 1 NM_022148_3	KLWRVKKFLIPSVDPKSIFFGLFEHQGNFQEWITDTQNV AHLHKMAGAEQESGPPEPL VVQLAKTEAESPRMLDPQTEKEASGGSLQLPHQLQGGDVVTIGGFTFVMNDRSYVAL (서열번호 212)
S057	CSF2RB NM_000395_2	RFCGYGYRLRRKWKWKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGSMASFTSGSPPHQGPWGSRFPE LEGVFPVGFQDSEVSPLTIEDPKHVCDDPPSGDITTPAASDLPTQPPSPQGPAAASHTPEK QASSDFDNGPYLGPPHSRSLPDILGQPEPPQEGGSKSPPGSLEYLCLPAGGQVQLVPLA QAMGPGQAVEVERRPSQGAAGSPLESGGGPAPPALGPRVGGQDQKDSVPAIMSSGDT EDPGVASGYVSSADLVFTPNSSGASSVSLVPSLGLPSDQTPSLCPGLASGPPGAPGVKSGF EGVVELPPIEGRSRSPRNPNVPPEAKSPVLPNGERPADVSPTSQPEGLLVLLQQVGDYCF LPGLGPGPLSLRSKPSSPGPGEIKNLDQAFQVKKPPGQAVPQVPVQLFKALKQDQDYL PFWEVKNKGEVC (서열번호 213)
S058	CSF2RA 전사체 변이체 7 및 8 NM_001161529_1	KRFLRIQLRFPFVPQIKDKLNDNHEVEDEIWEFTPEEGKGYREEVLTVKEIT (서열번호 214)
S059	CSF2RA 전사체 변이체 9 NM_001161531_1	KRFLRIQLRFPFVPQIKDKLNDNHEVEDEMGQRHHRCGWNLVYTPFGSPGSGSSPRLGS ESSL (서열번호 215)
S062	CSF3R 전사체 변이체 1 NM_000760_3	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLSGSWVPTMEEDAFQLPGLGTPITKLTVLEDEKKVPVWE SHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPSQSGTSDQVLYGQLLGSPSPGPHYLRC DSYQPLLAGLTPSPKSYENLWFQASPLGLTVTPAPSQEDDCVFGPILNFPLLQGRVHGM EALGSF (서열번호 216)
S063	CSF3R 전사체 변이체 3 NM_156039_3	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLSGSWVPTMEELPGPRQGWLGQTSMSRALTPHPCVQDA FQLPGLGTPITKLTVLEDEKKVPVWESHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPS QSGTSDQVLYGQLLGSPSPGPHYLRCDSQPLLAGLTPSPKSYENLWFQASPLGLTVT PAPSQEDDCVFGPILNFPLLQGRVHGMALGSF (서열번호 217)
S064	CSF3R 전사체 변이체 4 NM_172313_2	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLSGSWVPTMEEDAFQLPGLGTPITKLTVLEDEKKVPVWE SHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPSQSGTSDQAGPPRRSAFYKQDQMLHPAP NGLLCLFPITSVL (서열번호 218)
S069	EPOR 전사체 변이체 1 NM_000121_3	HRRALKQKIWPGIPSESEFGLFTTHKGNFQLWLQYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEV LSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDQTYLVLDKWLPRNPSPEDLPGGPGS VDIVAMDEGSEASSALASKSPPEGASAAFEYTILDPSQLLRPWTLCPPLPTPPHLK LYLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGSDGPGYSPNYENSLIPAAEPLPPSYVACS (서열번호 219)
S072	EPOR 전사체 변이체 1 NM_000121_3	HRRALKQKIWPGIPSESEFGLFTTHKGNFQLWLQYQNDGCLWWSPCTPFTEDPPASLEV LSERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDQTYLVLDKWLPRNPSPEDLPGGPGS VDIVAMDEGSEASSALASKSPPEGASAAFEYTILDPSQLLRPWTLCPPLPTPPHLK FLFLVVSDSGISTDYSSGDSQGAQGGSDGPGYSPNYENSLIPAAEPLPPSYVACS (서열번호 220)
S074	FCER1G NM_004106_1	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGSTRNQETETLKHEKPPQ (서열번호 221)
S075	FCGR2C NM_201563_5	CRKKRISANSTDPVKAAQFEPGGRQMAIRKRQPEETNNDYETADGGYMTLNPRAPTDD DKNYLTLPNDHVNNSN (서열번호 222)
S076	FCGR2A 전사체 변이체 1 NM_001136219_1	CRKKRISANSTDPVKAAQFEPGGRQMAIRKRQLEETNNDYETADGGYMTLNPRAPTDD DKNYLTLPNDHVNNSN (서열번호 223)
S077	GHR 전사체 변이체 1 NM_000163_4	KQQRKIMLIPVVPVKIKGIDPDLLKEGKLEEVNTLAHDSYKPEFHSDDSWVEFIELDI DEPDEKTEESDTRLLSSDHEKSHSNLGVKDGDSGRTSCCEPDILETDNFANDIHEGTSE VAQPORLKGADLLCLDQKNQNNSPYHDACPATQQPSVIAEKNKQPLPTEGAESTHQ AAHIQLSNPSSLSNIDFYAQVSDITPAGSVVLSPGQKKNKAGMSQCDMHPMVSLCQENF LMDNAYFCEADAKKCPVAPHIKVESHQPSLNQEDITYTTESLTTAAGRPGTGEHVPGSE MPVPDYTSIHIVQSPQGLILNATALPLPDKEFLSSCGYVSTDQLNKIMP (서열번호 224)
S080	ICOS NM_012092_3	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVAVNTAKKSRLTDVTL (서열번호 225)
S081	IFNAR1 NM_000629_2	KVFLRCNYYVFFPSLKPSSSIDFYSEQPLKNLLSTSEEQIEKCFIENISTIAVEETNQTD EDHKKYSSQTSQDSGNYSNEDESESKTSEELQDDFV (서열번호 226)
S082	IFNAR2 전사체 변이체 1 NM_207585_2	KWIGYICLRNSLPKVLNFFHFLA WFFPNLPPLAAMDVMEVYINRKKKVWDVNYDDES DSDTEAAPRTSGGGYTMHGLTVRPLGQASATSTESQLIDPESEEEPDPEVDVELPTMPK DSQOQLELLSGPCERRKSPLQDPFPEEDYSSTEGSGGRITFNVDLNSVFLVLDDESDDL EAPLMLSSHLEEMVDPEDPDNVQSNHILLASGEGTQPTFPSPSSEGLWSEDAQSDQSDTSE SDVDLGDGYBMR (서열번호 227)
S083	IFNAR2 전사체 변이체 2 NM_000874_4	KWIGYICLRNSLPKVLRQGLAKGWNVAIHRCSHVALQSETPELKQSSCLSPSSWDYK RASLCPSD (서열번호 228)
S084	IFNGR1 NM_000416_2	CFYIKKINPLKEKSHLPKSLISVVRSAITLTKPESKYVSLITSYQPFSLKEVVCCEPLSPAT VPMGHTEDNPGKVEHTEELSSITEVVITEENPDVVPVGSHTPIERESSPLSNQSEPGSIA LNSYHSRNCSESDHSRNGFDTDSSCLESHTSLSDSEFPNNKGEIKTEGQELITVKAPTSF GYDKPHVLVDLLVDDSGKESLIGYRPTEDSKEFS (서열번호 229)

[0978]

S085	IFNGR2 전사체 변이체 1 NM_001329128_1	LVLKYRGLIKYWFHTPPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDSVSIISFPEKEQ EDVLQTL (서일번호 230)
S086	IFNLR1 NM_170743_3	KTLMGNPWFQRAKMPRALDFSGHTHPVATFQPSRPESVNDLFLCPQKELTRGVPTPRV RAPATQQTRWKKDLAEDEEEDEEDTEDGVSFQPYIEPPSFLGQEHQAPGHSEAGGVDS GRPRAPLVPSGSSAWDSSDRSWASTVDSWDRAAGSSGYLEAGKPGQGPGDGHQESL PPPEFSKDSGFLEELPEDNLSSWATWGTLPPEPNLVPGGPPVSLQTLTFCWESSPEEEEEE RESEIEDSDAGSWGAESTQRTEDRGRILGHYMAR (서일번호 231)
S087	IFNLR1 전사체 변이체 2 NM_173064_2	KTLMGNPWFQRAKMPRALELTRGVPTPRVRAPATQQTRWKKDLAEDEEEDEEDTE DGVSFQPYIEPPSFLGQEHQAPGHSEAGGVDSGRPRAPLVPSGSSAWDSSDRSWASTV SSWDRAAGSSGYLEAGKPGQGPGDGHQESLPPPEFSKDSGFLEELPEDNLSSWATWGT LPPPEPNLVPGGPPVSLQTLTFCWESSPEEEEEEARESEIEDSDAGSWGAESTQRTEDRGRILG HYMAR (서일번호 232)
S098	IL1R1 전사체 변이체 2 NM_001288706_1	KIDIVLWYRDCYDFLPKVLPEVLEKQCGYKLFYGRDDYVGEDIVEVINENVKKSRRLI ILVRETSGFSLWLGSSSEEQIAMYNALVQDGIKVVILLELEKIQDYKMPESIKFIKQKHGA IRWSGDFTQGPQSAKTRFWKNVRYHMPVQRSSPSKQHLSPATKEKLQREAHVPLG (서일번호 233)
S099	IL1R1 전사체 변이체 3 NM_001320978_1	KIDIVLWYRDCYDFLPKASDGKTYDAYLYPKTVGEGSTSDCIFYFKVLPEVLEKQCG GYKLFYGRDDYVGEDIVEVINENVKKSRRLIILVRETSGFSLWLGSSSEEQIAMYNALVQ DGIKVVILLELEKIQDYKMPESIKFIKQKHGAIRWSGDFTQGPQSAKTRFWKNVRYHMP VQRSSPSKQHLSPATKEKLQREAHVPLG (서일번호 234)
S100	IL1RAP 전사체 변이체 1 NM_002182_3	YRAHFGTDETLTGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGI VTEITLSPFQKSRRLIIVLSPNYVLQGTQALLKAGLENMASRGNNVILVQYKAVKE TKVKELKRAKTVLTVKWKGEKSKYVQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSDEQGLSYSS LKNV (서일번호 235)
S101	IL1RAP 전사체 변이체 6 NM_001167931_1	YRAHFGTDETLTGKEYDIYVSYARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGI NVEAVFDFIQSRRLMIVVLSVDVTEKSIEMLEFKLVGMCQNSIATKLIIVVEYRLEPHPH PGILQKESVSFVSWKGEKSKHSGSKFWKALRLALPLRSLASSGWNESCSSQSDSLDH VQRRSRRLKEPPELQSSERAAGSPAPGTMSKHRGKSSATRCVCTYCEGENHLNRKSR AEIHNPQWETHLCKVPVQSEETQWIQNGTRLEPPAPQISALALHHFTLDSNNNDYIL (서일번호 236)
S102	IL1RL1 전사체 변이체 1 NM_016232_4	LKMFWIEATLLWRDIAKPYKTRNDGKLYDAYVYVPRNYKSSDGDASRVHFVHQILPD VLENKCGYTLCTYGRDMLPGEDVVTAVETNRKSRRHIFILTPQITHNKEFAYEQEVALH CALIQNDYAKVILJEMEALSELDMQAEALQDLSQHLMKVQGTIKWREDHIANKRSLSNSK FWKHVRYQMPVPSPKIPKASSLTPLAQKQ (서일번호 237)
S103	IL1RL2 NM_003854_2	NIFKIDIVLWYRSFHSSTETIVDGLYDAYVYVYKPKHKSQRHVAVDALVNLPEVLERQ CGYKLFIFGRDEFPGQAVANVIDENVKLCRRLIVVPSLFGGLKNLSEEQIAYVYALI QDGMKRVILIELEKIEDYVMPESIQYKQKHGAIRWHGDFTEQSQCMKTKFWKTVRYH MPPRRCRFPFPVQLLQHTPCYRTAGPELGSRRKCTLTTG (서일번호 238)
S104	IL2RA 전사체 변이체 1 NM_000417_2	TWQRRQRKSRRTI (서일번호 239)
S105	IL2RB 전사체 변이체 1 NM_000878_4	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPKFFSQQLSSEHGDDVQKWLSSPFFSSSFGGLAPEISPLE VLERDKVTQLLLQDDKVPPEPASLSSNHSLSCTFNQGYFFHLPDALEIACQVYFYTDY YSEEDPDEGVAGAPTGSQPQLPLSGEDDAYCTFPRSDDLILFSPSLGGSPSPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPLPGPTPGVDFVDFQPPPELVLEAGEEVPDAGPRE GVSFVWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGGQDPTHLV (서일번호 240)
S106	IL2RG NM_000206_2	ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALG EGPGASPCNQHSFYWAPPCYTLKPET (서일번호 241)
S109	IL3RA 전사체 변이체 1 및 2 NM_002183_3	RRYLVMQRLFFRIPHMKDPIGDSFQNDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVQKT (서일번호 242)
S110	IL4R 전사체 변이체 1 NM_000418_3	KIKKEWWDQIPNPARSRLVAMQDAQGSQWEKRSRGOEPAKCPHWKNCILTKLLPCFLE HNMKREDDEPHKAAKEMPFQSGSKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCEVLEAPVECEEE EEVEEEKGSFCSAPSSRDDFQEGREGIVARLITSLFLDLLGEENGFCQDDMGESCLLPP SGSTSAHMPWDEFFSAGPKEAPPWGKEQPLHLESPSPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNP AYRSFSNLSQSPCPRELGPDPILLARHLEEVPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRR NVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSLLASSA VSPKCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSQSSHLPSSSPE HLGLEPGEKVEDMPKPLPQEQATDPLVDSLGSIVFSAITCHLCGHLKQCHQEDGGQ TPVMASPCGCCGCCDRSSPTTPLRAPDPSGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSSSSSFHP APGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS (서일번호 243)
S113	IL4R 전사체 변이체 1 NM_000418_3	KIKKEWWDQIPNPARSRLVAMQDAQGSQWEKRSRGOEPAKCPHWKNCILTKLLPCFLE HNMKREDDEPHKAAKEMPFQSGSKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCEVLEAPVECEEE EEVEEEKGSFCSAPSSRDDFQEGREGIVARLITSLFLDLLGEENGFCQDDMGESCLLPP SGSTSAHMPWDEFFSAGPKEAPPWGKEQPLHLESPSPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNP AYRSFSNLSQSPCPRELGPDPILLARHLEEVPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRR NVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSLLASSA VSPKCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSQSSHLPSSSPE HLGLEPGEKVEDMPKPLPQEQATDPLVDSLGSIVFSAITCHLCGHLKQCHQEDGGQ TPVMASPCGCCGCCDRSSPTTPLRAPDPSGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSSSSSFHP

[0979]

		APGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS (서열번호 244)
S115	IL5RA 전사체 변이체 1 NM_000564_4	KICH.LWIKLFPPIAPKSNKDLFVTTN.YEKAGSSETEIEVIC.YIEKPGVETLED.SVF (서열번호 245)
S116	IL6R 전사체 변이체 1 NM_000565_3	RFKKT.WKLRALKEGKTS.MHPPYSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSLGSDNTSSHNR PDARDPRSPYDISNTDYFFPR (서열번호 246)
S117	IL6ST 전사체 변이체 1 및 3 NM_002184_3	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWS.PHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVS.VVEEAND KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVOYSTV VHSGYRHRQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSSQ HESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFPGGT EGQVERFETV.GMEAATDEGMPKSYLPQT.VRQGGYMPQ (서열번호 247)
S120	IL7RA 동형 1 NM_002185_4	WKKRIKPIV.WPSLPDHKKTLLEHLCKKPKRKNLVSNFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGF LQDTFFPQOLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSAACDAPILSS SRSLDCRESGKNPHVYQDLLSLGTTNSTLPPFPFLQSGILTLNPAQGGPILTSLSGNQ EEAYVTMSSFYQNNQ (서열번호 248)
S121	IL7RA 동형 3 (C-단단 결실) (인터루인 7 수용체)	WKKRIKPIV.WPSLPDHKKTLLEHLCKKPKRVS.VFGA (서열번호 249)
S126	IL9R 전사체 변이체 1 NM_002186_2	KLSPRVKRIFYQNVPSAMFFQPLYS.VHNGNFQTMGAHGAGVLLSQDCAGTPOGALE PCVQEATALLTCGPAPWKSVALEEEQEGPGTRLPGNLSSDEVLPAGCTEWRVQTLAYL PQEDWAPTSLTRPAPDSEGRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHLASALPGNTQSSGPIP ALACGLSCDHQGLETTQQGVAWVLAGHCQRPLGLEDLQGMLLPSVLSKARSWTF (서열번호 250)
S129	IL10RA 전사체 변이체 1 NM_001558_3	QLYVRRRKLP.VSLLFKKPSFFISQRPSPETQDTHPLDEEAFLKVSPELKNLDLHGSTD SGFGSTKPSLQTEEPQFLLPDPHPQADRTLGNREPPVLGDSCSSGSSNSTDSGLCQEPSLS PSTGPTWEQQVGSNSRGQDDSGIDLQVNSEGRAGDTQGGGALGHHSPEPEVPGEEDPA AVAFQGYLRQTRCAEEKATKTGCLFEESPLTDGLGPKFGRCLVDEAGLHPPALAKGYLK QDPLEMTLASSGAPTQGWNPQTEFWSLLASCSDDLGSISDWSFAHDLAPLGCVAAPGGL LGSFNSDLVTLPLISSLQSSE (서열번호 251)
S130	IL10RB NM_000628_4	ALLWCVYKTKYAFSPRNSLPQHLKEFLGHPHNTLLFFSFPLSDENDVDFKL.SVIAEDS ESGKQNPGDSCSLGTPPGQPGQS (서열번호 252)
S135	IL11RA NM_001142784_2	RLRGGKDGSPKPGFLASVPVDRRPGAPNL (서열번호 253)
S136	IL12RB1 전사체 변이체 1 및 4 NM_005535_2	NRAARHLCPPLPTPCASSAIEFFPGGKETWQWNPVDFQEEASLQ.EALVVMESWDKGERT EPEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCKAKM (서열번호 254)
S137	IL12RB1 전사체 변이체 3 NM_001290023_1	NRAARHLCPPLPTPCASSAIEFFPGGKETWQWNPVDFQEEASLQ.EALVVMESWDKGERT EPEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCDR (서열번호 255)
S138	IL12RB2 전사체 변이체 1 및 3 NM_001559_2	HYFQOKVFVLLAALRPQWCSREIPDPA.NSTCAKKYPIAEKTKQLPLDRLLIDWPTPEDPE PLVISEVLHQVTFVFRHPPC.SNWPQREKGIQGHQASEKDMHSAASSPPPRALQAESRQL VDLYKVLERSGSDPKPENPAC.PWTVLPAGDLPTHGYLPSNDDLP.SHEAPLADSLELE PQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCD.SLML (서열번호 256)
S141	IL13RA1 NM_001560_2	KRLKIMFPPIPDGKIFKEMFGDQNDTLHWKKYDIYEKQTK.EETDSVVLIENLEKASQ (서열번호 257)
S142	IL13RA2 NM_000640_2	RKPNTYPKMPEFFCDT (서열번호 258)
S143	IL15RA 전사체 변이체 4 NM_001256765_1	KSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCS.HHL (서열번호 259)
S144	IL17RA NM_014339_6	CMTWRLAGPGSEKYSDDTKYTDGLPAADLPPLKPRKVWITYSADHPLYVDVVLKFAQ FLLTACGTEVALD.LLEEQAISEAGVMTWVGROKQEMVESNSKIIVLC.SRGTRAKWQALL GRGAPVRLRCDHGKPVGLDFTAAMNMLPDFKRPACFGTYVVCYFSEVSCDGDVDPDLF GAAPRYPLMDRFEEVYFRIQDLEMFOGRMHRVGELSGDNYLRSPPGGRQLRAALDRFR DWQVRC.PDWFECE.NLYSADDQDAPSLDEEVFEEPLPPGTGIVKRAPLVREPGSQACLA DPLV.GEEGGA.AVAKLEPHLQFRGQAPQPLHTLVLA.AEEGALVAAVEPGPLADGA.AVR LALAGEGEACPLLGSPGAGRNSVLF.LPVDPEDSP.LGSSTPMASPDL.PEDVREHLEGLML SLFEQSLSCQAQGGCSR.PAMV.LTDPHTPYEEEQRSVQSDQGYISRSSPQPPEGLTE.MEE EEEEEQDPGK.PALPLSPEDLES.LRSLQRQLLFRQLQKNSG.WD.TMGSESEGPSA (서열번호 260)
S145	IL17RB NM_018725_3	RHERIKKTSFSTTTLLPPIKVLVVYPSEICFHHTICYTFELQNHCRSEVILEKWQKKIAE MGPVQWLATQKKAADKVVFLLSNDVNSVCDGTCGKSEGPSSENSQDLFPLAFNL.FCSD LRSQIHLHKYVVVYFREIDTKDDYNALSVCPKYLHMKDATAFCAELLHVKKQV.SAGKR SQACHDGCCSL (서열번호 261)
S146	IL17RC 전사체 변이체 1 NM_153460_3	KKDHAKGWLRLLKQDVRS.GAAARGRAALLYSADDSGFERLVGALASALCQLPLRVA VDLWSRREL.SAQGPVAWFHAQRRQTLQEGGVV.VLLFSPGAVALCSEWLQDGVSGPGA HGPHDAFRASLSCVLPDLF.LQGRAPGSYVGACFDRLLHPDAVPALFRTVPVFTLPSQLPDF

[0980]

		LGALQQPRAPRSGRQLQERAEQVSRALQPALDSYFHPGTPAPGRGVGPGAGPGAGDGT (서열번호 262)
S147	IL17RC 전사체 변이체 4 NM_001203263_1	KKDHAKAAARGRAAILLYSADDSGFERRVGLASALCQLPLRVAVDLWSRRELSAQGP VAWFHAQRRTLQEGGVVLLFSPGAVALCSEWLQDGVSPGAHGPHDAFRASLSVCVL PDFLQGRAPGSYVGACFDRLLHPDAVPALFRTPVPTPLPSQLPDFLGALQQPRAPRSGRQL QERAEQVSRALQPALDSYFHPGTPAPGRGVGPGAGPGAGDGT (서열번호 263)
S148	IL17RD 전사체 변이체 2 NM_017563_4	CRKKQENYSHLDEESSESSTYTAALPRERLRPRPKVFLCYSSKDGQNHMNVVQCFAV FLQDFCGCEVARDLWEDFSLCREGQREWWIQKHESQFIIVVCSKGMKYFVDKINYKHK GGGRGSGKGEFLFVAVSAIAEKLRQAKQSSAALSXFIIVFYDYSCEGDVPGLDLSKY RLMDNLQPLCSHLHSRDHGLQEPQHTROGSRNRYFRSKSGRSLYVAICNMHQFIDEED DWFEKQVFPFHPPLRYREPVLKFDGLVLDVMCKPGPESDFCLKVEAAVLGATGPA DSQHESQHGGLDQDGEARPAALDGSAAQLPLHTVKAGSPSDMPRDSGYDSSVPSSELSL PLMEGLSTDQTTSSLTESVSSSSGLGEEPPALPSKLLSSGSCRADLGRSYTDELHAVA FL (서열번호 264)
S149	IL17RE 전사체 변이체 1 NM_153480_1	TCRRPQSGPGPARPVLLIHAADSEAQRRLVGALAEILRAALGGGRDVTVDLWEGRHVA RVGPLPWLWAARTRVAREQGTVLLIWSGADLRPVSGPDRAAPLLALLHAAPRPLILL AYFSRLCAGKDIPPLRALPRYRILRLDLPLRLRALDARPAEATSWGRLLGARQRRQSRLE LCSRLEREAAALADLG (서열번호 265)
S154	IL18R1 전사체 변이체 1 NM_003855_3	YRVDLVLFVRHLTRDETLDGKTYDAFVSYLKECRPENGEEHTFAVEILPRVLEKHFG YKLCIFERDVVPGGAVVDEHSLIEKSRRLIIVLSKSYMSNEVRYEESGLHEALVERKIKI LIEFTPVTDFTFLPQSKLLKSHRVLKWKADKSLSYNSRFWKNLLYLPAAKTVKPRDE PEVLPLVSES (서열번호 266)
S155	IL18RAP NM_003853_3	SALLYRHWIEVLLYRTYQSKDQLTGDKKDFDAFVSYAKWSSFPSEATSSLSSEHLALS FPDVLNENKYGSCLLERDVPAGGVYAEDIVSIKRSRRGIFILSPNYVNGSPSIFELQAAVN LALDDQTLTLILKFCYFQEPESLPHLVKKALRVLPVTWRLGLKSPVPPNSRFWAKMRYH MPVKNSQGTWNQRLRITSRFQWKGSLRTETTRSSQPKW (서열번호 267)
S156	IL20RA 전사체 변이체 1 NM_014432_3	SYRYTHVGEKHPANILLYGNEFDKRFVPAEKTVNFITLNSDDSKISHQDMSLIGKSS DVSSLNDPQPSGNLRPPQEEVVKHLGYASHLMEIFCDSEENTEGSLTQOESLRTIPD KTIVIEYDVRTTIDCAGPEEQELSLQEEVSTQGTILLESQAALAVLGPOTLQYSYTPQLQ DLPLAQEHTDSEEGFEEEPSTLLVDWDPQTGRCLPSLSSFDQDSEGCPESEGDGLGEEG LLSRLYEEPAFDRPPGENETYLMQFMEEWGLYVQMEN (서열번호 268)
S157	IL20RB NM_144717_3	WKMGRLQYSCCPVVLPDITLKITNSPQKLISCRREEVDACATAVMSPEELLRAWIS (서열번호 269)
S158	IL21R 전사체 변이체 2 NM_181078_2	SLKTHPLWRLWKIWAVPSPERFFMPLYKGCSDGFKKWVGAFTGSSLELGPWSPVPS TLDEVYSCHPYSPAKRLQLTELQEAELVESDGVKPKSFWPTAQNSGGGAYSEERDRPYG LVSDTIVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLAGLEPSGLEDPLDAGTTVLSGCCVS AGSPGLGGPLGSLDLRLKPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLMDITF DVGFSVSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVPPLSSSPGQAS (서열번호 270)
S161	IL22RA1 NM_021258_3	SYRTVTKPPAPPNSLNVQRVLTFOPLRFIQEHVLPVFDLSGPPSLAQPVQYQIRVSGPRE PAGAPQRHSLSEITYLQGPDISILQPSNVPPPQILSPLSYAPNAAPEVGPSPYAPQVTPAQF PFYAPQAIKVPQSSYAPQATPDSWPPSYGVCMGSGKDSPTGTLSSPKHLRPFKGQLQKE PPAGSCMLGGLSLQEVTSLAMEESQEAQSLHQLGICDTRTSDPNVLHSGEETGPOYLKG QLPLSSVQIEGHPMSLPLQPPSPRCPSPDQGPSPWGLLESVCPKDEAKSPAPETSLEQ TELDLSLFRGALITVQWES (서열번호 271)
S165	IL23R NM_144701_2	NRSFRFGIKRRLILIPKWLIEDIPNMKNVNVKMLQENSELMNNSSSEQVLVYDPMITE IKEIFPEHKPIDYKKEGTGPLETRDYPQNSLFDNTTVVYIPDLNTGYKPKQISNLFPEGSHL SNNNEITSLLKPPVDSLDGNNPRLQKHPNFAFSVSVNSLNTIFLGELSLILNQGECS PDQNSVEEETMLLENDSPSETIPEQTLPLDEFVSLGIVNEELPSINTYFPQNLSEHFNRI SLLEK (서열번호 272)
S168	IL27RA NM_004843_3	TSGRCTYHLRHKVLPKRWVWEKVPDPANSSSGQPHMEQVPEAQPLGDLPILEVEEMEPPPV MESSQPAQATAPLDSGYEKHFLPTPEELGLLGPPRPQVLA (서열번호 273)
S169	IL27RA NM_004843_3	TSWVWEKVPDPANSSSGQPHMEQVPEAQPLGDLPILEVEEMEPPPVMESSQPAQATAPL DSGYEKHFLPTPEELGLLGPPRPQVLA (서열번호 274)
S170	IL31RA 전사체 변이체 1 NM_139017_5	KKPNKLTHLCWPTVPNPAESSIATWHGDDFKDKLNKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKL VIDKLVNFGNVLQEIFTDEARTGQENNLGGEKNGYVTCPRPDCPLGKSFEELPVSPPEIP PRKSQYLRSRMPEGTRPEAKEQLLFSGQSLVPDHLCEGAPNPYLNKSVTAREFLVSEKL PEHTKGEV (서열번호 275)
S171	IL31RA 전사체 변이체 4 NM_001242638_1	KKPNKLTHLCWPTVPNPAESSIATWHGDDFKDKLNKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKL VIDKLVNFGNVLQEIFTDEARTGQENNLGGEKNGTRILSSCPTSI (서열번호 276)
S174	LEPR 전사체 변이체 1 NM_002203_5	SHQRMKKLFWEDVPNPKNCWAQGLNFQKRPETFEHLFIKHTASVTCGPLILEPETISEDI SVDTSWKNKDEMMPTTVSLLSTDLKSGVCSISDQFNSVNFSEAGTEVTYEDESQRQ PFVKYATLISNSKPSSETGEEQGLNNSVTCKFSKNSPLKDSFNSNWEIEAQAFILSDQHP NIBPHLTFSEGLDELLKLEGNFPEENNDKKSIYVLGVTSIKKRESVLLTDKSRVSCPFA PCLFDIRVLQDSCSHFVENNINLGTSSKKTASYPQFQTCSTQTHKMENKMCIDLTV (서열번호 277)
S175	LEPR 전사체 변이체 2 NM_001003680_3	SHQRMKKLFWEDVPNPKNCWAQGLNFQKMLEGSMFVSKSHHSLISSTQGHKHCGRP QGQLHRKTRDCLSLVYLLTLPPLLSYDPAKSPSVRNTQE (서열번호 278)
S176	LEPR 전사체	SHQRMKKLFWEDVPNPKNCWAQGLNFQKRTDIL (서열번호 279)

[0981]

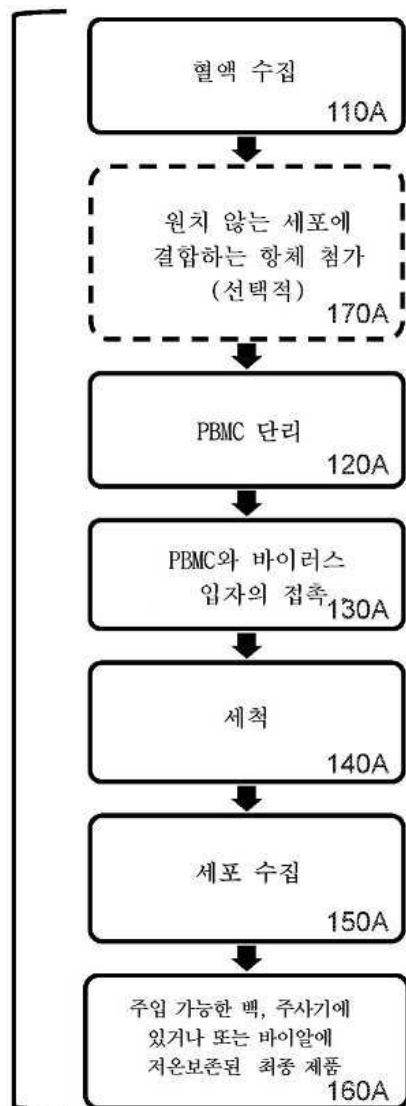
	변이체 3 NM_001003679_3	
S177	LEPR 전사체 변이체 5 NM_001198688_1	SHQRMKKLFWEDVPNPKNCWSAQGLNFQKKMPGKELLGGGWLT (서열번호 280)
S180	LIFR NM_001127671_1	YRKREWIKETFYDPDIPNENCKALQFQKSVCEGSSALKTLEMNPTNNVEVLETRSAFF KIEDTEIISPAERPEDRSDAEPENHVVSYSYCPPIIEEIPNPADEAGGTAQVITYDVQSM YQPOQAKPEEEQENDPVGGAGYKPMHLINSTVEDIAAEEEDLDKTAGYRPOANVNTWN LVSPDSRSPRSDNSSEIVSFGSPCSINSRQFLIPPKEDESPKSNGGGWSFTNFQNKFPD (서열번호 281)
S183	LMP1 NC_007605_1	YYHGQRHSDHHHDDSLPHQQAATDDSGHESDSNSNEGRHLLVSGAGDGPPLCSONL GAPGGGPDNGPQDPDNTDDNGPQDPDNTDDNGPHDPLPQDPDNTDDNGPQDPDNTDD NGPHDPLPHSPSDSAGNDGGPPQLTEEVENKGGDQGPPLMTDGGGGHSHDSHGCGGDP HLPTLLLGSSGSGDDDDPHGVPQLSYD (서열번호 282)
S186	MPL NM_005373_2	RWQFPAHYRRLRHALWPSLPDLHRVLGQYLRDTAALSPPKATVSDTCEEVPSLLELPK SSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGTMPLSVCPPMAESGSCCTTHIANHSLPLSYWQ QP (서열번호 283)
S189	MYD88 전사체 변이체 1 NM_001172567_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 284)
S190	MYD88 전사체 변이체 2 NM_002468_4	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 285)
S191	MYD88 전사체 변이체 3 NM_001172568_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 286)
S192	MYD88 전사체 변이체 4 NM_001172569_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 287)
S193	MYD88 전사체 변이체 5 NM_001172566_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 288)
S194	MYD88 전사체 변이체 1 NM_001172567_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 289)
S195	MYD88 전사체 변이체 3 NM_001172568_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 290)
S196	MYD88 전사체 변이체 1 NM_001172567_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 291)
S197	MYD88 전사체 변이체 2 NM_002468_4	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 292)
S198	MYD88 전사체 변이체 3 NM_001172568_1	MAAGGPGAGSAAPVSSSTSLPLAALNMRVRRRLSFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEY LEIQLETAQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLLELGPSEIEDCQKYL KQQQEEAEKPLQVAADVSSVPTAELAGITLDDPLGHMPEPFDAFICYCPSDIQFVQEM IRQLEQTNRYRLKLCVSDRDVLPCTCVWSIASELIEKRLARRPRGGCRRMVVVVSDDYQ SKCEDFQTKFALSLSPGAHQKRLPIPIKYKAMKKEFPSILRFTVCDYTNPCTKSFWWTRLA KALSPL (서열번호 293)
S199	OSMR 전사체 변이체 4 NM_001323505_1	KSQWIKETCYDIPDPYKSSILSLIKFENPHLIMNVSDCIPDAIEVVSKEPEGTKIQLGTR KSLTETELTKPNYLYLLPTEKNHSGPGCICFENLYNQAAASDSGSGCHVVPSPKAPSM GLMTSPENVLKALEQNYMNSLGEIPAGETSLNYVSQLASPMFGDKDSLPTNPVEAPHCS EYKMQMAVSLRLALPPPTENSLSLITLLDPGEHYC (서열번호 294)
S202	PRLR 전사체	RGYSMVTCIFPPVPGPKIGKGFDAHLEKKGSEELLALGQCDFFPTSDYEDLLVEYLEVD

	변이체 1 NM_000949_6	DSEDQHLMVSHSKEHPSQGMKPTYLDPTDTSGRGSCDSPILLSERKEEPQANPSTFYDPE VIEKPENPETHTWDPOCISMEGKIPYFHAGGSKCSTWPLQPSQHNPRSSYHNTIDVCEL AVGPAGAPATLLNEAGKDALKSSQTIKREEGKATQOREVESFHSETDQDTPWLLPQEK TPFGSAKPLDYVEIHKVNDKALSLLPKQRENSGKPKPGTPENNKEYAKVSGVMNDNNI LVLPDPHAKNVACFEESAKEAPPSLEQNAEKALANFTATSSKCRLLQGLDYLDPAC FTHSFH (서열번호 295)
S211	TNFRSF4 NM_003327_3	ALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGFRTPIQEEQADAHS TLAKI (서열번호 296)
S212	TNFRSF8 전사체 변이체 1 NM_001243_4	HRRACRRIRQKLHLCPVQTSQPKLELVDSRPRSSSTQLRSASVTEPVAERGLMSQP LMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGSSPRDLPEPRVS TEHTNNKIEKIYIMKADTVTVG TVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEGEKEDPL PTAASGK (서열번호 297)
S213	TNFRSF9 NM_001561_5	KRGRKKLLYFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL (서열번호 298)
S214	TNFRSF14 전사체 변이체 1 NM_003820_3	CVKRRKPRGDVVKVTVSVQRKQEAEGEATVIEALQAPPDVTVVAEETIPSTGRSPNH (서열번호 299)
S215	TNFRSF18 전사체 변이체 1 NM_004195_2	QLGLHWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKRLGDLWV (서열번호 300)
S216	TNFRSF18 전사체 변이체 3 NM_148902_1	QLGLHWQLRKTLLEVPSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKRLGDLWV (서열번호 301)
X001	링크	GSQGSEGGGSEGAATAGSGSGS (서열번호 302)

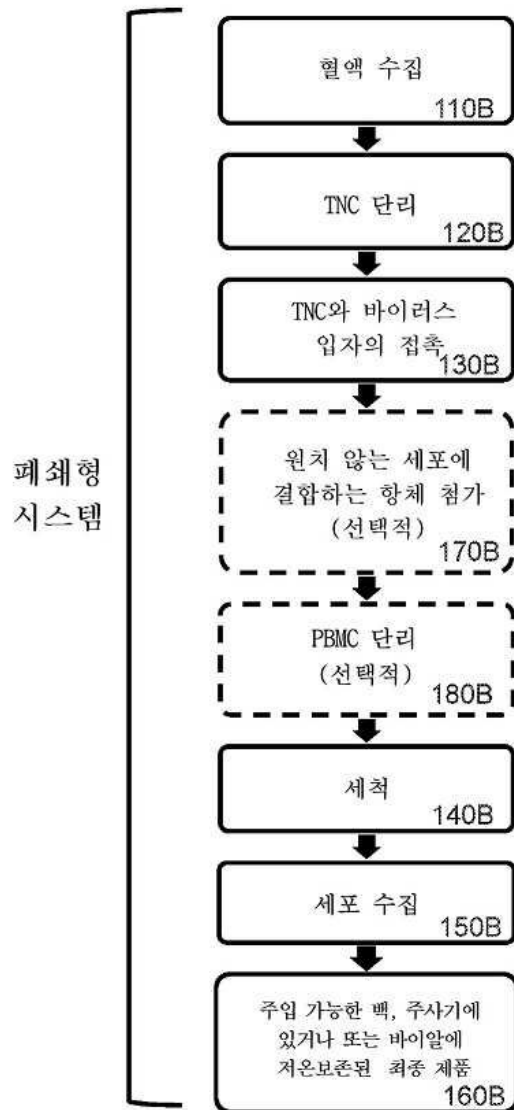
도면

도면1a

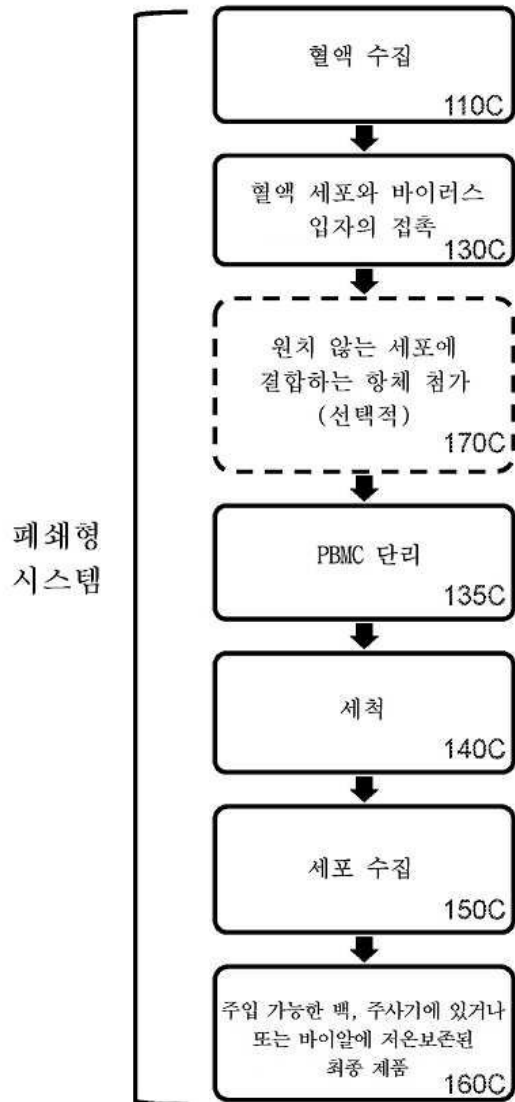
폐쇄형
시스템



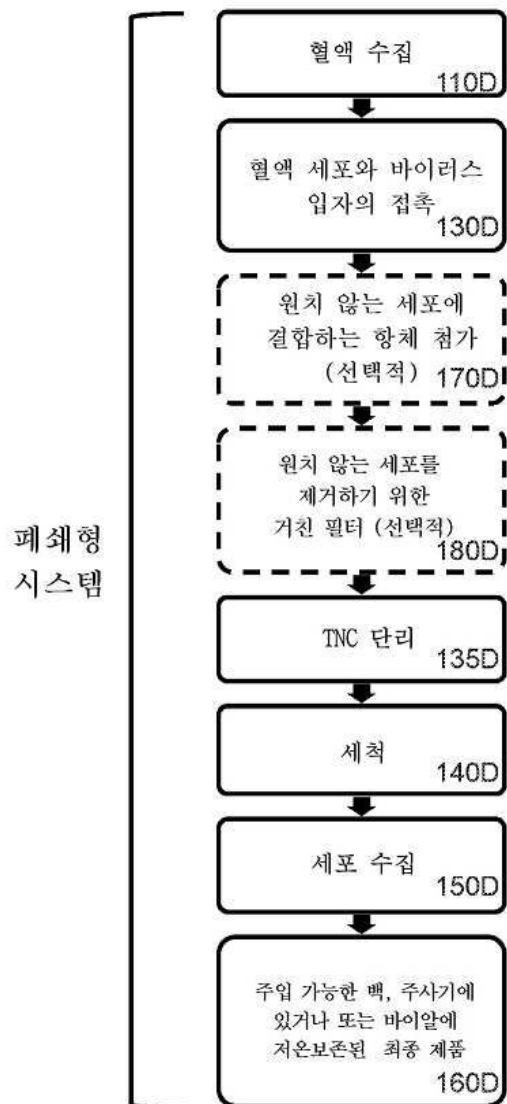
도면1b



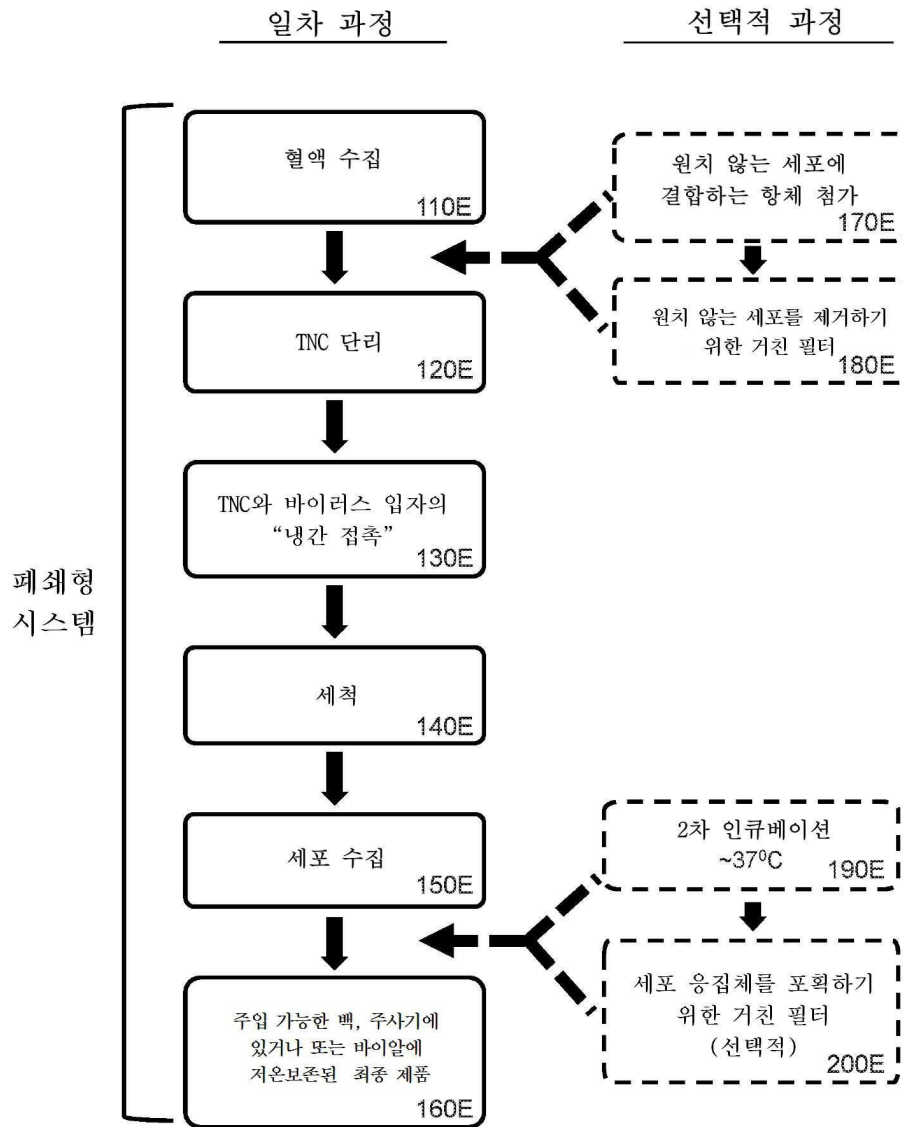
도면1c



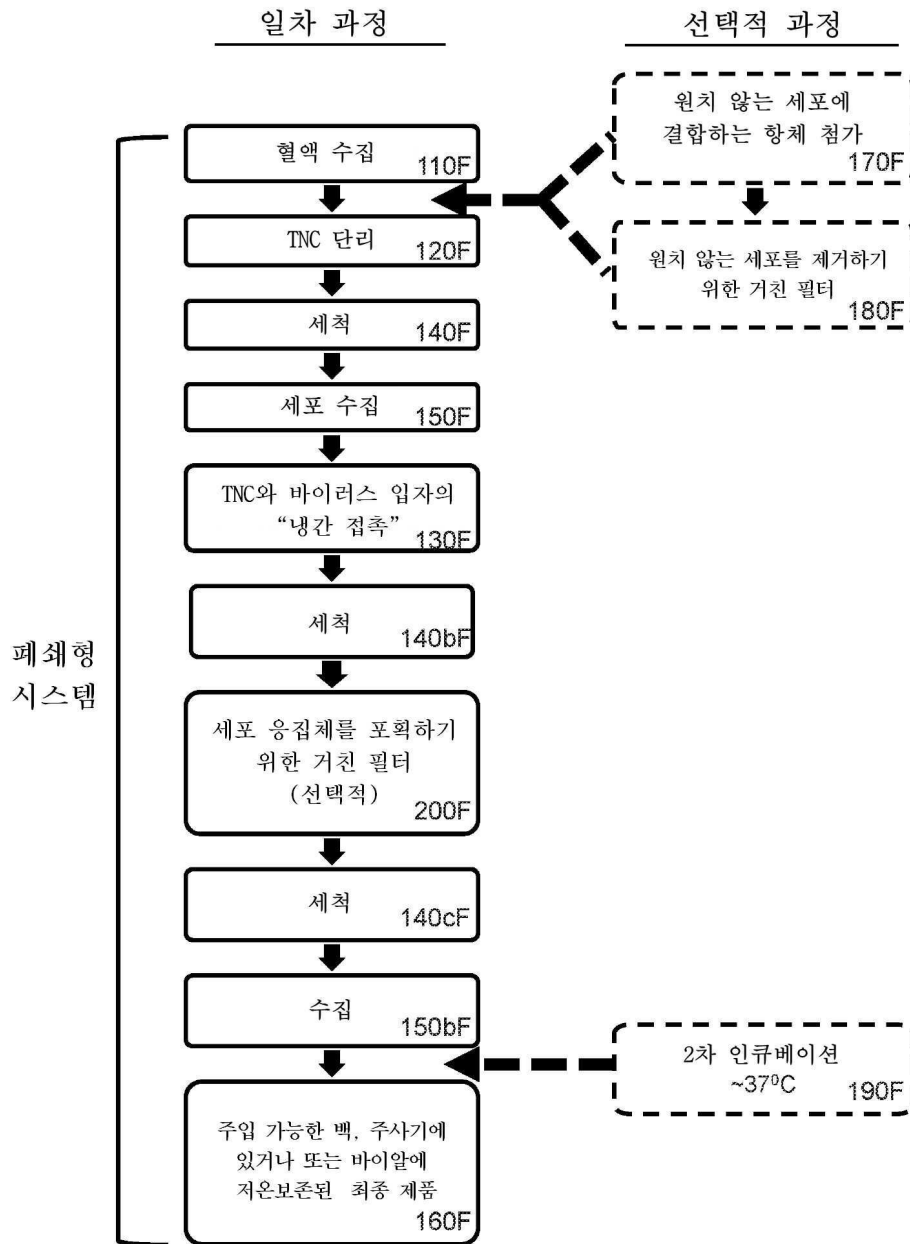
도면1d



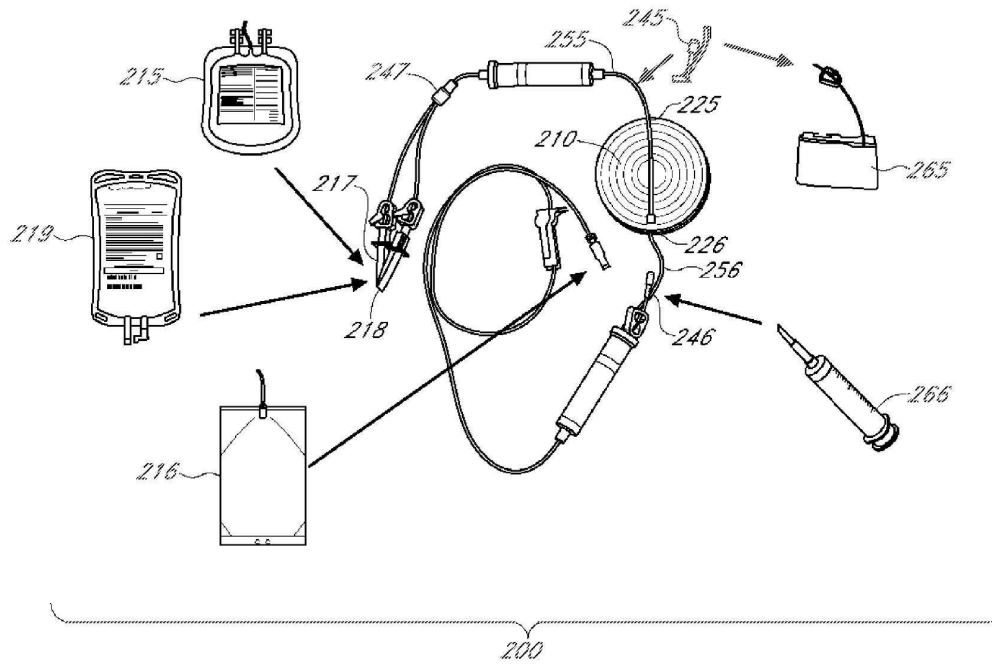
도면1e



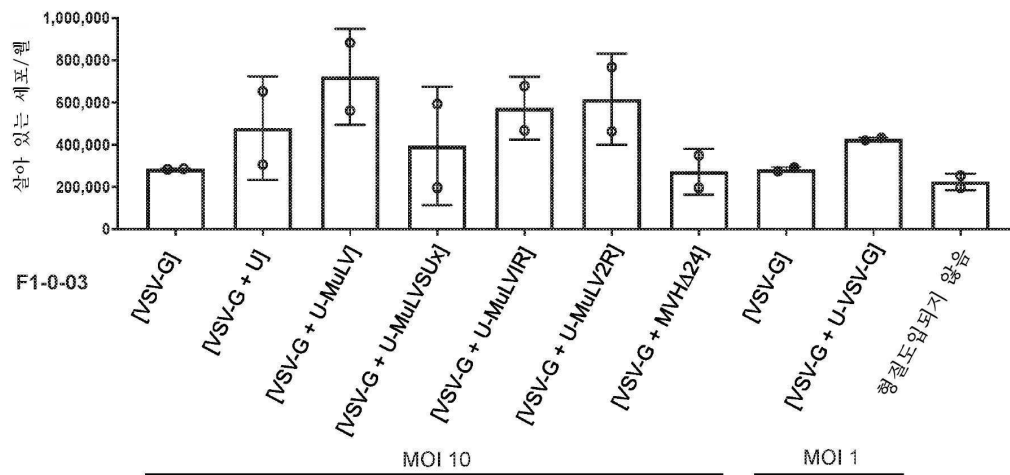
도면1f



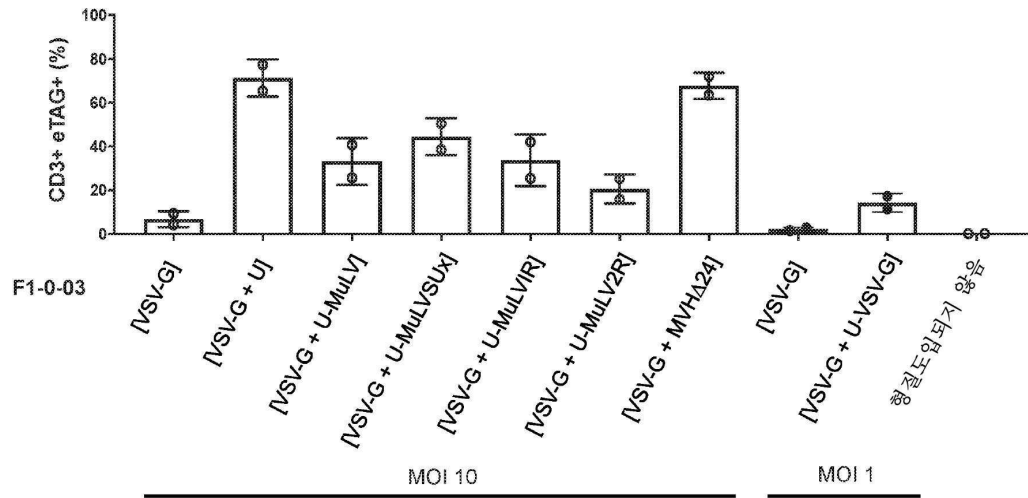
도면2



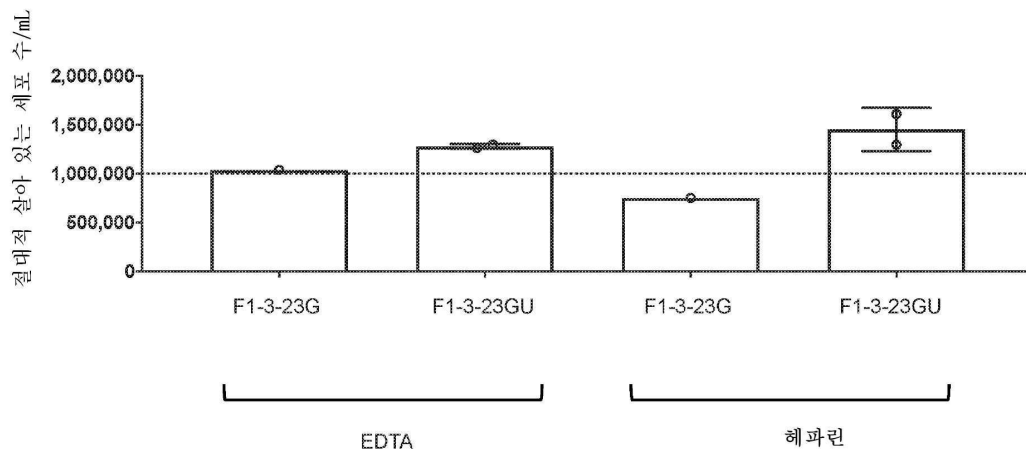
도면3a



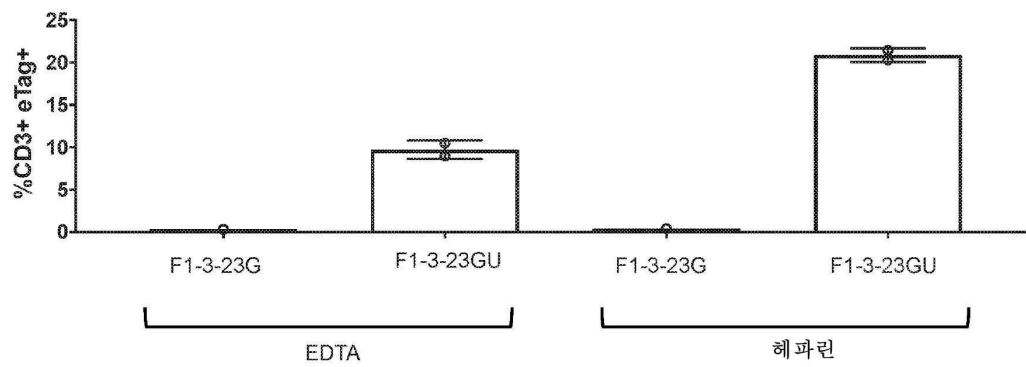
도면3b



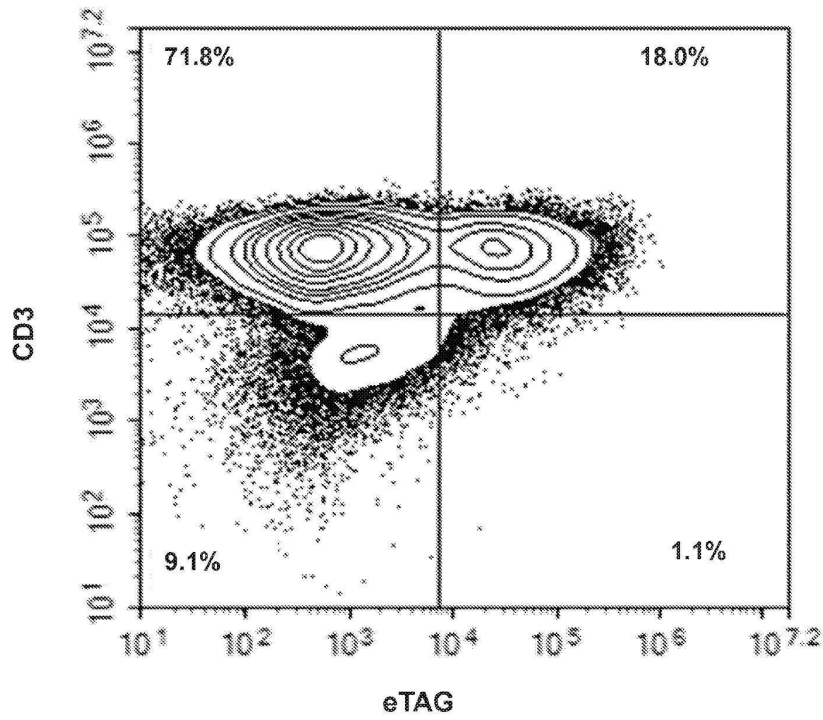
도면4a



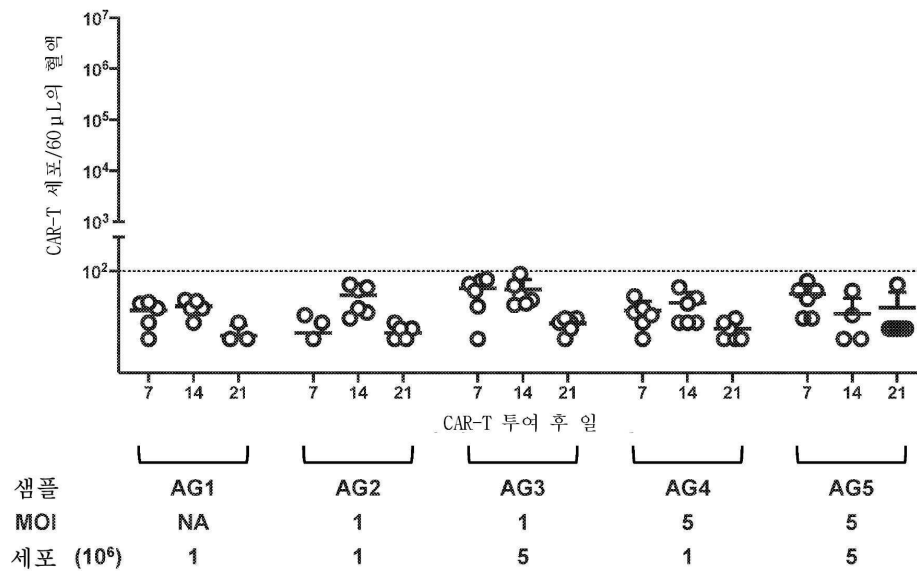
도면4b



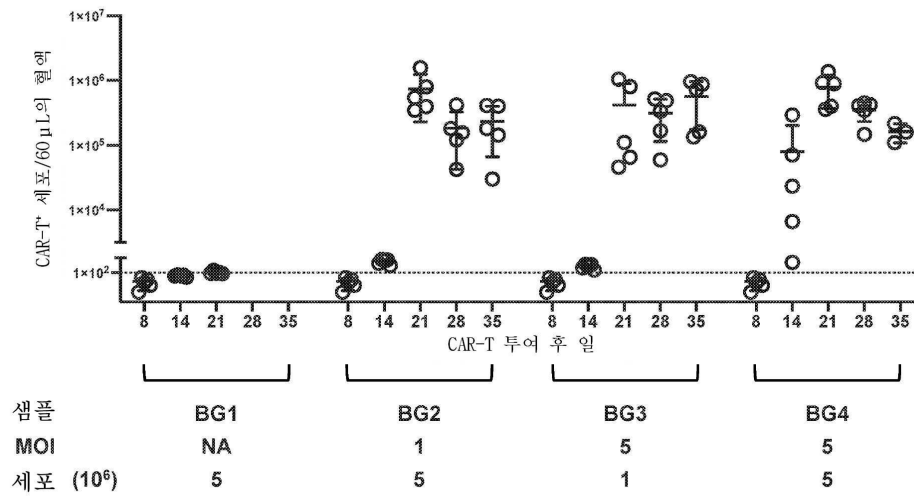
도면5



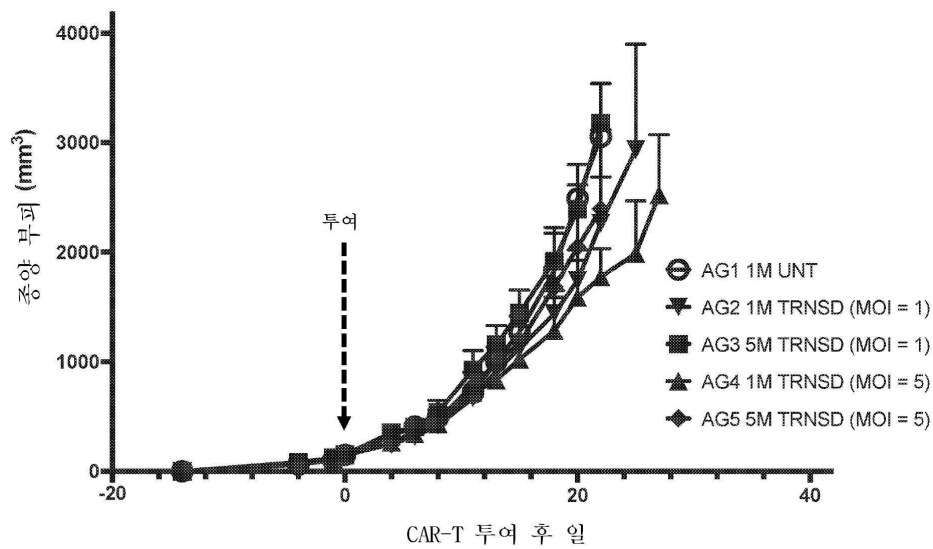
도면6



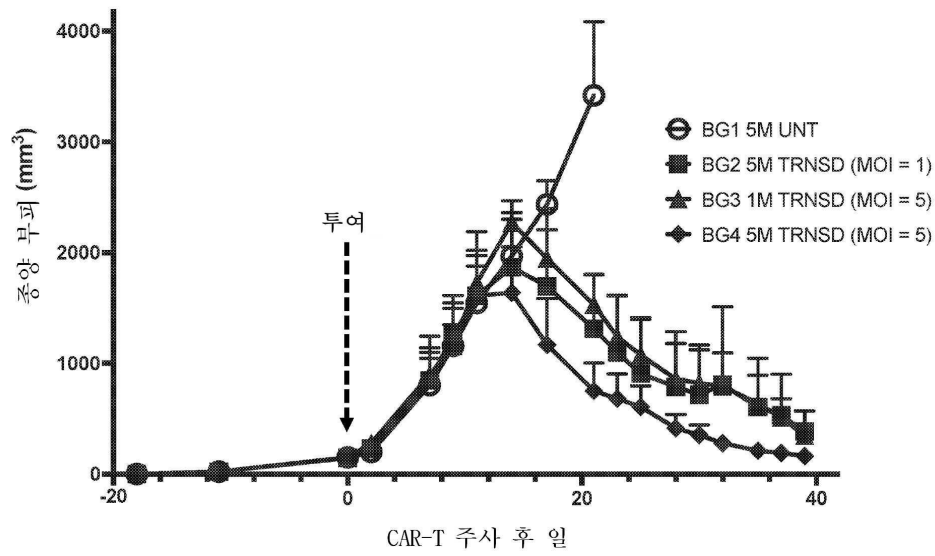
도면7



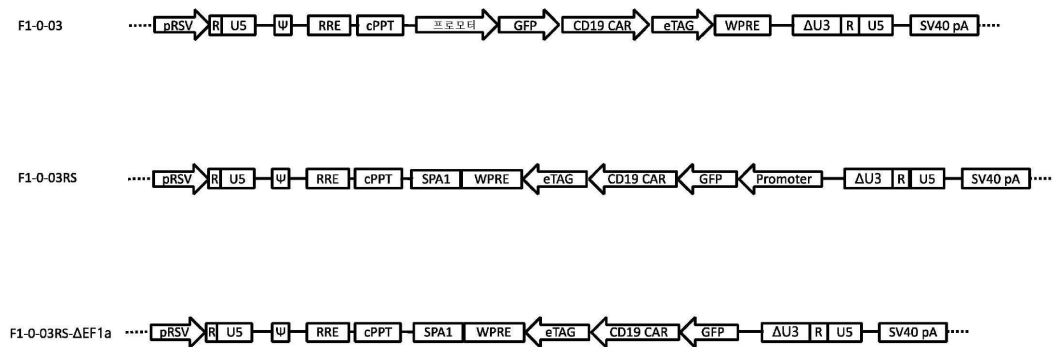
도면8



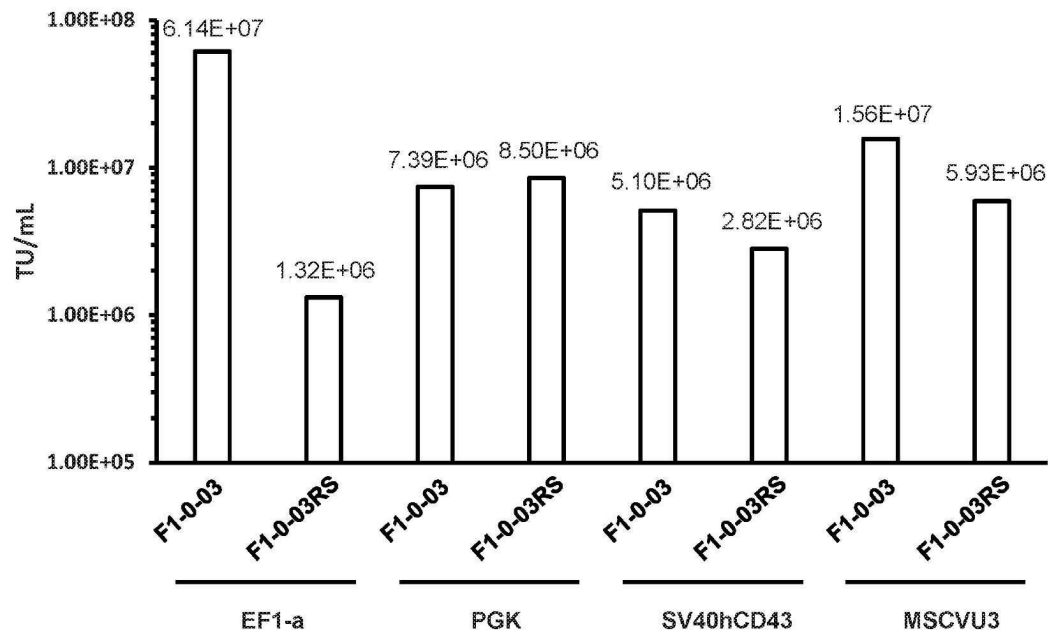
도면9



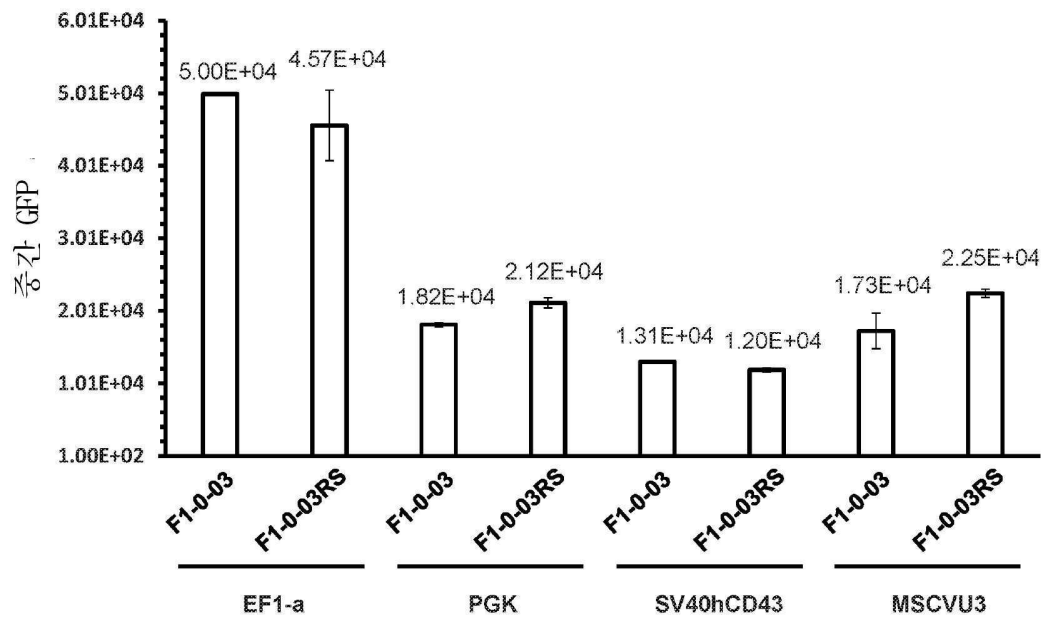
도면10



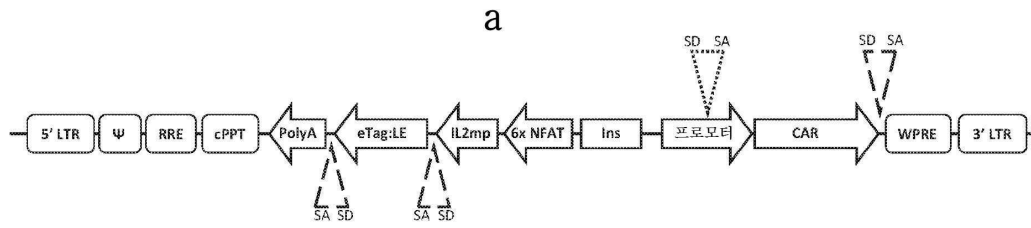
도면11a



도면11b



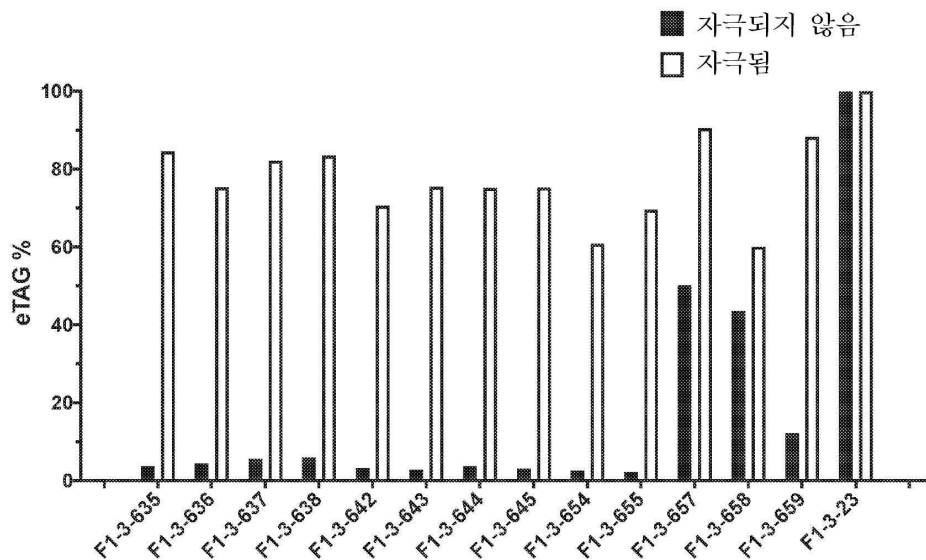
도면12



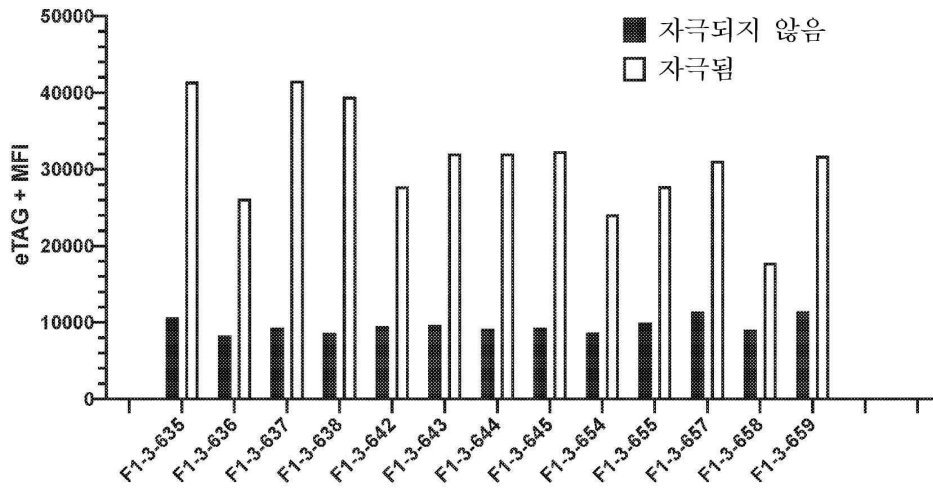
b

ID#	폴리A	LE	NFAT	결연체	CAR 프로모터	크기 (kb) (5' LTR에서 3' LTR)	바이러스 역가 TU/mL	
F1-3-636	hGH 폴리A	E006-T016-S186-S050	6XNFAT- miniL2P	β-글로빈 폴리A 스페이스 B - 역방향	EF1a	8191	4.22E+07	
F1-3-635				β-글로빈 폴리A 스페이스 A - 역방향		8051	9.05E+07	
F1-3-637				250 cHS4 결연체 v1 - 정방향		7782	1.01E+08	
F1-3-638				250 cHS4 결연체 v2 - 역방향		7782	5.23E+07	
F1-3-642				650 cHS4 결연체 - 정방향		8189	5.97E+07	
F1-3-643				650 cHS4 결연체 - 역방향		8189	6.02E+07	
F1-3-644				400 cHS4 결연체 - 정방향		7959	5.38E+07	
F1-3-645				400 cHS4 결연체 - 역방향		7959	1.33E+08	
F1-3-654	SPA2- 단방향 - 역방향			{eTag OA JUN -- CSF2RA -- MPL -- CD40}		650 cHS4 결연체 및 β-글로빈 폴리A 스페이스 B - 정방향	8490	1.09E+08
F1-3-655						β-글로빈 폴리A 스페이스 B 및 650 cHS4 결연체 - 역방향	8490	9.03E+07
F1-3-662					결연체 없이 스페이스 C - 역방향	7778	2.12E+08	
F1-3-657					250 cHS4 결연체 - 역방향	PGK	7111	2.70E+07
F1-3-658					650 cHS4 결연체 - 정방향		7518	1.11E+07
F1-3-659					650 cHS4 결연체 - 역방향		7518	3.81E+07

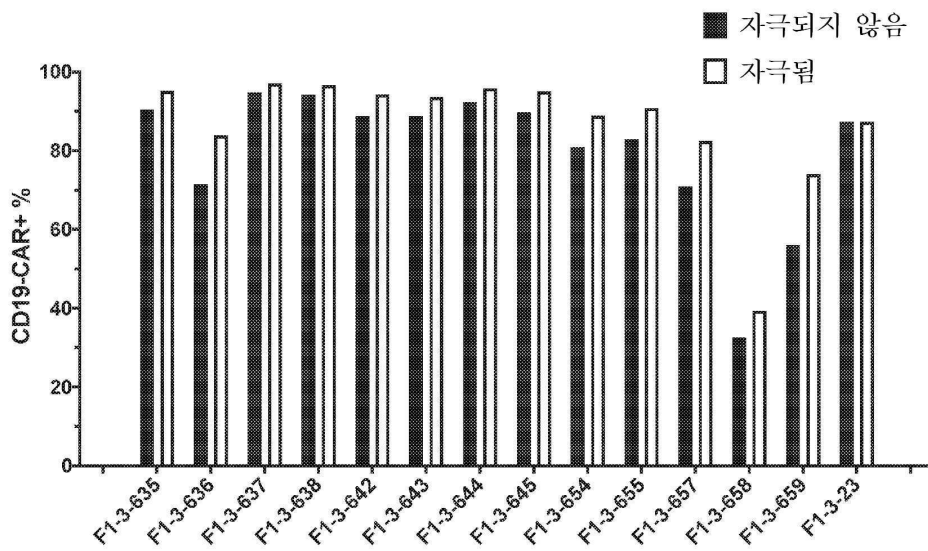
도면13



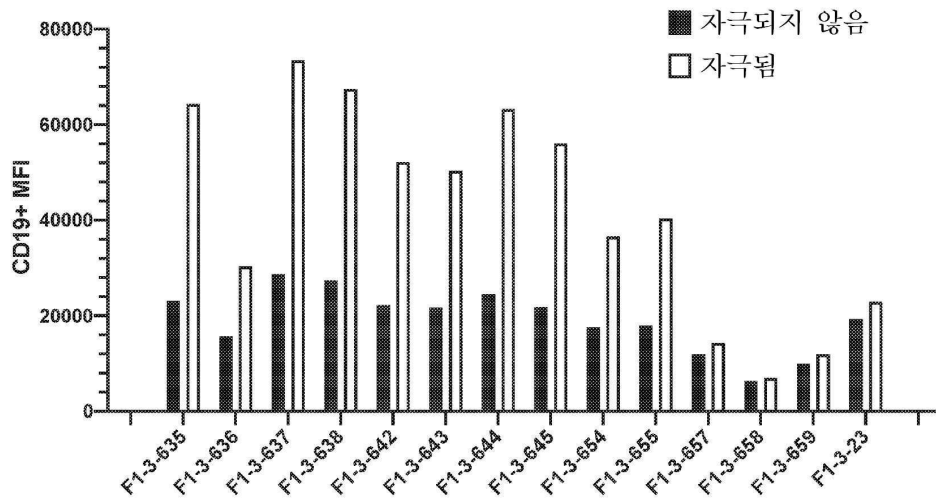
도면14



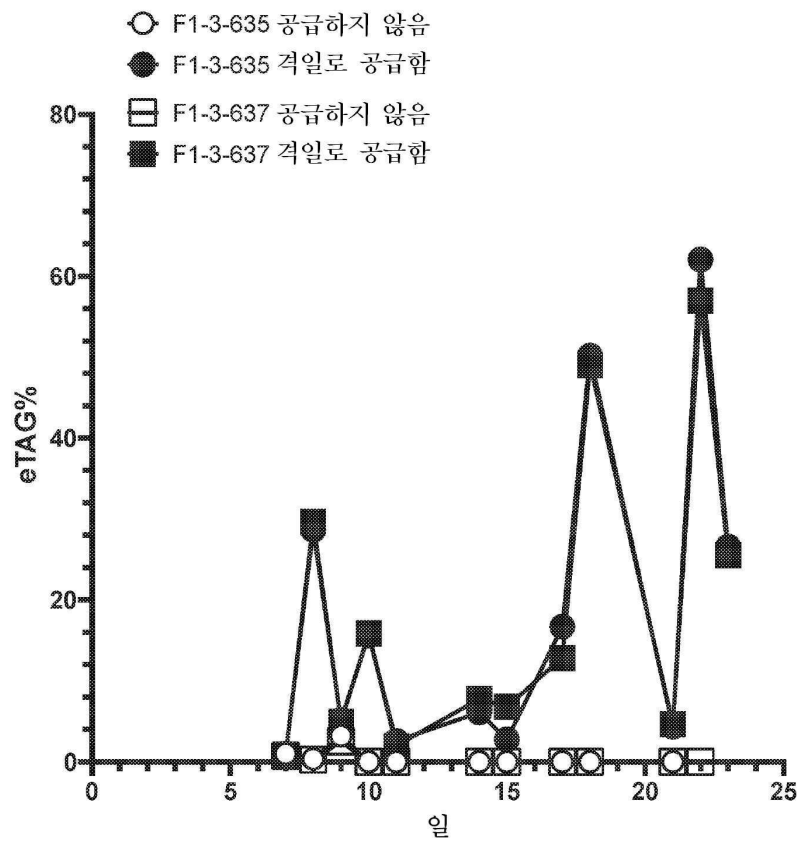
도면15



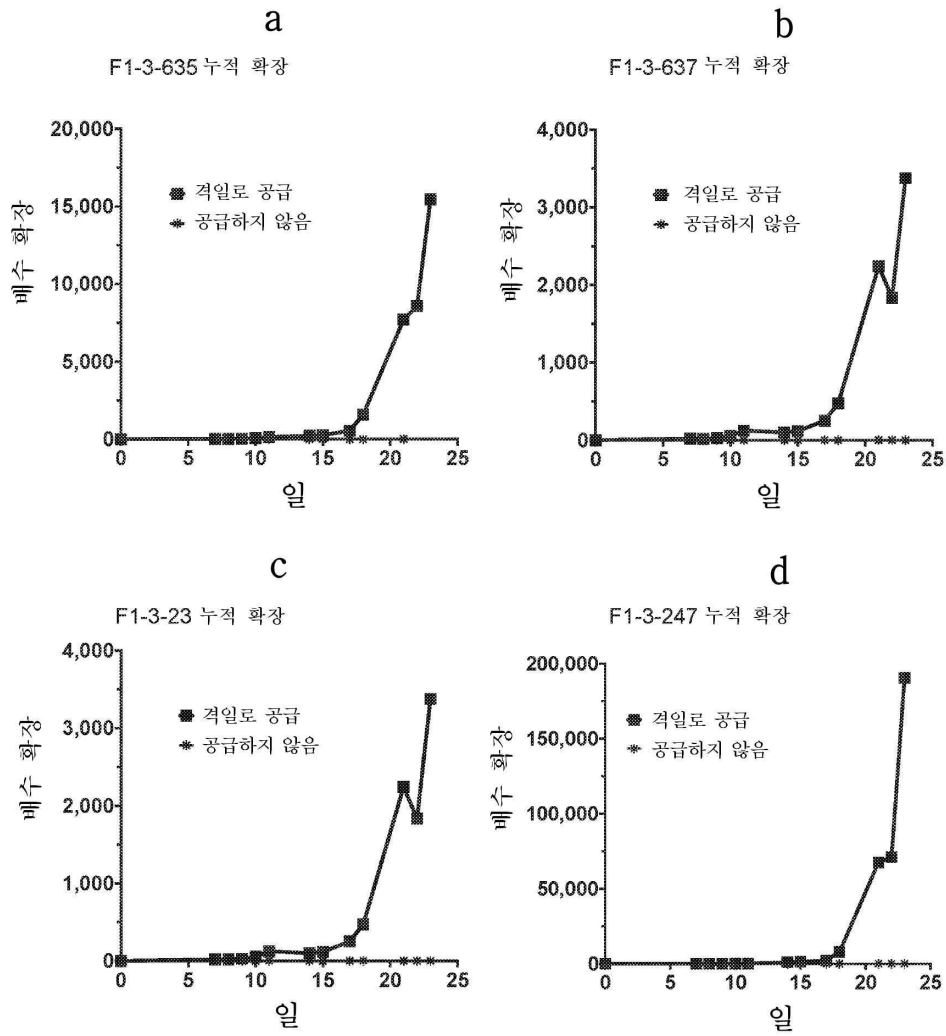
도면16



도면17

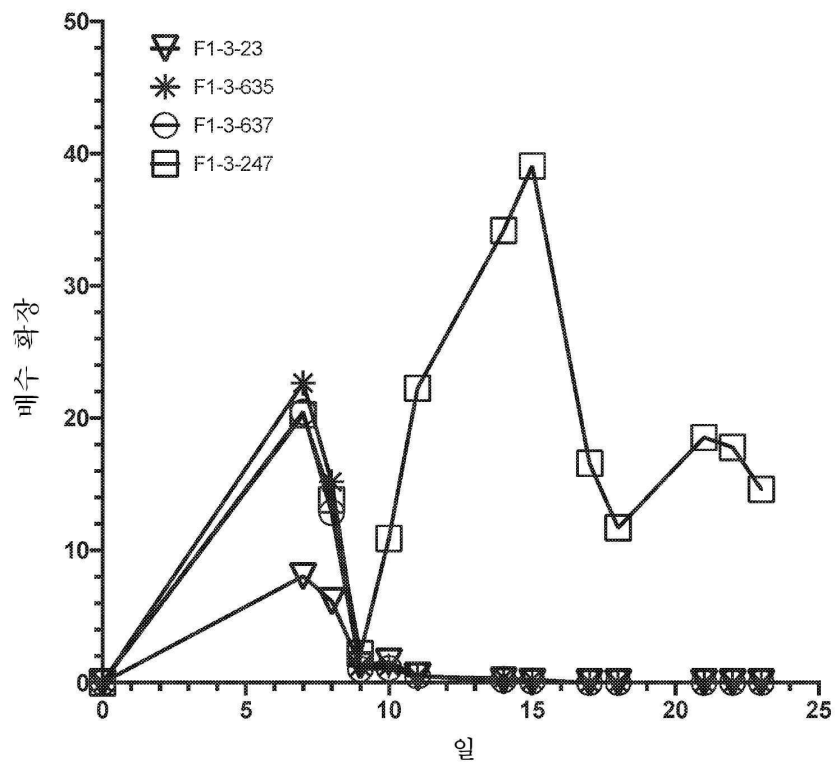


도면18



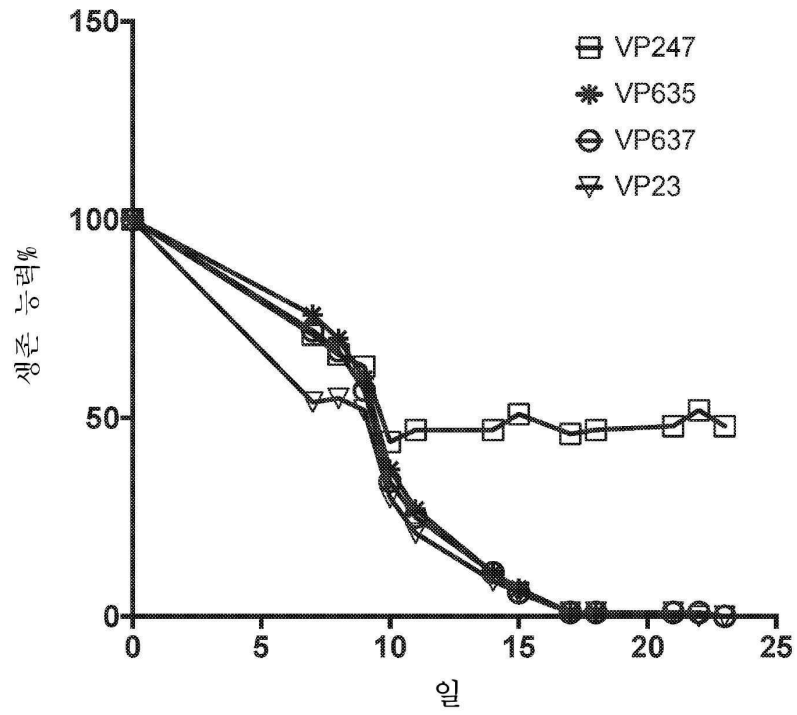
도면19

누적 확장 - 공급하지 않음

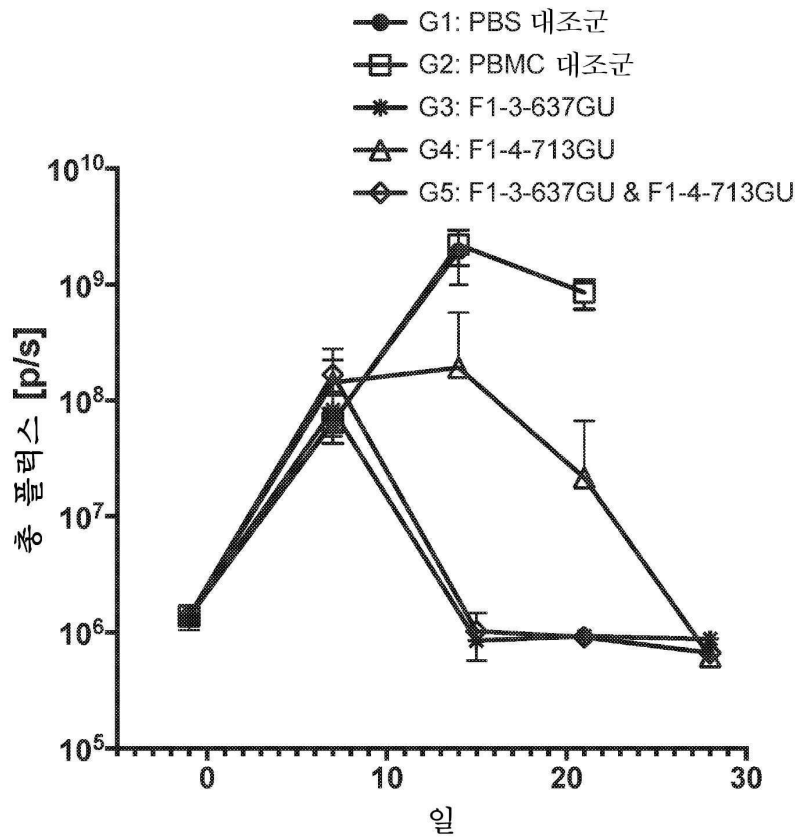


도면20

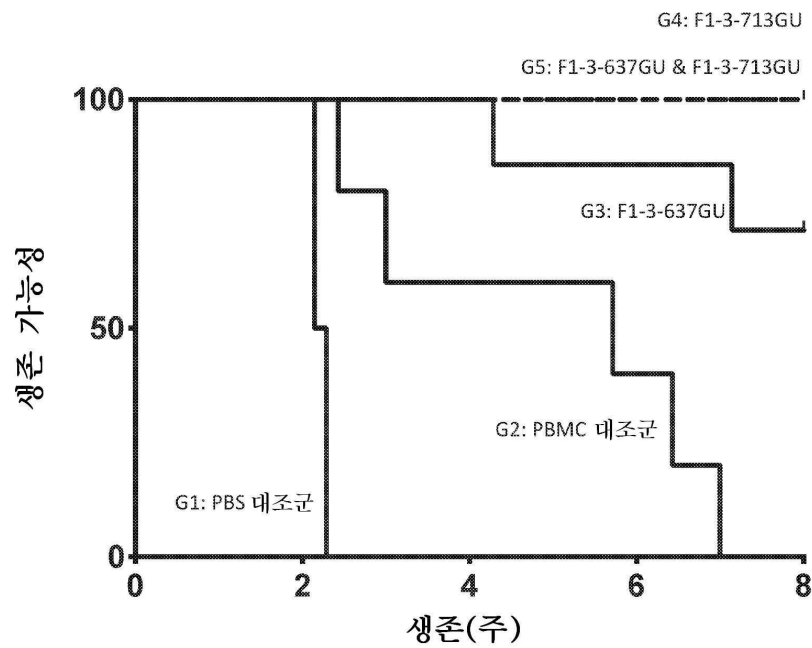
생존- 공급하지 않음



도면21



도면22

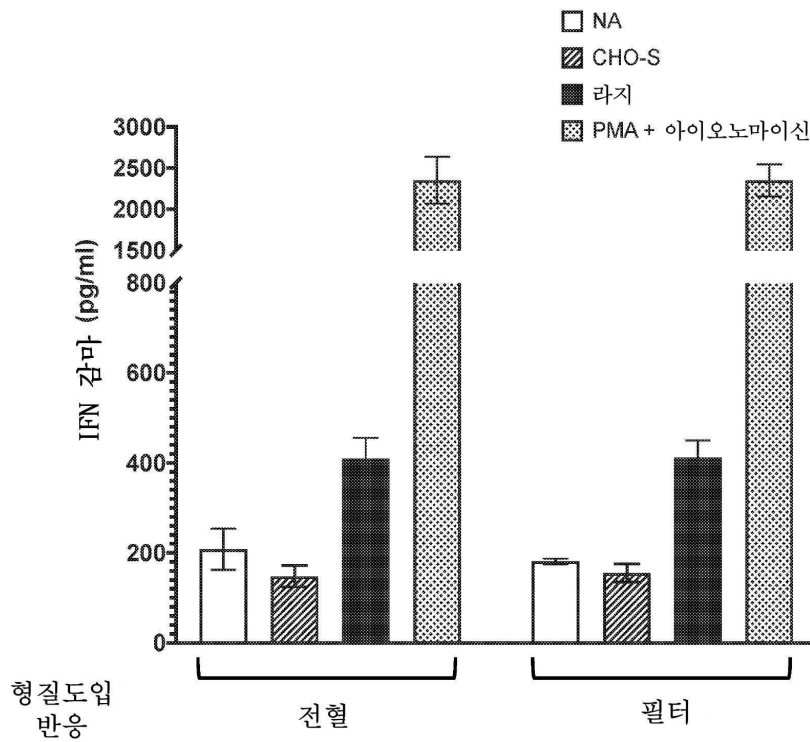


도면23

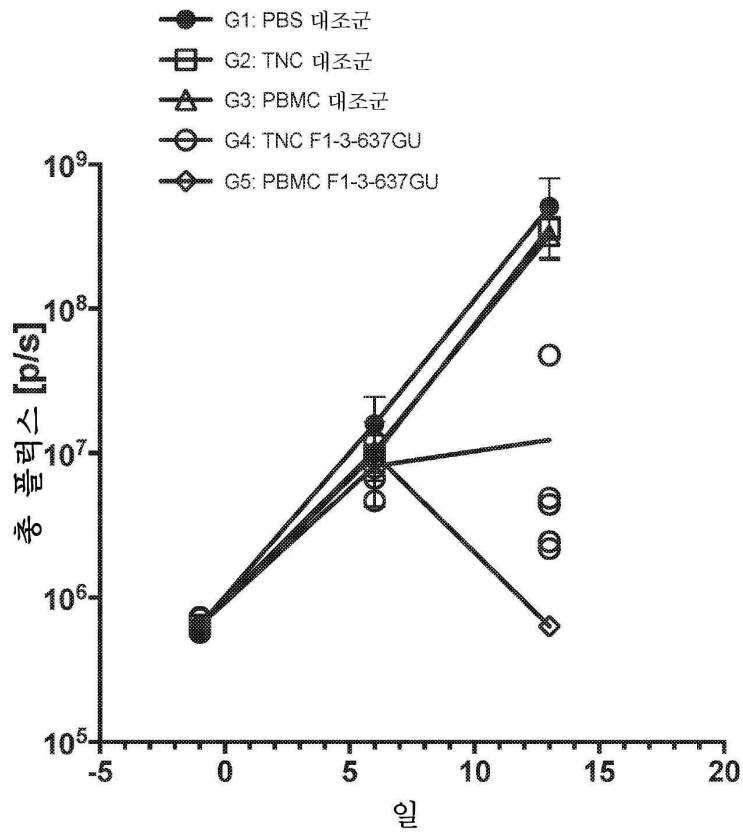
형질도입	세포 수(제6일)		단일 림프구	단일 림프구				
	시작	수확		CD56+ 수	CD3+ 수	CD3+CD4+ 수	CD3+CD8+ 수	CD3+CAR+ 수
전혈	300만	2030만	38,980	2,590	36,800	14,578	16,441	4,013
필터	150만	940만	25,380	1,647	23,943	8,565	11,013	3,625

형질도입	단일 림프구	단일 림프구				
	모%	CD56+ 모%	CD3+ 모%	CD3+CD4+ 모%	CD3+CD8+ 모%	CD3+CAR+ 모%
전혈	77.96%	6.64%	94.41%	37.40%	42.18%	10.30%
필터	72.05%	6.49%	94.34%	33.75%	43.39%	14.28%

도면24



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> F1 ONCOLOGY INC.

FROST, Gregory Ian

HAERIZADEH, Farzad

ONUUFFER, James Joseph

VIGANT, Frederic

KUNDU, Anirban

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE MODIFICATION AND DELIVERY OF
LYMPHOCYTES

<130> F1.003.W0.01

<150> PCT/US2019/049259

<151> 2019-09-02

<150> 62/894,926

<151> 2019-09-02

<150> 62/985,741

<151> 2020-03-05

<150> 62/894,849

<151> 2019-09-01

<150> 62/894,852

<151> 2019-09-01

<150> 62/894,853

<151> 2019-09-01

<150> 62/943,207

<151> 2019-12-03

<160> 372

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> integrin-binding peptide segment

<400> 1

Arg Gly Asp

1

<210> 2

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(43)

<223> wild-type CD8 Stalk

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala

35 40

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> wild-type CD28 Stalk

<400> 3

Phe Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

35 40

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 4

Cys Pro Pro Cys

1

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr

1 5

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic: Hinge

<400> 6

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

1 5 10 15

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 7

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr

1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 8

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 9

Lys Cys Cys Val Asp Cys Pro

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 10

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 11

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 12

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 13

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys

1 5 10 15

Pro

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 14

Ser Pro Asn Met Val Pro His Ala His His Ala Gln

1 5 10

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 15

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Tyr Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 16

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Hinge

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> CD* alpha Transmembrane domain

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<223> CD8 beta Transmembrane domain

<400> 18

Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Val Ala Ile His Leu Cys Cys

20

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(25)

<223> CD4 Transmembrane domain

<400> 19

Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly

1 5 10 15

Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys

20

25

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222>

(1)..(23)

<223> CD3 zeta Transmembrane domain

<400> 20

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu

1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val

20

<210> 21

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> CD28 Transmembrane domain

<400> 21

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(26)

<223> OX40 Transmembrane domain

<400> 22

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro

1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu

20 25

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(24)

<223> CD7 Transmembrane domain

<400> 23

Ala Leu Pro Ala Ala Leu Ala Val Ile Ser Phe Leu Leu Gly Leu Gly

1 5 10 15

Leu Gly Val Ala Cys Val Leu Ala

20

<210> 24

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(69)

<223> CD8a Stalk and Transmembrane domain

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys

65

<210>

> 25

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(66)

<223> CD28 Stalk and Transmembrane domain

<400> 25

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 26

<211> 163

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(163)

<223> CD3Z Activating domain isoform 1

<400> 26

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80

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

85 90 95
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 100 105 110
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 115 120 125
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 130 135 140
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu

145 150 155 160
 Pro Pro Arg

<210> 27
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(164)
 <223> CD3Z Activating domain isoform 2
 <400> 27

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15
 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
 20 25 30

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

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

100 105 110
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 115 120 125
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 130 135 140
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(112)

<223> CD3Z Activating domain isoform 3

<400> 28

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

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

100 105 110
 <210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(113)

<223> CD3Z Activating domain isoform

<400> 29

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

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu

65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr

85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro

100 105 110

Arg

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> CD3Z Activating domain isoform 4

<400> 30

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

1 5 10 15

Val Leu Asp Lys Arg

20

<210> 31

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> CD3Z Activating domain isoform 5

<400> 31

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gly Met Lys

20

<210> 32

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> CD3Z Activating domain isoform 6

<400> 32

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

1 5 10 15

Ala Leu His Met Gln

20

<210> 33

<211> 171

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(171)

<223> CD3D Activating domain isoform 1

<400> 33

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg

20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val

35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile

50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys

65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys

85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val

100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His

115 120 125

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

130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr

145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

165 170

<210> 34

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(127)

<223> CD3D Activating domain isoform 2

<400> 34

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

1 5 10 15
 Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 20 25 30
 Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 35 40 45

 Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 50 55 60
 Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Thr Ala Asp Thr Gln
 85 90 95
 Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp
 100 105 110

Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
 115 120 125

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> CD3D Activating domain isoform 3

<400> 35

Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr Ser

1 5 10 15

His Leu Gly Gly Asn

20

<210> 36

<211> 206

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(206)

<223> CD3E Activating domain isoform 1

<400> 36

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr

20 25 30

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

35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp

65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr

85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu

100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Met Ser

115 120 125

Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu

130 135 140

Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro

145 150 155 160

Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys

165 170 175

Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys

180 185 190

Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

195 200 205

<210> 37

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> CD3E Activating domain isoform 2
 <400> 37
 Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Asn Gln Arg
 20

<210> 38
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(182)
 <223> CD3G Activating domain isoform 1
 <400> 38
 Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
 1 5 10 15
 Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
 20 25 30
 Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
 35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
 50 55 60
 Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80
 Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
 85 90 95
 Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
 100 105 110
 Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val

115 120 125
 Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
 130 135 140
 Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
 145 150 155 160
 Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn

180

<210> 39

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> CD3G Activating domain isoform 2

<400> 39

Asp Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser

1 5 10 15

His Leu Gln Gly Asn

20

<210> 40

<211> 226

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(226)

<223> CD79A Activating domain isoform 1

<400> 40

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe

1 5 10 15

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

20

25

30

Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
 35 40 45
 Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val
 50 55 60

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

 Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
 130 135 140
 Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
 145 150 155 160
 Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu
 165 170 175
 Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
 180 185 190

 Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
 195 200 205
 Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
 210 215 220
 Lys Pro
 225
 <210> 41
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(188)

<223> CD79A Activating domain isoform 2

<400> 41

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe

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

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

130 135 140
Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met
145 150 155 160
Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly
165 170 175
Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro
180 185

<210> 42

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> CD79A Activating domain isoform 3

<400> 42

Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu

1 5 10 15

Asp Ile Ser Arg Gly

20

<210> 43

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(113)

<223> DAP12 Activating domain isoform 1

<400> 43

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly

85 90 95

Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln Arg Pro Tyr Tyr

100 105 110

Lys

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(107)

<223> DAP12 Activating domain isoform 2

<400> 44

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Gly Leu Arg Pro Val Gln Ala Gln Ala Gln Ser Asp
20 25 30

Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu Ala Gly Ile Val Met
35 40 45

Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu Ala Val Tyr Phe Leu
50 55 60

Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala Glu Ala Thr Arg Lys
65 70 75 80

Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln
85 90 95

Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr Gln
100 105

<210> 45

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(102)

<223> DAP12 Activating domain isoform 3

<400> 45

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu
20 25 30

Ala Gly Ile Val Met Gly Asp Leu Val Leu Thr Val Leu Ile Ala Leu
 35 40 45
 Ala Val Tyr Phe Leu Gly Arg Leu Val Pro Arg Gly Arg Gly Ala Ala
 50 55 60
 Glu Ala Ala Thr Arg Lys Gln Arg Ile Thr Glu Thr Glu Ser Pro Tyr
 65 70 75 80

Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser Asp Leu Asn Thr
 85 90 95
 Gln Arg Pro Tyr Tyr Lys
 100

<210> 46

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(101)

<223> DAP12 Activating domain isoform 4

<400> 46

Met Gly Gly Leu Glu Pro Cys Ser Arg Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Ser Asp Cys Ser Cys Ser Thr Val Ser Pro Gly Val Leu

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

85 90 95
 Arg Pro Tyr Tyr Lys
 100

<210> 47

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> DAP12 Activating domain isoform 5

<400> 47

Glu Ser Pro Tyr Gln Glu Leu Gln Gly Gln Arg Ser Asp Val Tyr Ser

1 5 10 15

Asp Leu Asn Thr Gln

20

<210> 48

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

><221> misc_feature

<222> (1)..(86)

<223> FCER1G Activating domain isoform 1

<400> 48

Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Glu Gln Ala

1 5 10 15

Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val

50 55 60

Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys

65 70 75 80

His Glu Lys Pro Pro Gln

85

<210> 49

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> FCER1G Activating domain isoform 2
 <400> 49
 Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Lys His Glu
 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> DAP10 Activating domain
 <400> 50
 Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met
 1 5 10 15

Pro Gly Arg Gly
 20

<210> 51
 <211> 68
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(68)
 <223> CD28 Activating domain
 <400> 51

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

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

Ala Tyr Arg Ser

65

<210> 52

<211> 619

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(619)

<223> ZAP70 Activating domain

<400> 52

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

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

100 105 110
Gly Val Phe Asp Cys Leu Arg Asp Ala Met Val Arg Asp Tyr Val Arg
115 120 125

Gln Thr Trp Lys Leu Glu Gly Glu Ala Leu Glu Gln Ala Ile Ile Ser
130 135 140

Gln Ala Pro Gln Val Glu Lys Leu Ile Ala Thr Thr Ala His Glu Arg
145 150 155 160

Met Pro Trp Tyr His Ser Ser Leu Thr Arg Glu Glu Ala Glu Arg Lys
165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Ala Gln Thr Asp Gly Lys Phe Leu Leu Arg Pro Arg
180 185 190

Lys Glu Gln Gly Thr Tyr Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Val
195 200 205

Tyr His Tyr Leu Ile Ser Gln Asp Lys Ala Gly Lys Tyr Cys Ile Pro
210 215 220

Glu Gly Thr Lys Phe Asp Thr Leu Trp Gln Leu Val Glu Tyr Leu Lys
225 230 235 240

Leu Lys Ala Asp Gly Leu Ile Tyr Cys Leu Lys Glu Ala Cys Pro Asn
245 250 255

Ser Ser Ala Ser Asn Ala Ser Gly Ala Ala Ala Pro Thr Leu Pro Ala
260 265 270

His Pro Ser Thr Leu Thr His Pro Gln Arg Arg Ile Asp Thr Leu Asn
275 280 285

Ser Asp Gly Tyr Thr Pro Glu Pro Ala Arg Ile Thr Ser Pro Asp Lys
290 295 300

Pro Arg Pro Met Pro Met Asp Thr Ser Val Tyr Glu Ser Pro Tyr Ser
305 310 315 320

Asp Pro Glu Glu Leu Lys Asp Lys Lys Leu Phe Leu Lys Arg Asp Asn
325 330 335

Leu Leu Ile Ala Asp Ile Glu Leu Gly Cys Gly Asn Phe Gly Ser Val
340 345 350

Arg Gln Gly Val Tyr Arg Met Arg Lys Lys Gln Ile Asp Val Ala Ile
355 360 365

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

370 375 380
 Arg Glu Ala Gln Ile Met His Gln Leu Asp Asn Pro Tyr Ile Val Arg
 385 390 395 400
 Leu Ile Gly Val Cys Gln Ala Glu Ala Leu Met Leu Val Met Glu Met
 405 410 415
 Ala Gly Gly Gly Pro Leu His Lys Phe Leu Val Gly Lys Arg Glu Glu

 420 425 430
 Ile Pro Val Ser Asn Val Ala Glu Leu Leu His Gln Val Ser Met Gly
 435 440 445
 Met Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Asn Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 450 455 460
 Arg Asn Val Leu Leu Val Asn Arg His Tyr Ala Lys Ile Ser Asp Phe
 465 470 475 480
 Gly Leu Ser Lys Ala Leu Gly Ala Asp Asp Ser Tyr Tyr Thr Ala Arg

 485 490 495
 Ser Ala Gly Lys Trp Pro Leu Lys Trp Tyr Ala Pro Glu Cys Ile Asn
 500 505 510
 Phe Arg Lys Phe Ser Ser Arg Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr
 515 520 525
 Met Trp Glu Ala Leu Ser Tyr Gly Gln Lys Pro Tyr Lys Lys Met Lys
 530 535 540
 Gly Pro Glu Val Met Ala Phe Ile Glu Gln Gly Lys Arg Met Glu Cys

 545 550 555 560
 Pro Pro Glu Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Ala Leu Met Ser Asp Cys Trp
 565 570 575
 Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Arg Pro Asp Phe Leu Thr Val Glu Gln Arg
 580 585 590
 Met Arg Ala Cys Tyr Tyr Ser Leu Ala Ser Lys Val Glu Gly Pro Pro
 595 600 605
 Gly Ser Thr Gln Lys Ala Glu Ala Ala Cys Ala
 610 615

<210> 53

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> CD137 Co-stimulatory domain

<400> 53

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 54

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(41)

<223> CD28 Co-stimulatory domain

<400> 54

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 55

<211> 41

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(41)

<223> IC Co-stimulatory domain

<400> 55

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala

20 25 30

Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 56

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> ICOS Co-stimulatory domain

<400> 56

Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Thr Leu

35

<210> 57

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(37)

<223> OX40 Co-stimulatory domain

<400> 57

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 20 25 30

Thr Leu Ala Lys Ile
 35

<210> 58

<211> 49

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(49)

<223> CD27 Co-stimulatory domain

<400> 58

His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu

1 5 10 15

Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser

20 25 30

Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser

35 40 45

Pro

<210> 59

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(114)

<223> BLTA Co-stimulatory domain

<400> 59

Cys Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr

35 40 45
 Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly
 50 55 60
 Ser Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile
 65 70 75 80
 Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val
 100 105 110
 Arg Ser

<210> 60

<211> 187

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(187)

<223> CD30 Co-stimulatory domain

<400> 60

Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr

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

65 70 75 80
 Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg
 85 90 95
 Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met

100 105 110
Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu
115 120 125
Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu

130 135 140
Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro
145 150 155 160
Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys
165 170 175
Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys
180 185

<210> 61

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222>

> (1)..(54)

<223> GITR Co-stimulatory domain

<400> 61

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

<210> 62

<211> 60

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(60)

<223> HVEM Co-stimulatory domain

<400> 62

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His

50 55 60

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 64

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25 30

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 65

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 66

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 66

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 67

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 68

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 69

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Synthetic: Linker

<400> 70

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 71

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Linker

<400> 71

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 72

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<223> CD8 Signal peptide

<400> 72

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: HA Epitope

<400> 73

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FLAG epitope

<400> 74

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: c-myc Epitope

<400> 75

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: His5 Affinity

<400> 76

His His His His His

1 5

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: HisX6 Affinity

<400> 77

His His His His His His

1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Strep Tag Affinity

<400> 78

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 79

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Affinity tag

<400> 79

Arg Tyr Ile Arg Ser

1 5

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Affinity tag

<400> 80

Phe His His Thr

1

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Affinity tag

<400> 81

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg

1 5 10 15

Ala

<210> 82

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(357)

<223> EGFR Truncation

<400> 82

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

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

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu

225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala

325 330 335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly

340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met

355

<210

> 83

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cleavage signal

<400> 83

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

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 84

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG IL7RA Ins PPCL (interleukin 7 receptor)

<400> 84

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175
 Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180 185 190
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195 200 205

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

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

Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile
 340 345 350
 Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu
 355 360 365

<210> 85

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG IL7RA Ins PPCL (interleukin 7 receptor)

<400> 85

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

 20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

 35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

 50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

 85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

 100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

 115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

 130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

 165 170 175

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

 180 185 190

Gln Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu

 195 200 205

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

 210 215 220

Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu

225 230

<210> 86

<211> 194

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Myc Tag LMP1 NC_007605_1

<400> 86

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu His Asp Leu Glu

1 5 10 15

Arg Gly Pro Pro Gly Pro Arg Arg Pro Pro Arg Gly Pro Pro Leu Ser

20 25 30

Ser Ser Leu Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe

35 40 45

Trp Leu Tyr Ile Val Met Ser Asp Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val

50 55 60

Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Met Leu Ile Ile Ile Ile Leu Ile Ile Phe

65 70 75 80

Ile Phe Arg Arg Asp Leu Leu Cys Pro Leu Gly Ala Leu Cys Ile Leu

85 90 95

Leu Leu Met Ile Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Asn Leu His Gly

100 105 110

Gln Ala Leu Phe Leu Gly Ile Val Leu Phe Ile Phe Gly Cys Leu Leu

115 120 125

Val Leu Gly Ile Trp Ile Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu Gly

130 135 140

Ala Thr Ile Trp Gln Leu Leu Ala Phe Phe Leu Ala Phe Phe Leu Asp

145 150 155 160

Leu Ile Leu Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr

165 170 175

Leu Leu Val Asp Leu Leu Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ile Leu Ile

180 185 190

Trp Met

<210> 87

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Myc LMP1 NC_007605_1

<400> 87

Met Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ser Ser Ser Leu Gly

1 5 10 15
Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Trp Leu Tyr Ile

20 25 30
Val Met Ser Asp Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe

35 40 45
Ala Leu Met Leu Ile Ile Ile Ile Leu Ile Ile Phe Ile Phe Arg Arg

50 55 60
Asp Leu Leu Cys Pro Leu Gly Ala Leu Cys Ile Leu Leu Leu Met Ile

65 70 75 80
Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Asn Leu His Gly Gln Ala Leu Phe

85 90 95
Leu Gly Ile Val Leu Phe Ile Phe Gly Cys Leu Leu Val Leu Gly Ile

100 105 110
Trp Ile Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu Gly Ala Thr Ile Trp

115 120 125
Gln Leu Leu Ala Phe Phe Leu Ala Phe Phe Leu Asp Leu Ile Leu Leu

130 135 140
Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val Asp

145 150 155 160
Leu Leu Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ile Leu Ile Trp Met

165 170

<210> 88

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LMP1 NC_007605_1

<400> 88

Met Glu His Asp Leu Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Arg Arg Pro Pro

1 5 10 15

Arg Gly Pro Pro Leu Ser Ser Ser Leu Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu

20 25 30

Leu Leu Ala Leu Leu Phe Trp Leu Tyr Ile Val Met Ser Asp Trp Thr

35 40 45

Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Met Leu Ile Ile

50 55 60

Ile Ile Leu Ile Ile Phe Ile Phe Arg Arg Asp Leu Leu Cys Pro Leu

65 70 75 80

Gly Ala Leu Cys Ile Leu Leu Leu Met Ile Thr Leu Leu Leu Ile Ala

85 90 95

Leu Trp Asn Leu His Gly Gln Ala Leu Phe Leu Gly Ile Val Leu Phe

100 105 110

Ile Phe Gly Cys Leu Leu Val Leu Gly Ile Trp Ile Tyr Leu Leu Glu

115 120 125

Met Leu Trp Arg Leu Gly Ala Thr Ile Trp Gln Leu Leu Ala Phe Phe

130 135 140

Leu Ala Phe Phe Leu Asp Leu Ile Leu Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu

145 150 155 160

Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val Asp Leu Leu Trp Leu Leu Leu

165 170 175

Phe Leu Ala Ile Leu Ile Trp Met

180

<210> 89

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LMP1 NC_007605_1

<400> 89

Met Ser Leu Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe

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

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

 130 135 140
 Leu Leu Val Asp Leu Leu Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ile Leu Ile
 145 150 155 160
 Trp Met

<210> 90

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG CRLF2 transcript variant 1 NM_022148_3

<400> 90

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

 20 25 30
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

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

 85 90 95
 Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 100 105 110
 Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 115 120 125
 Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
 130 135 140
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

 145 150 155 160
 Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 165 170 175
 Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180 185 190
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys

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

 275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
 290 295 300
 Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 305 310 315 320
 Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Ala Glu Thr Pro Thr Pro Pro
 325 330 335
 Lys Pro Lys Leu Ser Lys Cys Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile Leu

340 345 350
 Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp
 355 360

<210> 91

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG CRLF2 transcript variant 1 NM_022148_3

<400> 91

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

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

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 100 105 110
 Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 115 120 125

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

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

Ser Leu Trp

225

<210> 92

<211> 354

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG CSF2RB NM_000395_2

<400> 92

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 20 25 30
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 35 40 45

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

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Thr Glu Ser Val Leu Pro Met
325 330 335

Trp Val Leu Ala Leu Ile Glu Ile Phe Leu Thr Ile Ala Val Leu Leu

340 345 350

Ala Leu

<210> 93

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG CSF2RB NM_000395_2

<400> 93

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190
 Gln Thr Glu Ser Val Leu Pro Met Trp Val Leu Ala Leu Ile Glu Ile
 195 200 205
 Phe Leu Thr Ile Ala Val Leu Leu Ala Leu
 210 215
 <210> 94
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: eTAG CSF3R transcript variant 1 NM_000760_3
 <400> 94
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 20 25 30
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 35 40 45
 Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
 50 55 60
 Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
 65 70 75 80
 Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
 85 90 95
 Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 100 105 110
 Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 115 120 125
 Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
 130 135 140
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Thr Pro Glu Gly Ser Glu Leu
325 330 335
His Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Asn Cys Leu
340 345 350
Cys Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys
355 360
<210> 95
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: eTAG CSF3R transcript variant 1 NM_000760_3
<400> 95

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

<210> 96
<211> 359
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG EPOR transcript variant 1 NM_000121_3

<400> 96

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

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

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu

225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

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

325 330 335

Cys Cys Leu Thr Leu Ser Leu Ile Leu Val Val Ile Leu Val Leu Leu

340 345 350

Thr Val Leu Ala Leu Leu Ser

355

<210> 97

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG EPOR transcript variant 1 NM_000121_3

<400> 97

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

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

115 120 125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190
Gln Thr Pro Ser Asp Leu Asp Pro Cys Cys Leu Thr Leu Ser Leu Ile
195 200 205
Leu Val Val Ile Leu Val Leu Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ser
210 215 220

<210> 98

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG GHR transcript variant 1 NM_000163_4

<400> 98

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30
Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
 50 55 60
 Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

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

 130 135 140
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 145 150 155 160
 Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 165 170 175
 Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180 185 190
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 210 215 220
 Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 245 250 255
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

 260 265 270
 His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln

325 330 335
Phe Thr Cys Cys Glu Asp Phe Tyr Phe Pro Trp Leu Leu Cys Ile Ile
340 345 350
Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser
355 360 365

<210> 99

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG GHR transcript variant 1 NM_000163_4

<400> 99

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

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

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

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130

135

140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145

150

155

160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165

170

175

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

180

185

190

Gln Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln Phe Thr Cys Cys Glu Asp Phe Tyr

195

200

205

Phe Pro Trp Leu Leu Cys Ile Ile Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val

210

215

220

Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser

225

230

<210> 100

<211> 360

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG truncated after Fn F523C IL27RA NM_004843_3

<400> 100

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1

5

10

15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20

25

30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35

40

45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50

55

60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65

70

75

80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

	85	90	95
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu			
	100	105	110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala			
	115	120	125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu			
	130	135	140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr			
145	150	155	160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys			
	165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly			
	180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu			
	195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys			
	210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu			
225	230	235	240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met			
	245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala			
	260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val			
	275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His			
	290	295	300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro			
305	310	315	320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly His Leu Pro Asp Asn Thr Leu			
	325	330	335

Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile Leu Cys Leu Trp Gly Leu Phe Leu

340 345 350

Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala

355 360

<210> 101

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG truncated after Fn F523C IL27RA NM_004843_3

<400> 101

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190

Gln His Leu Pro Asp Asn Thr Leu Arg Trp Lys Val Leu Pro Gly Ile
195 200 205

Leu Cys Leu Trp Gly Leu Phe Leu Leu Gly Cys Gly Leu Ser Leu Ala

210 215 220

<210> 102

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG truncated after Fn S505N MPL NM_005373_2

<400> 102

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

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

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu

225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala

325 330 335

Trp Ile Ser Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Asn Ala

340 345 350

Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu

355

<210> 103

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTAG truncated after Fn S505N MPL NM_005373_2

<400> 103

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190

Gln Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser Leu Val Thr Ala Leu
195 200 205

His Leu Val Leu Gly Leu Asn Ala Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu
210 215 220

<210> 104

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTag OA JUN NM_002228_3

<400

> 104

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

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

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
 260 265 270
 His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
 290 295 300
 Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu
 325 330 335
 Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser
 340 345 350
 Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val
 355 360 365

<210> 105

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTag 1A JUN NM_002228_3

<400> 105

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 20 25 30
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 35 40 45
 Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50	55	60
Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu		
65	70	75
Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile		
85	90	95
Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu		
100	105	110
Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala		
115	120	125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu		
130	135	140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr		
145	150	155
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys		
165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly		
180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu		
195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys		
210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu		
225	230	235
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met		
245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala		
260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val		
275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His		
290	295	300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu
325 330 335

Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser
340 345 350

Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val
355 360 365

Ala

<210> 106

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTag 2A JUN NM_002228_3

<400> 106

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115	120	125
Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu		
130	135	140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr		
145	150	155
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr		
165	170	175
Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln		
180	185	190
Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro		
195	200	205
Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val		
210	215	220
Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn		
225	230	235
Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn		
245	250	255
Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His		
260	265	270
Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met		
275	280	285
Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val		
290	295	300
Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly		
305	310	315
Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu Glu		
325	330	335
Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr		
340	345	350
Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Ala		
355	360	365

Ala

<210> 107

<211> 371

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eTag 3A JUN NM_002228_3

<400> 107

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

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

180 185 190
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 210 215 220
 Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 245 250 255

 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
 260 265 270
 His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
 290 295 300
 Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 305 310 315 320

 Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu
 325 330 335
 Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser
 340 345 350
 Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val
 355 360 365
 Ala Ala Ala
 370
 <210> 108
 <211> 372
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: eTag 4A JUN NM_002228_3

 <400> 108

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

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

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
145 150 155 160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
165 170 175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ala Arg Leu

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Ala Ala Ala Ala

370

<210> 109

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic: Myc Tag OA JUN NM_002228_3

<400> 109

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

Val Val Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln

50

55

60

Leu Lys Gln Lys Val

65

<210> 110

<211> 70

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Myc Tag 1A JUN NM_002228_3

<400> 110

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

Val Val Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln

50 55 60

Leu Lys Gln Lys Val Ala

65 70

<210> 111

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Myc Tag 2A JUN NM_002228_3

<400> 111

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

Val Val Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln

50 55 60

Leu Lys Gln Lys Val Ala Ala

65 70

<210> 112

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Myc Tag 3A JUN NM_002228_3

<400> 112

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

Val Val Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln

50 55 60

Leu Lys Gln Lys Val Ala Ala Ala

65 70

<210> 113

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Myc Tag 4A JUN NM_002228_3

<400> 113

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

Val Val Ser Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Glu

20 25 30

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

35 40 45

Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln

50 55 60

Leu Lys Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala

65 70

<210> 114

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD2 transcript variant 1 NM_001328609_1

<400> 114

Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Gly Ser Leu Leu Met Val Phe Val

1 5 10 15

Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile

20

<210> 115

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3D transcript variant 1 NM_000732_4

<400> 115

Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly

1 5 10 15

Val Phe Cys Phe Ala

20

<210> 116

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3E NM_000733_3

<400> 116

Val Met Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly

1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser

20

25

<210> 117

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3G NM_000073_2

<400> 117

Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val Leu Ala Val Gly

1 5 10 15

Val Tyr Phe Ile Ala

20

<210> 118

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3Z CD247 transcript variant 1 NM_198053_2

<400> 118

Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu

1 5 10 15

Thr Ala Leu Phe Leu

20

<210> 119

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD4 transcript variant 1 and 2 NM_000616_4

<400> 119

Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile

1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile Phe Phe

20

<210> 120

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8A transcript variant 1 NM_001768_6

<400> 120

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

20

<210> 121

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8B transcript variant 2 NM_172213_3

<400> 121

Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Val Ala Ile His Leu Cys Cys

20

<210> 122

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD27 NM_001242_4

<400> 122

Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly

1 5 10 15

Ala Leu Phe Leu His

20

<210> 123

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD28 transcript variant 1 NM_006139_3

<400> 123

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20

25

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD40 transcript variant 1 and 6 NM_001250_5

<400> 124

Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile Leu

1

5

10

15

Leu Val Leu Val Phe Ile

20

<210> 125

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD79A transcript variant 1 NM_001783_3

<400> 125

Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro

1

5

10

15

Gly Thr Leu Leu Leu Phe

20

<210> 126

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD79B transcript variant 3 NM_001039933_2

<400> 126

Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val

1

5

10

15

Pro Ile Phe Leu Leu Leu

20

<210> 127

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: CRLF2 transcript variant 1 NM_022148_3
 <400> 127
 Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu Leu

1 5 10 15
 Leu Leu Ser Leu Trp
 20

<210> 128
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: CRLF2 transcript variant 1 NM_022148_3
 <400> 128
 Cys Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu Leu

1 5 10 15
 Leu Leu Ser Leu Trp
 20

<210> 129
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: CSF2RA transcript variant 7 and 8 NM_001161529_1

<400> 129
 Asn Leu Gly Ser Val Tyr Ile Tyr Val Leu Leu Ile Val Gly Thr Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Gly Ile Val Leu Gly Phe Leu Phe
 20 25

<210> 130
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF2RB NM_000395_2

<400> 130

Met Trp Val Leu Ala Leu Ile Val Ile Phe Leu Thr Ile Ala Val Leu

1 5 10 15

Leu Ala Leu

<210> 131

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF2RB NM_000395_2

<400> 131

Met Trp Val Leu Ala Leu Ile Glu Ile Phe Leu Thr Ile Ala Val Leu

1 5 10 15

Leu Ala Leu

<210> 132

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF3R transcript variant 1 NM_000760_3

<400> 132

Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Thr Cys Leu Cys

1 5 10 15

Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys

20

<210> 133

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF3R transcript variant 1 NM_000760_3

<400> 133

Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Asn Cys Leu Cys

1 5 10 15

Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys

20

<210> 134

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: EPOR transcript variant 1 NM_000121_3

<400> 134

Leu Ile Leu Thr Leu Ser Leu Ile Leu Val Val Ile Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

Thr Val Leu Ala Leu Leu Ser

20

<210> 135

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: EPOR transcript variant 1 NM_000121_3

<400> 135

Cys Cys Leu Thr Leu Ser Leu Ile Leu Val Val Ile Leu Val Leu Leu

1 5 10 15

Thr Val Leu Ala Leu Leu Ser

20

<210> 136

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FCER1G NM_004106_1

<400> 136

Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu

1 5 10 15

Thr Leu Leu Tyr Cys

20

<210> 137

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FCGR2C NM_201563_5

<400> 137

Ile Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala

1 5 10 15

Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr

20

<210> 138

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FCGR2 transcript variant 1 NM_001136219_1

<400> 138

Ile Ile Val Ala Val Val Ile Ala Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala

1 5 10 15

Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr

20

<210> 139

<211> 24

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: GHR transcript variant 1 NM_000163_4

<400> 139

Phe Pro Trp Leu Leu Ile Ile Ile Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val

1 5 10 15

Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser

20

<210> 140

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: GHR transcript variant 1 NM_000163_4

<400> 140

Phe Pro Trp Leu Leu Cys Ile Ile Phe Gly Ile Phe Gly Leu Thr Val

1 5 10 15

Met Leu Phe Val Phe Leu Phe Ser

20

<210> 141

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: ICOS NM_012092.3

<400> 141

Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu

1 5 10 15

Gly Cys Ile Leu Ile

20

<210> 142

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNAR1 NM_000629_2

<400> 142

Ile Trp Leu Ile Val Gly Ile Cys Ile Ala Leu Phe Ala Leu Pro Phe

1 5 10 15

Val Ile Tyr Ala Ala

20

<210> 143

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNAR2 transcript variant 1 NM_207585_2

<400> 143

Ile Gly Gly Ile Ile Thr Val Phe Leu Ile Ala Leu Val Leu Thr Ser
1 5 10 15

Thr Ile Val Thr Leu
20

<210> 144

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNGR1 NM_000416_2

<400> 144

Ser Leu Trp Ile Pro Val Val Ala Ala Leu Leu Leu Phe Leu Val Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Phe Ile
20

<210> 145

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNGR2 transcript variant 1 NM_001329128_1

<400> 145

Val Ile Leu Ile Ser Val Gly Thr Phe Ser Leu Leu Ser Val Leu Ala
1 5 10 15

Gly Ala Cys Phe Phe
20

<210> 146

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNLR1 NM_170743_3

<400> 146

Phe Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu Val Ile Ala Ala
1 5 10 15

Gly Gly Val Ile Trp

20

<210> 147

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1R1 transcript variant 2 NM_001288706_1

<400> 147

His Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr Val Ile Ile Val Cys Ser

1 5 10 15

Val Phe Ile Tyr Lys Ile Phe

20

<210> 148

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RAP transcript variant 1 NM_002182_3

<400> 148

Val Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Val Val Tyr His Val Tyr Trp Leu

1 5 10 15

Glu Met Val Leu Phe

20

<210> 149

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RL1 transcript variant 1 NM_016232.4

<400> 149

Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn

1 5 10 15

Val Leu Val Ile Ile

20

<210> 150

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RL2 NM_003854.2

<400> 150

Ala Tyr Leu Ile Gly Gly Leu Ile Ala Leu Val Ala Val Ala Val Ser

1 5 10 15

Val Val Tyr Ile Tyr

20

<210> 151

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL2RA transcript variant 1 NM_000417_2

<400> 151

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gly Leu

<210> 152

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL2RB transcript variant 1 NM_000878_4

<400> 152

Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly

1 5 10 15

Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile

20 25

<210> 153

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL2RG NM_000206_2

<400> 153

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys

1 5 10 15

Val Tyr Phe Trp Leu

20

<210> 154

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><223> Synthetic: IL3RA transcript variant 1 and 2 NM_002183_3

<400> 154

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

1 5 10 15

Phe Val Ile Cys

20

<210> 155

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL4R transcript variant 1 NM_000418_3

<400> 155

Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys

1 5 10 15

Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr

20

<210> 156

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL5RA transcript variant 1 NM_000564_4

<400> 156

Phe Val Ile Val Ile Met Ala Thr Ile Cys Phe Ile Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Ser Leu Ile Cys

20

<210> 157

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL6R transcript variant 1 NM_000565_3

<400> 157

Thr Phe Leu Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys

1 5 10 15

Ile Ala Ile Val Leu

20

<210> 158

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL6ST transcript variant 1 and 3 NM_002184_3

<400> 158

Ala Ile Val Val Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gly Val Leu Phe Cys Phe

20

<210> 159

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL7RA NM_002185_3

<400> 159

Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu

1 5 10 15

Val Ile Leu Ala Cys Val Leu

20

<210> 160

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL7RA Ins PPCL (interleukin 7 receptor)

<400> 160

Ile Leu Leu Pro Pro Cys Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser

1 5 10 15

Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu

20 25

<210> 161

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL9R transcript variant 1 NM_002186_2

<400> 161

Gly Asn Thr Leu Val Ala Val Ser Ile Phe Leu Leu Leu Thr Gly Pro

1 5 10 15

Thr Tyr Leu Leu Phe

20

<210> 162

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL10RA transcript variant 1 NM_001558_3

<400> 162

Val Ile Ile Phe Phe Ala Phe Val Leu Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Tyr Cys Leu Ala Leu

20

<210> 163

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL10RB NM_000628_4

<400> 163

Trp Met Val Ala Val Ile Leu Met Ala Ser Val Phe Met Val Cys Leu

1 5 10 15

Ala Leu Leu Gly Cys Phe

20

<210> 164

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL11RA NM_001142784_2

<400> 164

Ser Leu Gly Ile Leu Ser Phe Leu Gly Leu Val Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15

Leu Gly Leu Trp Leu

20

<210> 165

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL12RB1 transcript variant 1 and 4 NM_005535_2

<400> 165

Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu Leu

1 5 10 15

Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu

20 25

<210> 166

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL12RB2 transcript variant 1 and 3 NM_001559_2

<400> 166

Trp Met Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val

1 5 10 15

Gly Ile Phe Ser Thr

20

<210> 167

<211> 24

<212> PRT

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL13RA1 NM_001560_2

<400> 167

Leu Tyr Ile Thr Met Leu Leu Ile Val Pro Val Ile Val Ala Gly Ala

1 5 10 15

Ile Ile Val Leu Leu Leu Tyr Leu

20

<210> 168

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL13RA2 NM_000640_2

<400> 168

Phe Trp Leu Pro Phe Gly Phe Ile Leu Ile Leu Val Ile Phe Val Thr

1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu

20

<210> 169

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL15RA transcript variant 4 NM_001256765_1

<400> 169

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

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ala Cys Tyr Leu

20

<210> 170

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RA NM_014339_6

<400> 170

Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu Val Gly Ser Val

1 5 10 15

Ile Leu Leu Ile Val

20

<210> 171

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RB NM_018725_3

<400> 171

Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Thr Trp Val Leu Val Ala Gly

1 5 10 15

Ile Tyr Leu Met Trp

20

<210> 172

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RC transcript variant 1 NM_153460_3

<400> 172

Trp Ala Leu Val Trp Leu Ala Cys Leu Leu Phe Ala Ala Ala Leu Ser

1 5 10 15

Leu Ile Leu Leu Leu

20

<210> 173

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RD transcript variant 2 NM_017563_4

<400> 173

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

1 5 10 15

Leu Phe Thr Val Met

20

<210> 174

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RE transcript variant 1 NM_153480_1

<400> 174

Leu Gly Leu Leu Ile Leu Ala Leu Leu Ala Leu Leu Thr Leu Leu Gly

1 5 10 15

Val Val Leu Ala Leu

20

<210> 175

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL18R1 transcript variant 1 NM_003855_3

<400> 175

Gly Met Ile Ile Ala Val Leu Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val

1 5 10 15

Thr Val Cys Val Ile

20

<210> 176

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL18RAP NM_003853_3

<400> 176

Gly Val Val Leu Leu Tyr Ile Leu Leu Gly Thr Ile Gly Thr Leu Val

1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Ala

20

<210> 177

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL20RA transcript variant 1 NM_014432_3

<400> 177

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

1 5 10 15

Ser Val Met Gly Tyr

20

<210> 178

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL20RB NM_144717_3

<400> 178

Val Leu Ala Leu Phe Ala Phe Val Gly Phe Met Leu Ile Leu Val Val

1 5 10 15

Val Pro Leu Phe Val

20

<210> 179

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL21R transcript variant 2 NM_181078_2

<400> 179

Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe

1 5 10 15

Ile Pro Ala Phe Trp

20

<210> 180

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL22RA1 NM_021258_3

<400> 180

Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly Phe Leu Val Ala

1 5 10 15

Val Leu Cys Tyr Leu

20

<210> 181

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL23R NM_144701_2

<400> 181

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

1 5 10 15

Leu Ile Gly Ile Phe

20

<210> 182

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL27RA NM_004843_3

<400> 182

Val Leu Pro Gly Ile Leu Phe Leu Trp Gly Leu Phe Leu Leu Gly Cys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Ala

20

<210> 183

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL27RA NM_004843_3

<400> 183

Val Leu Pro Gly Ile Leu Cys Leu Trp Gly Leu Phe Leu Leu Gly Cys

1 5 10 15

Gly Leu Ser Leu Ala

20

<210> 184

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL31RA transcript variant 1 NM_139017_5

<400> 184

Ile Ile Leu Ile Thr Ser Leu Ile Gly Gly Gly Leu Leu Ile Leu Ile

1 5 10 15

Ile Leu Thr Val Ala Tyr Gly Leu

20

<210> 185

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LEPR transcript variant 1 NM_002303_5

<400> 185

Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu

1 5 10 15

Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile

20

<210> 186

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LIFR NM_001127671_1

<400> 186

Val Gly Leu Ile Ile Ala Ile Leu Ile Pro Val Ala Val Ala Val Ile

1 5 10 15

Val Gly Val Val Thr Ser Ile Leu Cys

20 25

<210> 187

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MPL NM_005373_2

<400> 187

Ile Ser Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu Leu Leu

20

<210> 188

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MPL NM_005373_2

<400> 188

Ile Ser Leu Val Thr Ala Leu His Leu Val Leu Gly Leu Asn Ala Val

1 5 10 15

Leu Gly Leu Leu Leu Leu

20

<210> 189

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: OSMR transcript variant 4 NM_001323505_1

<400> 189

Leu Ile His Ile Leu Leu Pro Met Val Phe Cys Val Leu Leu Ile Met

1 5 10 15

Val Met Cys Tyr Leu

20

<210> 190

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PRLR transcript variant 1 NM_000949_6

<400> 190

Thr Thr Val Trp Ile Ser Val Ala Val Leu Ser Ala Val Ile Cys Leu

1 5 10 15

Ile Ile Val Trp Ala Val Ala Leu

20

<210> 191

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF4 NM_003327_3

<400> 191

Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro

1 5 10 15

Leu Ala Ile Leu Leu

20

<210> 192

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF8 transcript variant 1 NM_001243_4

<400> 192

Pro Val Leu Asp Ala Gly Pro Val Leu Phe Trp Val Ile Leu Val Leu

1 5 10 15

Val Val Val Val Gly Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys

20 25

<210> 193

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF9 NM_001561_5

<400> 193

Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu

1 5 10 15

Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val

20 25

<210> 194

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF14 transcript variant 1 NM_003820_3

<400> 194

Trp Trp Phe Leu Ser Gly Ser Leu Val Ile Val Ile Val Cys Ser Thr

1 5 10 15

Val Gly Leu Ile Ile

20

<210> 195

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF18 transcript variant 1 NM_004195_2

<400> 195

Leu Gly Trp Leu Thr Val Val Leu Leu Ala Val Ala Ala Cys Val Leu

1 5 10 15

Leu Leu Thr Ser Ala

20

<210> 196

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD2 transcript variant 1 NM_001328609_1

<400> 196

Thr Lys Arg Lys Lys Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu Leu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Ile Pro Ala Ser Thr Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln His Pro

35 40 45

Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg Pro Pro

50 55 60

Pro Pro Gly His Arg Val Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro Pro Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Arg Val Gln Pro Lys Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn Ser Leu

100 105 110

Ser Pro Ser Ser Asn

115

<210> 197

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3D transcript variant 1 NM_000732_4

<400> 197

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

1 5 10 15

Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala

20 25 30

Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys

35 40 45

<210> 198

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3E NM_000733_3

<400> 198

Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

50 55

<210> 199

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD3G NM_000073_2

<400> 199

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly Asn Gln Leu Arg Arg Asn

35 40 45

<210> 200

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD4 transcript variant 1 and 2 NM_000616_4

<400> 200

Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser Gln

1 5 10 15

Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro His Arg

20 25 30

Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile

35 40

<210> 201

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8A transcript variant 1 NM_001768_6

<400> 201

Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg

1 5 10 15

Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val

20 25 30

<210> 202

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8B transcript variant 2 NM_172213_3

<400> 202

Arg Arg Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Pro Gln Gly Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Thr Thr Thr Ser Gln Lys Leu Leu Asn Pro Trp Ile Leu Lys Thr

35 40 45

<210> 203

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8B transcript variant 3 NM_172101_3

<400> 203

Arg Arg Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Leu Arg Leu His

1 5 10 15

Pro Leu Glu Lys Cys Ser Arg Met Asp Tyr

20 25

<210> 204

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD8B transcript variant 5 NM_004931_4

<400> 204

Arg Arg Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Phe Tyr Lys

1 5 10 15

<210> 205

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD27 NM_001242_4

<400> 205

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

1 5 10 15

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr

20 25 30

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

35 40 45

<210> 206

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: mutated Delta Lck CD28 transcript variant 1

NM_006139_3

<400> 206

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala
20 25 30

Ala Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 207

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD28 transcript variant 1 NM_006139_3

<400> 207

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 208

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD40 transcript variant 1 and 6 NM_001250_5

<400> 208

Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro His Pro Lys Gln

1 5 10 15

Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg Gln

50 55 60

<210> 209

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD40 transcript variant 5 NM_001322421_1

<400> 209

Ser Glu Ser Ser Glu Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro
 1 5 10 15
 His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro
 20 25 30

Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln
 35 40 45
 Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu
 50 55 60
 Arg Gln
 65

<210> 210

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD79A transcript variant 1 NM_001783_3

<400> 210

Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu
 1 5 10 15

Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser
 20 25 30
 Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val
 35 40 45
 Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys Pro
 50 55 60

<210> 211

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CD79B transcript variant 3 NM_001039933_2

<400

> 211

Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr

1 5 10 15

Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr

20 25 30

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

35 40 45

Glu

<210> 212

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CRLF2 transcript variant 1 NM_022148_3

<400> 212

Lys Leu Trp Arg Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro

1 5 10 15

Lys Ser Ile Phe Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln

20 25 30

Glu Trp Ile Thr Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala

35 40 45

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

50 55 60

Ala Lys Thr Glu Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu

65 70 75 80

Glu Lys Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu

85 90 95

Gln Gly Gly Asp Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn

100 105 110

Asp Arg Ser Tyr Val Ala Leu

115

<210> 213

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF2RB NM_000395_2

<400> 213

Arg Phe Cys Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Leu Arg Arg Lys Trp Glu Glu

1 5 10 15

Lys Ile Pro Asn Pro Ser Lys Ser His Leu Phe Gln Asn Gly Ser Ala

20 25 30

Glu Leu Trp Pro Pro Gly Ser Met Ser Ala Phe Thr Ser Gly Ser Pro

35 40 45

Pro His Gln Gly Pro Trp Gly Ser Arg Phe Pro Glu Leu Glu Gly Val

50 55 60

Phe Pro Val Gly Phe Gly Asp Ser Glu Val Ser Pro Leu Thr Ile Glu

65 70 75 80

Asp Pro Lys His Val Cys Asp Pro Pro Ser Gly Pro Asp Thr Thr Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Phe Asn Gly Pro Tyr Leu Gly Pro Pro His Ser Arg Ser Leu Pro Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Gln Leu Val Pro Leu Ala Gln Ala Met Gly Pro Gly Gln Ala Val

180 185 190

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

195 200 205

Glu Ser Gly Gly Gly Pro Ala Pro Pro Ala Leu Gly Pro Arg Val Gly
 210 215 220
 Gly Gln Asp Gln Lys Asp Ser Pro Val Ala Ile Pro Met Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Asp Thr Glu Asp Pro Gly Val Ala Ser Gly Tyr Val Ser Ser Ala Asp
 245 250 255
 Leu Val Phe Thr Pro Asn Ser Gly Ala Ser Ser Val Ser Leu Val Pro
 260 265 270
 Ser Leu Gly Leu Pro Ser Asp Gln Thr Pro Ser Leu Cys Pro Gly Leu
 275 280 285
 Ala Ser Gly Pro Pro Gly Ala Pro Gly Pro Val Lys Ser Gly Phe Glu
 290 295 300
 Gly Tyr Val Glu Leu Pro Pro Ile Glu Gly Arg Ser Pro Arg Ser Pro
 305 310 315 320
 Arg Asn Asn Pro Val Pro Pro Glu Ala Lys Ser Pro Val Leu Asn Pro
 325 330 335
 Gly Glu Arg Pro Ala Asp Val Ser Pro Thr Ser Pro Gln Pro Glu Gly
 340 345 350
 Leu Leu Val Leu Gln Gln Val Gly Asp Tyr Cys Phe Leu Pro Gly Leu
 355 360 365
 Gly Pro Gly Pro Leu Ser Leu Arg Ser Lys Pro Ser Ser Pro Gly Pro
 370 375 380
 Gly Pro Glu Ile Lys Asn Leu Asp Gln Ala Phe Gln Val Lys Lys Pro
 385 390 395 400
 Pro Gly Gln Ala Val Pro Gln Val Pro Val Ile Gln Leu Phe Lys Ala
 405 410 415
 Leu Lys Gln Gln Asp Tyr Leu Ser Leu Pro Pro Trp Glu Val Asn Lys
 420 425 430
 Pro Gly Glu Val Cys
 435
 <210
 > 214

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF2RA transcript variant 7 and 8 NM_001161529_1

<400> 214

Lys Arg Phe Leu Arg Ile Gln Arg Leu Phe Pro Pro Val Pro Gln Ile

1 5 10 15

Lys Asp Lys Leu Asn Asp Asn His Glu Val Glu Asp Glu Ile Ile Trp

20 25 30

Glu Glu Phe Thr Pro Glu Glu Gly Lys Gly Tyr Arg Glu Glu Val Leu

35 40 45

Thr Val Lys Glu Ile Thr

50

<210> 215

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF2RA transcript variant 9 NM_001161531_1

<400> 215

Lys Arg Phe Leu Arg Ile Gln Arg Leu Phe Pro Pro Val Pro Gln Ile

1 5 10 15

Lys Asp Lys Leu Asn Asp Asn His Glu Val Glu Asp Glu Met Gly Pro

20 25 30

Gln Arg His His Arg Cys Gly Trp Asn Leu Tyr Pro Thr Pro Gly Pro

35 40 45

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Pro Arg Leu Gly Ser Glu Ser Ser Leu

50 55 60

<210> 216

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF3R transcript variant 1 NM_000760_3

<400> 216

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
1 5 10 15
His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
20 25 30
Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val
35 40 45
Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser
50 55 60
Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln
65 70 75 80
Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gly Thr
85 90 95
Ser Asp Gln Val Leu Tyr Gly Gln Leu Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro
100 105 110
Gly Pro Gly His Tyr Leu Arg Cys Asp Ser Thr Gln Pro Leu Leu Ala
115 120 125
Gly Leu Thr Pro Ser Pro Lys Ser Tyr Glu Asn Leu Trp Phe Gln Ala
130 135 140
Ser Pro Leu Gly Thr Leu Val Thr Pro Ala Pro Ser Gln Glu Asp Asp
145 150 155 160
Cys Val Phe Gly Pro Leu Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg
165 170 175
Val His Gly Met Glu Ala Leu Gly Ser Phe
180 185
<210> 217
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: CSF3R transcript variant 3 NM_156039_3
<400> 217
Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

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

 Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr Cys Gly
 85 90 95
 Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln Gly Asp Pro Arg Ala
 100 105 110
 Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gly Thr Ser Asp Gln Val Leu
 115 120 125
 Tyr Gly Gln Leu Leu Gly Ser Pro Thr Ser Pro Gly Pro Gly His Tyr
 130 135 140

 Leu Arg Cys Asp Ser Thr Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr Pro Ser
 145 150 155 160
 Pro Lys Ser Tyr Glu Asn Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu Gly Thr
 165 170 175
 Leu Val Thr Pro Ala Pro Ser Gln Glu Asp Asp Cys Val Phe Gly Pro
 180 185 190
 Leu Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly Met Glu
 195 200 205

 Ala Leu Gly Ser Phe
 210
 <210> 218
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: CSF3R transcript variant 4 NM_172313_2

<400> 218

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

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

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln Ser Gly Thr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Met Leu His Pro Ala Pro Pro Asn Gly Leu Leu Cys Leu Phe Pro

115 120 125

Ile Thr Ser Val Leu

130

<210> 219

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: EPOR transcript variant 1 NM_000121_3

<400> 219

His Arg Arg Ala Leu Lys Gln Lys Ile Trp Pro Gly Ile Pro Ser Pro

1 5 10 15

Glu Ser Glu Phe Glu Gly Leu Phe Thr Thr His Lys Gly Asn Phe Gln

20 25 30

Leu Trp Leu Tyr Gln Asn Asp Gly Cys Leu Trp Trp Ser Pro Cys Thr

35 40 45

Pro Phe Thr Glu Asp Pro Pro Ala Ser Leu Glu Val Leu Ser Glu Arg
50 55 60

Cys Trp Gly Thr Met Gln Ala Val Glu Pro Gly Thr Asp Asp Glu Gly
65 70 75 80

Pro Leu Leu Glu Pro Val Gly Ser Glu His Ala Gln Asp Thr Tyr Leu
85 90 95

Val Leu Asp Lys Trp Leu Leu Pro Arg Asn Pro Pro Ser Glu Asp Leu
100 105 110

Pro Gly Pro Gly Gly Ser Val Asp Ile Val Ala Met Asp Glu Gly Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Cys Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Pro Ser Pro Glu
130 135 140

Gly Ala Ser Ala Ala Ser Phe Glu Tyr Thr Ile Leu Asp Pro Ser Ser
145 150 155 160

Gln Leu Leu Arg Pro Trp Thr Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Thr Pro
165 170 175

Pro His Leu Lys Tyr Leu Tyr Leu Val Val Ser Asp Ser Gly Ile Ser
180 185 190

Thr Asp Tyr Ser Ser Gly Asp Ser Gln Gly Ala Gln Gly Gly Leu Ser
195 200 205

Asp Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Glu Asn Ser Leu Ile Pro Ala Ala
210 215 220

Glu Pro Leu Pro Pro Ser Tyr Val Ala Cys Ser
225 230 235

<210> 220
<211> 235
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: EPOR transcript variant 1 NM_000121_3
<400> 220

His Arg Arg Ala Leu Lys Gln Lys Ile Trp Pro Gly Ile Pro Ser Pro
1 5 10 15

Glu Ser Glu Phe Glu Gly Leu Phe Thr Thr His Lys Gly Asn Phe Gln

20 25 30

Leu Trp Leu Tyr Gln Asn Asp Gly Cys Leu Trp Trp Ser Pro Cys Thr

35 40 45

Pro Phe Thr Glu Asp Pro Pro Ala Ser Leu Glu Val Leu Ser Glu Arg

50 55 60

Cys Trp Gly Thr Met Gln Ala Val Glu Pro Gly Thr Asp Asp Glu Gly

65 70 75 80

Pro Leu Leu Glu Pro Val Gly Ser Glu His Ala Gln Asp Thr Tyr Leu

85 90 95

Val Leu Asp Lys Trp Leu Leu Pro Arg Asn Pro Pro Ser Glu Asp Leu

100 105 110

Pro Gly Pro Gly Gly Ser Val Asp Ile Val Ala Met Asp Glu Gly Ser

115 120 125

Glu Ala Ser Ser Cys Ser Ser Ala Leu Ala Ser Lys Pro Ser Pro Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Leu Leu Arg Pro Trp Thr Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Thr Pro

165 170 175

Pro His Leu Lys Phe Leu Phe Leu Val Val Ser Asp Ser Gly Ile Ser

180 185 190

Thr Asp Tyr Ser Ser Gly Asp Ser Gln Gly Ala Gln Gly Gly Leu Ser

195 200 205

Asp Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Glu Asn Ser Leu Ile Pro Ala Ala

210 215 220

Glu Pro Leu Pro Pro Ser Tyr Val Ala Cys Ser

225 230 235

<210> 221

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FCER1G NM_004106_1

<400> 221

Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln

35 40

<210> 222

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FCGR2C NM_201563_5

<400> 222

Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala

1 5 10 15

Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg

20 25 30

Gln Pro Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr

35 40 45

Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr

50 55 60

Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn

65 70 75

<210> 223

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: FCGR2 transcript variant 1 NM_001136219_1

<400> 223

Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala

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

65 70 75
<210> 224
<211> 350
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: GHR transcript variant 1 NM_000163_4
<400> 224

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

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

 100 105 110
Ala Asn Asp Ile His Glu Gly Thr Ser Glu Val Ala Gln Pro Gln Arg
 115 120 125
Leu Lys Gly Glu Ala Asp Leu Leu Cys Leu Asp Gln Lys Asn Gln Asn

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

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

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

 290 295 300
 Pro Asp Tyr Thr Ser Ile His Ile Val Gln Ser Pro Gln Gly Leu Ile
 305 310 315 320
 Leu Asn Ala Thr Ala Leu Pro Leu Pro Asp Lys Glu Phe Leu Ser Ser
 325 330 335
 Cys Gly Tyr Val Ser Thr Asp Gln Leu Asn Lys Ile Met Pro
 340 345 350
 <210> 225
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: ICOS NM_012092.3

<400> 225

Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Thr Asp Val Thr Leu

35

<210> 226

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNAR1 NM_000629_2

<400> 226

Lys Val Phe Leu Arg Cys Ile Asn Tyr Val Phe Phe Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Pro Ser Ser Ser Ile Asp Glu Tyr Phe Ser Glu Gln Pro Leu Lys Asn

20 25 30

Leu Leu Leu Ser Thr Ser Glu Glu Gln Ile Glu Lys Cys Phe Ile Ile

35 40 45

Glu Asn Ile Ser Thr Ile Ala Thr Val Glu Glu Thr Asn Gln Thr Asp

50 55 60

Glu Asp His Lys Lys Tyr Ser Ser Gln Thr Ser Gln Asp Ser Gly Asn

65 70 75 80

Tyr Ser Asn Glu Asp Glu Ser Glu Ser Lys Thr Ser Glu Glu Leu Gln

85 90 95

Gln Asp Phe Val

100

<210> 227

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNAR2 transcript variant 1 NM_207585_2

<400> 227

Lys Trp Ile Gly Tyr Ile Cys Leu Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu
1 5 10 15

Asn Phe His Asn Phe Leu Ala Trp Pro Phe Pro Asn Leu Pro Pro Leu
20 25 30

Glu Ala Met Asp Met Val Glu Val Ile Tyr Ile Asn Arg Lys Lys Lys
35 40 45

Val Trp Asp Tyr Asn Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Ser Asp Thr Glu Ala
50 55 60

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

Arg Pro Leu Gly Gln Ala Ser Ala Thr Ser Thr Glu Ser Gln Leu Ile
85 90 95

Asp Pro Glu Ser Glu Glu Glu Pro Asp Leu Pro Glu Val Asp Val Glu
100 105 110

Leu Pro Thr Met Pro Lys Asp Ser Pro Gln Gln Leu Glu Leu Leu Ser
115 120 125

Gly Pro Cys Glu Arg Arg Lys Ser Pro Leu Gln Asp Pro Phe Pro Glu
130 135 140

Glu Asp Tyr Ser Ser Thr Glu Gly Ser Gly Gly Arg Ile Thr Phe Asn
145 150 155 160

Val Asp Leu Asn Ser Val Phe Leu Arg Val Leu Asp Asp Glu Asp Ser
165 170 175

Asp Asp Leu Glu Ala Pro Leu Met Leu Ser Ser His Leu Glu Glu Met
180 185 190

Val Asp Pro Glu Asp Pro Asp Asn Val Gln Ser Asn His Leu Leu Ala
195 200 205

Ser Gly Glu Gly Thr Gln Pro Thr Phe Pro Ser Pro Ser Ser Glu Gly
210 215 220

Leu Trp Ser Glu Asp Ala Pro Ser Asp Gln Ser Asp Thr Ser Glu Ser
225 230 235 240

Asp Val Asp Leu Gly Asp Gly Tyr Ile Met Arg

245

250

<210> 228

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNAR2 transcript variant 2 NM_000874_4

<400> 228

Lys Trp Ile Gly Tyr Ile Cys Leu Arg Asn Ser Leu Pro Lys Val Leu

1

5

10

15

Arg Gln Gly Leu Ala Lys Gly Trp Asn Ala Val Ala Ile His Arg Cys

20

25

30

Ser His Asn Ala Leu Gln Ser Glu Thr Pro Glu Leu Lys Gln Ser Ser

35

40

45

Cys Leu Ser Phe Pro Ser Ser Trp Asp Tyr Lys Arg Ala Ser Leu Cys

50

55

60

Pro Ser Asp

65

<210> 229

<211>

223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNGR1 NM_000416_2

<400> 229

Cys Phe Tyr Ile Lys Lys Ile Asn Pro Leu Lys Glu Lys Ser Ile Ile

1

5

10

15

Leu Pro Lys Ser Leu Ile Ser Val Val Arg Ser Ala Thr Leu Glu Thr

20

25

30

Lys Pro Glu Ser Lys Tyr Val Ser Leu Ile Thr Ser Tyr Gln Pro Phe

35

40

45

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

50

55

60

Val Pro Gly Met His Thr Glu Asp Asn Pro Gly Lys Val Glu His Thr
65 70 75 80
Glu Glu Leu Ser Ser Ile Thr Glu Val Val Thr Thr Glu Glu Asn Ile
85 90 95
Pro Asp Val Val Pro Gly Ser His Leu Thr Pro Ile Glu Arg Glu Ser
100 105 110
Ser Ser Pro Leu Ser Ser Asn Gln Ser Glu Pro Gly Ser Ile Ala Leu

115 120 125
Asn Ser Tyr His Ser Arg Asn Cys Ser Glu Ser Asp His Ser Arg Asn
130 135 140
Gly Phe Asp Thr Asp Ser Ser Cys Leu Glu Ser His Ser Ser Leu Ser
145 150 155 160
Asp Ser Glu Phe Pro Pro Asn Asn Lys Gly Glu Ile Lys Thr Glu Gly
165 170 175
Gln Glu Leu Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Thr Ser Phe Gly Tyr Asp

180 185 190
Lys Pro His Val Leu Val Asp Leu Leu Val Asp Asp Ser Gly Lys Glu
195 200 205
Ser Leu Ile Gly Tyr Arg Pro Thr Glu Asp Ser Lys Glu Phe Ser
210 215 220

<210> 230

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNGR2 transcript variant 1 NM_001329128_1

<400> 230

Leu Val Leu Lys Tyr Arg Gly Leu Ile Lys Tyr Trp Phe His Thr Pro

1 5 10 15
Pro Ser Ile Pro Leu Gln Ile Glu Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Thr Gln
20 25 30
Pro Ile Leu Glu Ala Leu Asp Lys Asp Ser Ser Pro Lys Asp Asp Val
35 40 45

Trp Asp Ser Val Ser Ile Ile Ser Phe Pro Glu Lys Glu Gln Glu Asp
50 55 60

Val Leu Gln Thr Leu
65

<210

> 231

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IFNLR1 NM_170743_3

<400> 231

Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg
1 5 10 15

Ala Leu Asp Phe Ser Gly His Thr His Pro Val Ala Thr Phe Gln Pro
20 25 30

Ser Arg Pro Glu Ser Val Asn Asp Leu Phe Leu Cys Pro Gln Lys Glu
35 40 45

Leu Thr Arg Gly Val Arg Pro Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr
50 55 60

Gln Gln Thr Arg Trp Lys Lys Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Glu
65 70 75 80

Asp Glu Glu Asp Thr Glu Asp Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu
85 90 95

Pro Pro Ser Phe Leu Gly Gln Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu
100 105 110

Ala Gly Gly Val Asp Ser Gly Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser
115 120 125

Glu Gly Ser Ser Ala Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr
130 135 140

Val Asp Ser Ser Trp Asp Arg Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu
145 150 155 160

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

165										170										175																			
Pro	Pro	Pro	Glu	Phe	Ser	Lys	Asp	Ser	Gly	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro																								
180										185										190																			
Glu	Asp	Asn	Leu	Ser	Ser	Trp	Ala	Thr	Trp	Gly	Thr	Leu	Pro	Pro	Glu																								
195										200										205																			
Pro	Asn	Leu	Val	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Thr																								
210										215										220																			
Phe	Cys	Trp	Glu	Ser	Ser	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Ser																								
225										230										235										240									
Glu	Ile	Glu	Asp	Ser	Asp	Ala	Gly	Ser	Trp	Gly	Ala	Glu	Ser	Thr	Gln																								
245										250										255																			
Arg	Thr	Glu	Asp	Arg	Gly	Arg	Thr	Leu	Gly	His	Tyr	Met	Ala	Arg																									
260										265										270																			
<210> 232																																							
<211> 242																																							
<212> PRT																																							
<213> Artificial Sequence																																							
<220><223> Synthetic: IFNLR1 transcript variant 2 NM_173064.2																																							
<400> 232																																							
Lys	Thr	Leu	Met	Gly	Asn	Pro	Trp	Phe	Gln	Arg	Ala	Lys	Met	Pro	Arg																								
1				5				10				15																											
Ala	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Gly	Val	Arg	Pro	Thr	Pro	Arg	Val	Arg	Ala																								
20										25										30																			
Pro	Ala	Thr	Gln	Gln	Thr	Arg	Trp	Lys	Lys	Asp	Leu	Ala	Glu	Asp	Glu																								
35										40										45																			
Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Asp	Thr	Glu	Asp	Gly	Val	Ser	Phe	Gln	Pro																								
50										55										60																			
Tyr	Ile	Glu	Pro	Pro	Ser	Phe	Leu	Gly	Gln	Glu	His	Gln	Ala	Pro	Gly																								
65					70					75					80																								
His	Ser	Glu	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Pro	Leu																								
85										90										95																			

Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser Ala Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Trp
100 105 110
Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser Trp Asp Arg Ala Gly Ser Ser Gly Tyr
115 120 125
Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly Gln Gly Pro Gly Gly Asp Gly His Gln
130 135 140

Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu Phe Ser Lys Asp Ser Gly Phe Leu Glu
145 150 155 160
Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu Ser Ser Trp Ala Thr Trp Gly Thr Leu
165 170 175
Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val Pro Gly Gly Pro Pro Val Ser Leu Gln
180 185 190
Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu Ser Ser Pro Glu Glu Glu Glu Glu Ala
195 200 205

Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp Ser Asp Ala Gly Ser Trp Gly Ala Glu
210 215 220
Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp Arg Gly Arg Thr Leu Gly His Tyr Met
225 230 235 240
Ala Arg

<210> 233

<211> 179

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1R1 transcript variant 2 NM_001288706_1

<400> 233

Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp Ser Cys Tyr Asp Phe Leu
1 5 10 15

Pro Ile Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Lys Gln Cys Gly Tyr Lys
20 25 30
Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val Gly Glu Asp Ile Val Glu
35 40 45

Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Ile Leu
50 55 60

Val Arg Glu Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu Gly Gly Ser Ser Glu Glu
65 70 75 80

Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln Asp Gly Ile Lys Val Val
85 90 95

Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr Glu Lys Met Pro Glu Ser
100 105 110

Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly Asp
115 120 125

Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr Arg Phe Trp Lys Asn Val
130 135 140

Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser Pro Ser Ser Lys His Gln
145 150 155 160

Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Arg Glu Ala His Val
165 170 175

Pro Leu Gly

<210> 234

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1R1 transcript variant 3 NM_001320978.1

<400> 234

Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Asp Ser Cys Tyr Asp Phe Leu
1 5 10 15

Pro Ile Lys Ala Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Tyr Ile Leu Tyr
20 25 30

Pro Lys Thr Val Gly Glu Gly Ser Thr Ser Asp Cys Asp Ile Phe Val
35 40 45

Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Lys Gln Cys Gly Tyr Lys Leu
50 55 60

Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val Gly Glu Asp Ile Val Glu Val
65 70 75 80

Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Ile Leu Val
85 90 95

Arg Glu Thr Ser Gly Phe Ser Trp Leu Gly Gly Ser Ser Glu Glu Gln
100 105 110

Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln Asp Gly Ile Lys Val Val Leu
115 120 125

Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr Glu Lys Met Pro Glu Ser Ile
130 135 140

Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile Arg Trp Ser Gly Asp Phe
145 150 155 160

Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr Arg Phe Trp Lys Asn Val Arg
165 170 175

Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser Pro Ser Ser Lys His Gln Leu
180 185 190

Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Arg Glu Ala His Val Pro
195 200 205

Leu Gly

210

<210> 235

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RAP transcript variant 1 NM_002182_3

<400> 235

Tyr Arg Ala His Phe Gly Thr Asp Glu Thr Ile Leu Asp Gly Lys Glu
1 5 10 15

Tyr Asp Ile Tyr Val Ser Tyr Ala Arg Asn Ala Glu Glu Glu Glu Phe
20 25 30

Val Leu Leu Thr Leu Arg Gly Val Leu Glu Asn Glu Phe Gly Tyr Lys

35 40 45
 Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly Ile Val Thr Asp
 50 55 60
 Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu Leu Val Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile Asn Val Ile Leu
 100 105 110

Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys Glu Leu Lys Arg
 115 120 125
 Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly Glu Lys Ser Lys
 130 135 140
 Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val Ala Met Pro Val
 145 150 155 160
 Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln Gly Leu Ser Tyr
 165 170 175

Ser Ser Leu Lys Asn Val
 180

<210> 236

<211> 299

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RAP transcript variant 6 NM_001167931_1

<400> 236

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

35 40 45

Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly Asn Thr Val Glu
 50 55 60
 Ala Val Phe Asp Phe Ile Gln Arg Ser Arg Arg Met Ile Val Val Leu
 65 70 75 80
 Ser Pro Asp Tyr Val Thr Glu Lys Ser Ile Ser Met Leu Glu Phe Lys
 85 90 95
 Leu Gly Val Met Cys Gln Asn Ser Ile Ala Thr Lys Leu Ile Val Val
 100 105 110
 Glu Tyr Arg Pro Leu Glu His Pro His Pro Gly Ile Leu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Glu Ser Val Ser Phe Val Ser Trp Lys Gly Glu Lys Ser Lys His Ser
 130 135 140
 Gly Ser Lys Phe Trp Lys Ala Leu Arg Leu Ala Leu Pro Leu Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Ser Ala Ser Ser Gly Trp Asn Glu Ser Cys Ser Ser Gln Ser Asp
 165 170 175
 Ile Ser Leu Asp His Val Gln Arg Arg Arg Ser Arg Leu Lys Glu Pro
 180 185 190
 Pro Glu Leu Gln Ser Ser Glu Arg Ala Ala Gly Ser Pro Pro Ala Pro
 195 200 205
 Gly Thr Met Ser Lys His Arg Gly Lys Ser Ser Ala Thr Cys Arg Cys
 210 215 220
 Cys Val Thr Tyr Cys Glu Gly Glu Asn His Leu Arg Asn Lys Ser Arg
 225 230 235 240
 Ala Glu Ile His Asn Gln Pro Gln Trp Glu Thr His Leu Cys Lys Pro
 245 250 255
 Val Pro Gln Glu Ser Glu Thr Gln Trp Ile Gln Asn Gly Thr Arg Leu
 260 265 270
 Glu Pro Pro Ala Pro Gln Ile Ser Ala Leu Ala Leu His His Phe Thr
 275 280 285
 Asp Leu Ser Asn Asn Asn Asp Phe Tyr Ile Leu

290

295

<210> 237

<211> 207

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RL1 transcript variant 1 NM_016232.4

<400> 237

Leu Lys Met Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala

1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val

20 25 30

Val Tyr Pro Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val

35 40 45

Glu His Phe Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys

50 55 60

Gly Tyr Thr Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp

65 70 75 80

Val Val Thr Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile

85 90 95

Phe Ile Leu Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu

100 105 110

Gln Glu Val Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Lys Trp Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser

165 170 175

Lys Phe Trp Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile

180 185 190

Pro Arg Lys Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln

195 200 205

<210> 238

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL1RL2 NM_003854.2

<400> 238

Asn Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg Ser Ala Phe His

1 5 10 15

Ser Thr Glu Thr Ile Val Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Leu

20 25 30

Tyr Pro Lys Pro His Lys Glu Ser Gln Arg His Ala Val Asp Ala Leu

35 40 45

Val Leu Asn Ile Leu Pro Glu Val Leu Glu Arg Gln Cys Gly Tyr Lys

50 55 60

Leu Phe Ile Phe Gly Arg Asp Glu Phe Pro Gly Gln Ala Val Ala Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Pro Glu Ser Leu Gly Phe Gly Leu Leu Lys Asn Leu Ser Glu Glu

100 105 110

Gln Ile Ala Val Tyr Ser Ala Leu Ile Gln Asp Gly Met Lys Val Ile

115 120 125

Leu Ile Glu Leu Glu Lys Ile Glu Asp Tyr Thr Val Met Pro Glu Ser

130 135 140

Ile Gln Tyr Ile Lys Gln Lys His Gly Ala Ile Arg Trp His Gly Asp

145 150 155 160

Phe Thr Glu Gln Ser Gln Cys Met Lys Thr Lys Phe Trp Lys Thr Val

165 170 175

Arg Tyr His Met Pro Pro Arg Arg Cys Arg Pro Phe Pro Pro Val Gln

180 185 190

Leu Leu Gln His Thr Pro Cys Tyr Arg Thr Ala Gly Pro Glu Leu Gly
195 200 205

Ser Arg Arg Lys Lys Cys Thr Leu Thr Thr Gly
210 215

<210> 239

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL2RA transcript variant 1 NM_000417_2

<400> 239

Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile

1 5 10

<210> 240

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL2RB transcript variant 1 NM_000878_4

<400> 240

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe

35 40 45

Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu

50 55 60

Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu

65 70 75 80

Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn

85 90 95

Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala

100 105 110

Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro

165 170 175

Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro

180 185 190

Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly

195 200 205

Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro

210 215 220

Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro

225 230 235 240

Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu

245 250 255

Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu

260 265 270

Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

275 280 285

<210> 241

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL2RG NM_000206_2

<400> 241

Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15

Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly

50 55 60

Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr

65 70 75 80

Thr Leu Lys Pro Glu Thr

85

<210> 242

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL3RA transcript variant 1 and 2 NM_002183_3

<400> 242

Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro Arg Ile Pro His Met

1 5 10 15

Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp Lys Leu Val Val Trp

20 25 30

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

35 40 45

Val Val Gln Lys Thr

50

<210> 243

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL4R transcript variant 1 NM_000418_3

<400> 243

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser

1 5 10 15

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu

20 25 30
 Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn
 35 40 45

 Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg
 50 55 60
 Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser
 65 70 75 80
 Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp
 85 90 95
 Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro
 100 105 110

 Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe
 115 120 125
 Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu
 130 135 140
 Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly
 145 150 155 160
 Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu
 165 170 175

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

 Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu
 245 250 255
 Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro
 260 265 270

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln
 275 280 285
 Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
 290 295 300

 His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
 305 310 315 320
 Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
 325 330 335
 Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
 340 345 350
 Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
 355 360 365

 Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
 370 375 380
 Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
 385 390 395 400
 Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
 405 410 415
 Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
 420 425 430

 Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
 435 440 445
 Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
 450 455 460
 Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
 465 470 475 480
 Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
 485 490 495

 Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
 500 505 510
 Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly

515 520 525
 Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly
 530 535 540
 Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser
 545 550 555 560

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser
 565

<210> 244

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL4R transcript variant 1 NM_000418_3

<400> 244

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
 1 5 10 15
 Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu
 20 25 30
 Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn

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

100 105 110
 Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe
 115 120 125
 Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu
 130 135 140
 Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly

145 150 155 160
 Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu

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

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

 290 295 300
 His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
 305 310 315 320
 Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
 325 330 335
 Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
 340 345 350
 Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala

 355 360 365
 Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
 370 375 380
 Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
 385 390 395 400

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu

450 455 460

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr

465 470 475 480

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly

530 535 540

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser

545 550 555 560

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser

565

<210> 245

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL5RA transcript variant 1 NM_000564_4

<400> 245

Lys Ile Cys His Leu Trp Ile Lys Leu Phe Pro Pro Ile Pro Ala Pro

1 5 10 15

Lys Ser Asn Ile Lys Asp Leu Phe Val Thr Thr Asn Tyr Glu Lys Ala

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Glu Thr Leu Glu Asp Ser Val Phe

50 55

<210> 246

<211> 82

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL6R transcript variant 1 NM_000565_3

<400> 246

Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly Lys Thr

1 5 10 15

Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu Arg Pro

20 25 30

Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val Ser Pro

35 40 45

Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro Asp Ala

50 55 60

Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr Phe Phe

65 70 75 80

Pro Arg

<210> 247

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL6ST transcript variant 1 and 3 NM_002184_3

<400> 247

Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro Asp

1 5 10 15

Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro Arg

20 25 30
 His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe Thr
 35 40 45

 Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe Pro
 50 55 60
 Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn Thr
 65 70 75 80
 Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser Ser
 85 90 95
 Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn Thr
 100 105 110

 Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg His
 115 120 125
 Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln Pro
 130 135 140
 Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp His
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys Gln
 165 170 175

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

 Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala Thr
 245 250 255
 Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln Gly
 260 265 270

Gly Tyr Met Pro Gln

275

<210> 248

<211> 196

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL7RA Isoform 1 NM_002185.4

<400> 248

Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His

1 5 10 15

Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn

20 25 30

Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val

35 40 45

Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu

85 90 95

Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser

100 105 110

Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg

115 120 125

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

130 135 140

Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr

165 170 175

Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe

180 185 190

Tyr Gln Asn Gln

195

<210> 249

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL7RA Isoform 3 (C-term deletion) (interleukin 7

receptor)

<400> 249

Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His

1 5 10 15

Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Val Ser Val

20 25 30

Phe Gly Ala

35

<210> 250

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL9R transcript variant 1 NM_002186_2

<400> 250

Lys Leu Ser Pro Arg Val Lys Arg Ile Phe Tyr Gln Asn Val Pro Ser

1 5 10 15

Pro Ala Met Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Ser Val His Asn Gly Asn Phe

20 25 30

Gln Thr Trp Met Gly Ala His Gly Ala Gly Val Leu Leu Ser Gln Asp

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Glu Glu Glu Gln Glu Gly Pro Gly Thr Arg Leu Pro Gly Asn Leu

85 90 95
 Ser Ser Glu Asp Val Leu Pro Ala Gly Cys Thr Glu Trp Arg Val Gln
 100 105 110
 Thr Leu Ala Tyr Leu Pro Gln Glu Asp Trp Ala Pro Thr Ser Leu Thr
 115 120 125
 Arg Pro Ala Pro Pro Asp Ser Glu Gly Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ser

 130 135 140
 Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Tyr Cys Ala Leu Gly Cys Tyr Gly Gly
 145 150 155 160
 Trp His Leu Ser Ala Leu Pro Gly Asn Thr Gln Ser Ser Gly Pro Ile
 165 170 175
 Pro Ala Leu Ala Cys Gly Leu Ser Cys Asp His Gln Gly Leu Glu Thr
 180 185 190
 Gln Gln Gly Val Ala Trp Val Leu Ala Gly His Cys Gln Arg Pro Gly

 195 200 205
 Leu His Glu Asp Leu Gln Gly Met Leu Leu Pro Ser Val Leu Ser Lys
 210 215 220
 Ala Arg Ser Trp Thr Phe
 225 230
 <210> 251
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: IL10RA transcript variant 1 NM_001558_3
 <400> 251
 Gln Leu Tyr Val Arg Arg Arg Lys Lys Leu Pro Ser Val Leu Leu Phe
 1 5 10 15

 Lys Lys Pro Ser Pro Phe Ile Phe Ile Ser Gln Arg Pro Ser Pro Glu
 20 25 30
 Thr Gln Asp Thr Ile His Pro Leu Asp Glu Glu Ala Phe Leu Lys Val
 35 40 45
 Ser Pro Glu Leu Lys Asn Leu Asp Leu His Gly Ser Thr Asp Ser Gly

50					55					60									
Phe	Gly	Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Leu	Gln	Thr	Glu	Glu	Pro	Gln	Phe	Leu				
65					70					75					80				
Leu	Pro	Asp	Pro	His	Pro	Gln	Ala	Asp	Arg	Thr	Leu	Gly	Asn	Arg	Glu				
85					90					95									
Pro	Pro	Val	Leu	Gly	Asp	Ser	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr				
100					105					110									
Asp	Ser	Gly	Ile	Cys	Leu	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Ser	Pro	Ser	Thr	Gly				
115					120					125									
Pro	Thr	Trp	Glu	Gln	Gln	Val	Gly	Ser	Asn	Ser	Arg	Gly	Gln	Asp	Asp				
130					135					140									
Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr				
145					150					155					160				
Gln	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	His	His	Ser	Pro	Pro	Glu	Pro	Glu	Val				
165					170					175									
Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Phe	Gln	Gly	Tyr	Leu	Arg				
180					185					190									
Gln	Thr	Arg	Cys	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Thr	Lys	Thr	Gly	Cys	Leu	Glu				
195					200					205									
Glu	Glu	Ser	Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Lys	Phe	Gly	Arg	Cys				
210					215					220									
Leu	Val	Asp	Glu	Ala	Gly	Leu	His	Pro	Pro	Ala	Leu	Ala	Lys	Gly	Tyr				
225					230					235					240				
Leu	Lys	Gln	Asp	Pro	Leu	Glu	Met	Thr	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro				
245					250					255									
Thr	Gly	Gln	Trp	Asn	Gln	Pro	Thr	Glu	Glu	Trp	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu				
260					265					270									
Ser	Ser	Cys	Ser	Asp	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Trp	Ser	Phe	Ala	His	Asp				
275					280					285									
Leu	Ala	Pro	Leu	Gly	Cys	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser				
290					295					300									

Phe Asn Ser Asp Leu Val Thr Leu Pro Leu Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 305 310 315 320
 Ser Glu

<210> 252

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL10RB NM_000628_4

<400> 252

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

Gln Asn Pro Gly Asp Ser Cys Ser Leu Gly Thr Pro Pro Gly Gln Gly
 65 70 75 80
 Pro Gln Ser

<210> 253

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL11RA NM_001142784_2

<400> 253

Arg Leu Arg Arg Gly Gly Lys Asp Gly Ser Pro Lys Pro Gly Phe Leu
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Ile Pro Val Asp Arg Arg Pro Gly Ala Pro Asn Leu
 20 25 30

<210> 254

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL12RB1 transcript variant 1 and 4 NM_005535_2

<400> 254

Asn Arg Ala Ala Arg His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ala Ile Glu Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile

20 25 30

Asn Pro Val Asp Phe Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

Thr Glu Leu Pro Glu Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu

65 70 75 80

Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg Cys Lys Ala Lys Met

85 90

<210> 255

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL12RB1 transcript variant 3 NM_001290023_1

<400> 255

Asn Arg Ala Ala Arg His Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ala Ile Glu Phe Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile

20 25 30

Asn Pro Val Asp Phe Gln Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val

35 40 45

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

50 55 60

Thr Glu Leu Pro Glu Gly Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu

65 70 75 80

Ser Leu Glu Asp Gly Asp Arg Cys Asp Arg

85 90

<210> 256

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL12RB2 transcript variant 1 and 3 NM_001559_2

<400> 256

His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala Leu Arg Pro

1 5 10 15

Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser Thr Cys Ala

20 25 30

Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro Leu Asp Arg

35 40 45

Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro Leu Val Ile

50 55 60

Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His Pro Pro Cys

65 70 75 80

Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His Gln Ala Ser

85 90 95

Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro Pro Arg Ala

100 105 110

Leu Gln Ala Glu Ser Arg Gln Leu Val Asp Leu Tyr Lys Val Leu Glu

115 120 125

Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys Pro Trp Thr

130 135 140

Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser

145 150 155 160

Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu

165 170 175

Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp
195 200 205
Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
210 215

<210> 257

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL13RA1 NM_001560_2

<400> 257

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

Val Val Leu Ile Glu Asn Leu Lys Lys Ala Ser Gln
50 55 60

<210> 258

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL13RA2 NM_000640_2

<400> 258

Arg Lys Pro Asn Thr Tyr Pro Lys Met Ile Pro Glu Phe Phe Cys Asp
1 5 10 15
Thr

<210> 259

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL15RA transcript variant 4 NM_001256765_1

<400> 259

Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu Met Glu Ala Met

1 5 10 15

Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg Asp Glu Asp Leu

20 25 30

Glu Asn Cys Ser His His Leu

35

<210> 260

<211> 525

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RA NM_014339_6

<400> 260

Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr Ser Ala Asp His Pro

35 40 45

Leu Tyr Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln Phe Leu Leu Thr Ala

50 55 60

Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ile Ser

65 70 75 80

Glu Ala Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln Lys Gln Glu Met Val

85 90 95

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

100 105 110

Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro Val Arg Leu Arg Cys

115 120 125

Asp His Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr Ala Ala Met Asn Met

130

135

140

Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe Gly Thr Tyr Val Val

145

150

155

160

Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser Cys Asp Gly Asp Val Pro Asp Leu Phe

165

170

175

Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro Leu Met Asp Arg Phe Glu Glu Val Tyr

180

185

190

Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu Met Phe Gln Pro Gly Arg Met His Arg

195

200

205

Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp Asn Tyr Leu Arg Ser Pro Gly Gly Arg

210

215

220

Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp Arg Phe Arg Asp Trp Gln Val Arg Cys

225

230

235

240

Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu Asn Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Gln Asp

245

250

255

Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu Val Phe Glu Glu Pro Leu Leu Pro Pro

260

265

270

Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg Ala Pro Leu Val Arg Glu Pro Gly Ser

275

280

285

Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp Pro Leu Val Gly Glu Glu Gly Gly Ala

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

Val Ala Ala Val Glu Pro Gly Pro Leu Ala Asp Gly Ala Ala Val Arg

340

345

350

Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Glu Ala Cys Pro Leu Leu Gly Ser Pro

355

360

365

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

370 375 380
Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr Pro Met Ala Ser Pro Asp Leu Leu Pro

385 390 395 400
Glu Asp Val Arg Glu His Leu Glu Gly Leu Met Leu Ser Leu Phe Glu

405 410 415
Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys Ser Arg Pro Ala Met

420 425 430
Val Leu Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu Glu Gln Arg Gln Ser

435 440 445
Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser Ser Pro Gln Pro Pro

450 455 460
Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gln Asp Pro

465 470 475 480
Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp Leu Glu Ser Leu Arg

485 490 495
Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu Gln Lys Asn Ser Gly

500 505 510
Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro Ser Ala

515 520 525

<210> 261

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RB NM_018725_3

<400> 261

Arg His Glu Arg Ile Lys Lys Thr Ser Phe Ser Thr Thr Thr Leu Leu

1 5 10 15

Pro Pro Ile Lys Val Leu Val Val Tyr Pro Ser Glu Ile Cys Phe His

20 25 30

His Thr Ile Cys Tyr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Asn His Cys Arg Ser

35 40 45

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

Pro Val Gln Trp Leu Ala Thr Gln Lys Lys Ala Ala Asp Lys Val Val
65 70 75 80

Phe Leu Leu Ser Asn Asp Val Asn Ser Val Cys Asp Gly Thr Cys Gly
85 90 95

Lys Ser Glu Gly Ser Pro Ser Glu Asn Ser Gln Asp Leu Phe Pro Leu
100 105 110

Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser Asp Leu Arg Ser Gln Ile His Leu His
115 120 125

Lys Tyr Val Val Val Tyr Phe Arg Glu Ile Asp Thr Lys Asp Asp Tyr
130 135 140

Asn Ala Leu Ser Val Cys Pro Lys Tyr His Leu Met Lys Asp Ala Thr
145 150 155 160

Ala Phe Cys Ala Glu Leu Leu His Val Lys Gln Gln Val Ser Ala Gly
165 170 175

Lys Arg Ser Gln Ala Cys His Asp Gly Cys Cys Ser Leu
180 185

<210> 262
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: IL17RC transcript variant 1 NM_153460_3
<400> 262

Lys Lys Asp His Ala Lys Gly Trp Leu Arg Leu Leu Lys Gln Asp Val
1 5 10 15

Arg Ser Gly Ala Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu Ala Ser Ala
35 40 45

Leu Cys Gln Leu Pro Leu Arg Val Ala Val Asp Leu Trp Ser Arg Arg
50 55 60

Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala Gln Arg Arg
65 70 75 80
Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe Ser Pro Gly
85 90 95

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

Thr	Val	Pro	Val	Phe	Thr	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Pro	Asp	Phe	Leu	Gly
165					170					175					
Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Gly	Arg	Leu	Gln	Glu	Arg
180					185					190					
Ala	Glu	Gln	Val	Ser	Arg	Ala	Leu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asp	Ser	Tyr	Phe
195					200					205					
His	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Ala
210			215				220								

Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr
225 230

<210> 263

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RC transcript variant 4 NM_001203263.1

<400> 263

Lys Lys Asp His Ala Lys Ala Ala Ala Arg Gly Arg Ala Ala Leu Leu
1 5 10 15
Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Ser Gly Phe Glu Arg Leu Val Gly Ala Leu
20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Arg Glu Leu Ser Ala Gln Gly Pro Val Ala Trp Phe His Ala

50 55 60

Gln Arg Arg Gln Thr Leu Gln Glu Gly Gly Val Val Val Leu Leu Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Pro Gly Ala His Gly Pro His Asp Ala Phe Arg Ala Ser Leu

100 105 110

Ser Cys Val Leu Pro Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ala Pro Gly Ser Tyr

115 120 125

Val Gly Ala Cys Phe Asp Arg Leu Leu His Pro Asp Ala Val Pro Ala

130 135 140

Leu Phe Arg Thr Val Pro Val Phe Thr Leu Pro Ser Gln Leu Pro Asp

145 150 155 160

Phe Leu Gly Ala Leu Gln Gln Pro Arg Ala Pro Arg Ser Gly Arg Leu

165 170 175

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

180 185 190

Ser Tyr Phe His Pro Pro Gly Thr Pro Ala Pro Gly Arg Gly Val Gly

195 200 205

Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Gly Asp Gly Thr

210 215

<210> 264

<211> 419

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RD transcript variant 2 NM_017563_4

<400> 264

Cys Arg Lys Lys Gln Gln Glu Asn Ile Tyr Ser His Leu Asp Glu Glu

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

Pro Val Leu Glu Lys Phe Asp Ser Gly Leu Val Leu Asn Asp Val Met
 260 265 270
 Cys Lys Pro Gly Pro Glu Ser Asp Phe Cys Leu Lys Val Glu Ala Ala
 275 280 285
 Val Leu Gly Ala Thr Gly Pro Ala Asp Ser Gln His Glu Ser Gln His
 290 295 300
 Gly Gly Leu Asp Gln Asp Gly Glu Ala Arg Pro Ala Leu Asp Gly Ser
 305 310 315 320

Ala Ala Leu Gln Pro Leu Leu His Thr Val Lys Ala Gly Ser Pro Ser
 325 330 335
 Asp Met Pro Arg Asp Ser Gly Ile Tyr Asp Ser Ser Val Pro Ser Ser
 340 345 350
 Glu Leu Ser Leu Pro Leu Met Glu Gly Leu Ser Thr Asp Gln Thr Glu
 355 360 365
 Thr Ser Ser Leu Thr Glu Ser Val Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Glu
 370 375 380

Glu Glu Pro Pro Ala Leu Pro Ser Lys Leu Leu Ser Ser Gly Ser Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Asp Leu Gly Cys Arg Ser Tyr Thr Asp Glu Leu His Ala Val
 405 410 415
 Ala Pro Leu

<210> 265

<211> 192

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL17RE transcript variant 1 NM_153480_1

<400> 265

Thr Cys Arg Arg Pro Gln Ser Gly Pro Gly Pro Ala Arg Pro Val Leu
 1 5 10 15

Leu Leu His Ala Ala Asp Ser Glu Ala Gln Arg Arg Leu Val Gly Ala
 20 25 30

Leu Ala Glu Leu Leu Arg Ala Ala Leu Gly Gly Gly Arg Asp Val Ile
 35 40 45
 Val Asp Leu Trp Glu Gly Arg His Val Ala Arg Val Gly Pro Leu Pro
 50 55 60
 Trp Leu Trp Ala Ala Arg Thr Arg Val Ala Arg Glu Gln Gly Thr Val
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Trp Ser Gly Ala Asp Leu Arg Pro Val Ser Gly Pro Asp
 85 90 95
 Pro Arg Ala Ala Pro Leu Leu Ala Leu Leu His Ala Ala Pro Arg Pro
 100 105 110
 Leu Leu Leu Leu Ala Tyr Phe Ser Arg Leu Cys Ala Lys Gly Asp Ile
 115 120 125
 Pro Pro Pro Leu Arg Ala Leu Pro Arg Tyr Arg Leu Leu Arg Asp Leu
 130 135 140

Pro Arg Leu Leu Arg Ala Leu Asp Ala Arg Pro Phe Ala Glu Ala Thr
 145 150 155 160
 Ser Trp Gly Arg Leu Gly Ala Arg Gln Arg Arg Gln Ser Arg Leu Glu
 165 170 175
 Leu Cys Ser Arg Leu Glu Arg Glu Ala Ala Arg Leu Ala Asp Leu Gly
 180 185 190

<210> 266

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL18R1 transcript variant 1 NM_003855_3

<400> 266

Tyr Arg Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Thr Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu
 20 25 30
 Lys Glu Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu
 35 40 45

Ile Leu Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile
50 55 60

Phe Glu Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His
65 70 75 80

Ser Leu Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser
85 90 95

Tyr Met Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu
100 105 110

Ala Leu Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro
115 120 125

Val Thr Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser
130 135 140

His Arg Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser
145 150 155 160

Arg Phe Trp Lys Asn Leu Leu Tyr Leu Met Pro Ala Lys Thr Val Lys
165 170 175

Pro Gly Arg Asp Glu Pro Glu Val Leu Pro Val Leu Ser Glu Ser
180 185 190

<210> 267

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL18RAP NM_003853_3

<400> 267

Ser Ala Leu Leu Tyr Arg His Trp Ile Glu Ile Val Leu Leu Tyr Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Gln Ser Lys Asp Gln Thr Leu Gly Asp Lys Lys Asp Phe Asp
20 25 30

Ala Phe Val Ser Tyr Ala Lys Trp Ser Ser Phe Pro Ser Glu Ala Thr
35 40 45

Ser Ser Leu Ser Glu Glu His Leu Ala Leu Ser Leu Phe Pro Asp Val

50 55 60
 Leu Glu Asn Lys Tyr Gly Tyr Ser Leu Cys Leu Leu Glu Arg Asp Val
 65 70 75 80
 Ala Pro Gly Gly Val Tyr Ala Glu Asp Ile Val Ser Ile Ile Lys Arg
 85 90 95
 Ser Arg Arg Gly Ile Phe Ile Leu Ser Pro Asn Tyr Val Asn Gly Pro
 100 105 110

 Ser Ile Phe Glu Leu Gln Ala Ala Val Asn Leu Ala Leu Asp Asp Gln
 115 120 125
 Thr Leu Lys Leu Ile Leu Ile Lys Phe Cys Tyr Phe Gln Glu Pro Glu
 130 135 140
 Ser Leu Pro His Leu Val Lys Lys Ala Leu Arg Val Leu Pro Thr Val
 145 150 155 160
 Thr Trp Arg Gly Leu Lys Ser Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Trp Ala
 165 170 175

 Lys Met Arg Tyr His Met Pro Val Lys Asn Ser Gln Gly Phe Thr Trp
 180 185 190
 Asn Gln Leu Arg Ile Thr Ser Arg Ile Phe Gln Trp Lys Gly Leu Ser
 195 200 205
 Arg Thr Glu Thr Thr Gly Arg Ser Ser Gln Pro Lys Glu Trp
 210 215 220

 <210> 268
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: IL20RA transcript variant 1 NM_014432_3

 <400> 268
 Ser Ile Tyr Arg Tyr Ile His Val Gly Lys Glu Lys His Pro Ala Asn
 1 5 10 15
 Leu Ile Leu Ile Tyr Gly Asn Glu Phe Asp Lys Arg Phe Phe Val Pro
 20 25 30
 Ala Glu Lys Ile Val Ile Asn Phe Ile Thr Leu Asn Ile Ser Asp Asp

35	40	45
Ser Lys Ile Ser His Gln Asp Met Ser Leu Leu Gly Lys Ser Ser Asp		
50	55	60
Val Ser Ser Leu Asn Asp Pro Gln Pro Ser Gly Asn Leu Arg Pro Pro		
65	70	75
Gln Glu Glu Glu Glu Val Lys His Leu Gly Tyr Ala Ser His Leu Met		
85	90	95
Glu Ile Phe Cys Asp Ser Glu Glu Asn Thr Glu Gly Thr Ser Leu Thr		
100	105	110
Gln Gln Glu Ser Leu Ser Arg Thr Ile Pro Pro Asp Lys Thr Val Ile		
115	120	125
Glu Tyr Glu Tyr Asp Val Arg Thr Thr Asp Ile Cys Ala Gly Pro Glu		
130	135	140
Glu Gln Glu Leu Ser Leu Gln Glu Glu Val Ser Thr Gln Gly Thr Leu		
145	150	155
Leu Glu Ser Gln Ala Ala Leu Ala Val Leu Gly Pro Gln Thr Leu Gln		
165	170	175
Tyr Ser Tyr Thr Pro Gln Leu Gln Asp Leu Asp Pro Leu Ala Gln Glu		
180	185	190
His Thr Asp Ser Glu Glu Gly Pro Glu Glu Glu Pro Ser Thr Thr Leu		
195	200	205
Val Asp Trp Asp Pro Gln Thr Gly Arg Leu Cys Ile Pro Ser Leu Ser		
210	215	220
Ser Phe Asp Gln Asp Ser Glu Gly Cys Glu Pro Ser Glu Gly Asp Gly		
225	230	235
Leu Gly Glu Glu Gly Leu Leu Ser Arg Leu Tyr Glu Glu Pro Ala Pro		
245	250	255
Asp Arg Pro Pro Gly Glu Asn Glu Thr Tyr Leu Met Gln Phe Met Glu		
260	265	270
Glu Trp Gly Leu Tyr Val Gln Met Glu Asn		
275	280	

<210> 269

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL20RB NM_144717_3

<400> 269

Trp Lys Met Gly Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Cys Cys Pro Val Val Val

1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Leu Lys Ile Thr Asn Ser Pro Gln Lys Leu Ile Ser

20 25 30

Cys Arg Arg Glu Glu Val Asp Ala Cys Ala Thr Ala Val Met Ser Pro

35 40 45

Glu Glu Leu Leu Arg Ala Trp Ile Ser

50 55

<210> 270

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL21R transcript variant 2 NM_181078_2

<400> 270

Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala

1 5 10 15

Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser

20 25 30

Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu

35 40 45

Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu
100 105 110

Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val
115 120 125

Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp
130 135 140

Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly
145 150 155 160

Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly
165 170 175

Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu
180 185 190

Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly
195 200 205

Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu
210 215 220

Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly
225 230 235 240

Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser
245 250 255

Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val
260 265 270

Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
275 280 285

<210> 271

<211> 325

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL22RA1 NM_021258_3

<400> 271

Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser Leu Asn
1 5 10 15

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

260 265 270
Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser Leu Val
275 280 285
Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser Asp Leu

290 295 300
Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala Leu Thr
305 310 315 320
Val Gln Trp Glu Ser
325

<210> 272

<211> 253

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL23R NM_144701_2

<400> 272

Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile
1 5 10 15
Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val

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

85 90 95
Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile
100 105 110
Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile
115 120 125
Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn

130 135 140
Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser

145 150 155 160
Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile

165 170 175
Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu

180 185 190
Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile

195 200 205
Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile

210 215 220
Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile

225 230 235 240
Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile Ser Leu Leu Glu Lys

245 250

<210> 273

<211> 99

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL27RA NM_004843_3

<400> 273

Thr Ser Gly Arg Cys Tyr His Leu Arg His Lys Val Leu Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Trp Glu Lys Val Pro Asp Pro Ala Asn Ser Ser Ser Gly Gln Pro
20 25 30

His Met Glu Gln Val Pro Glu Ala Gln Pro Leu Gly Asp Leu Pro Ile
35 40 45

Leu Glu Val Glu Glu Met Glu Pro Pro Pro Val Met Glu Ser Ser Gln
50 55 60

Pro Ala Gln Ala Thr Ala Pro Leu Asp Ser Gly Tyr Glu Lys His Phe
65 70 75 80

Leu Pro Thr Pro Glu Glu Leu Gly Leu Leu Gly Pro Pro Arg Pro Gln
85 90 95
Val Leu Ala

<210> 274

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL27RA NM_004843_3

<400> 274

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

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

<210> 275

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: IL31RA transcript variant 1 NM_139017_5

<400> 275

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

35 40 45
Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys

50 55 60
Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu
65 70 75 80
Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Tyr
85 90 95
Val Thr Cys Pro Phe Arg Pro Asp Cys Pro Leu Gly Lys Ser Phe Glu
100 105 110
Glu Leu Pro Val Ser Pro Glu Ile Pro Pro Arg Lys Ser Gln Tyr Leu

115 120 125
Arg Ser Arg Met Pro Glu Gly Thr Arg Pro Glu Ala Lys Glu Gln Leu
130 135 140
Leu Phe Ser Gly Gln Ser Leu Val Pro Asp His Leu Cys Glu Glu Gly
145 150 155 160
Ala Pro Asn Pro Tyr Leu Lys Asn Ser Val Thr Ala Arg Glu Phe Leu
165 170 175
Val Ser Glu Lys Leu Pro Glu His Thr Lys Gly Glu Val

180 185
<210> 276
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: IL31RA transcript variant 4 NM_001242638_1
<400> 276

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

35 40 45

Ile Leu Lys Pro Cys Ser Thr Pro Ser Asp Lys Leu Val Ile Asp Lys
50 55 60
Leu Val Val Asn Phe Gly Asn Val Leu Gln Glu Ile Phe Thr Asp Glu
65 70 75 80
Ala Arg Thr Gly Gln Glu Asn Asn Leu Gly Gly Glu Lys Asn Gly Thr
85 90 95
Arg Ile Leu Ser Ser Cys Pro Thr Ser Ile
100 105

<210> 277

<211> 303

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LEPR transcript variant 1 NM_002303_5

<400> 277

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

Leu Leu Leu Glu Pro Glu Thr Ile Ser Glu Asp Ile Ser Val Asp Thr
50 55 60
Ser Trp Lys Asn Lys Asp Glu Met Met Pro Thr Thr Val Val Ser Leu
65 70 75 80
Leu Ser Thr Thr Asp Leu Glu Lys Gly Ser Val Cys Ile Ser Asp Gln
85 90 95
Phe Asn Ser Val Asn Phe Ser Glu Ala Glu Gly Thr Glu Val Thr Tyr
100 105 110

Glu Asp Glu Ser Gln Arg Gln Pro Phe Val Lys Tyr Ala Thr Leu Ile
115 120 125
Ser Asn Ser Lys Pro Ser Glu Thr Gly Glu Glu Gln Gly Leu Ile Asn
130 135 140

Ser Ser Val Thr Lys Cys Phe Ser Ser Lys Asn Ser Pro Leu Lys Asp
145 150 155 160

Ser Phe Ser Asn Ser Ser Trp Glu Ile Glu Ala Gln Ala Phe Phe Ile
165 170 175

Leu Ser Asp Gln His Pro Asn Ile Ile Ser Pro His Leu Thr Phe Ser
180 185 190

Glu Gly Leu Asp Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Asn Phe Pro Glu Glu
195 200 205

Asn Asn Asp Lys Lys Ser Ile Tyr Tyr Leu Gly Val Thr Ser Ile Lys
210 215 220

Lys Arg Glu Ser Gly Val Leu Leu Thr Asp Lys Ser Arg Val Ser Cys
225 230 235 240

Pro Phe Pro Ala Pro Cys Leu Phe Thr Asp Ile Arg Val Leu Gln Asp
245 250 255

Ser Cys Ser His Phe Val Glu Asn Asn Ile Asn Leu Gly Thr Ser Ser
260 265 270

Lys Lys Thr Phe Ala Ser Tyr Met Pro Gln Phe Gln Thr Cys Ser Thr
275 280 285

Gln Thr His Lys Ile Met Glu Asn Lys Met Cys Asp Leu Thr Val
290 295 300

<210> 278

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LEPR transcript variant 2 NM_001003680_3

<400> 278

Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro
1 5 10 15

Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Met Leu Glu
20 25 30

Gly Ser Met Phe Val Lys Ser His His His Ser Leu Ile Ser Ser Thr

35 40 45

Gln Gly His Lys His Cys Gly Arg Pro Gln Gly Pro Leu His Arg Lys

50 55 60

Thr Arg Asp Leu Cys Ser Leu Val Tyr Leu Leu Thr Leu Pro Pro Leu

65 70 75 80

Leu Ser Tyr Asp Pro Ala Lys Ser Pro Ser Val Arg Asn Thr Gln Glu

85 90 95

<210> 279

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LEPR transcript variant 3 NM_001003679_3

<400> 279

Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro

1 5 10 15

Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp

20 25 30

Ile Leu

<210> 280

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LEPR transcript variant 5 NM_001198688_1

<400> 280

Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro

1 5 10 15

Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Lys Met Pro

20 25 30

Gly Thr Lys Glu Leu Leu Gly Gly Gly Trp Leu Thr

35 40

<210> 281

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LIFR NM_001127671_1

<400> 281

Tyr Arg Lys Arg Glu Trp Ile Lys Glu Thr Phe Tyr Pro Asp Ile Pro

1 5 10 15

Asn Pro Glu Asn Cys Lys Ala Leu Gln Phe Gln Lys Ser Val Cys Glu

20 25 30

Gly Ser Ser Ala Leu Lys Thr Leu Glu Met Asn Pro Cys Thr Pro Asn

35 40 45

Asn Val Glu Val Leu Glu Thr Arg Ser Ala Phe Pro Lys Ile Glu Asp

50 55 60

Thr Glu Ile Ile Ser Pro Val Ala Glu Arg Pro Glu Asp Arg Ser Asp

65 70 75 80

Ala Glu Pro Glu Asn His Val Val Val Ser Tyr Cys Pro Pro Ile Ile

85 90 95

Glu Glu Glu Ile Pro Asn Pro Ala Ala Asp Glu Ala Gly Gly Thr Ala

100 105 110

Gln Val Ile Tyr Ile Asp Val Gln Ser Met Tyr Gln Pro Gln Ala Lys

115 120 125

Pro Glu Glu Glu Gln Glu Asn Asp Pro Val Gly Gly Ala Gly Tyr Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Thr Trp Asn Leu Val Ser Pro Asp Ser Pro Arg Ser Ile Asp Ser

180 185 190

Asn Ser Glu Ile Val Ser Phe Gly Ser Pro Cys Ser Ile Asn Ser Arg

195 200 205

Gln Phe Leu Ile Pro Pro Lys Asp Glu Asp Ser Pro Lys Ser Asn Gly

210

215

220

Gly Gly Trp Ser Phe Thr Asn Phe Phe Gln Asn Lys Pro Asn Asp

225

230

235

<210> 282

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: LMP1 NC_007605_1

<400> 282

Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp Glu His His His Asp Asp Ser

1

5

10

15

Leu Pro His Pro Gln Gln Ala Thr Asp Asp Ser Gly His Glu Ser Asp

20

25

30

Ser Asn Ser Asn Glu Gly Arg His His Leu Leu Val Ser Gly Ala Gly

35

40

45

Asp Gly Pro Pro Leu Cys Ser Gln Asn Leu Gly Ala Pro Gly Gly Gly

50

55

60

Pro Asp Asn Gly Pro Gln Asp Pro Asp Asn Thr Asp Asp Asn Gly Pro

65

70

75

80

Gln Asp Pro Asp Asn Thr Asp Asp Asn Gly Pro His Asp Pro Leu Pro

85

90

95

Gln Asp Pro Asp Asn Thr Asp Asp Asn Gly Pro Gln Asp Pro Asp Asn

100

105

110

Thr Asp Asp Asn Gly Pro His Asp Pro Leu Pro His Ser Pro Ser Asp

115

120

125

Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro Gln Leu Thr Glu Glu Val Glu

130

135

140

Asn Lys Gly Gly Asp Gln Gly Pro Pro Leu Met Thr Asp Gly Gly Gly

145

150

155

160

Gly His Ser His Asp Ser Gly His Gly Gly Gly Asp Pro His Leu Pro

165 170 175
Thr Leu Leu Leu Gly Ser Ser Gly Ser Gly Gly Asp Asp Asp Asp Pro

180 185 190

His Gly Pro Val Gln Leu Ser Tyr Tyr Asp

195 200

<210> 283

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MPL NM_005373_2

<400> 283

Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg His Ala Leu Trp

1 5 10 15

Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln Tyr Leu Arg Asp

20 25 30

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

35 40 45

Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys Ser Ser Glu Arg

50 55 60

Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ala Gln Met Asp Tyr Arg Arg

65 70 75 80

Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser Val Cys Pro Pro

85 90 95

Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile Ala Asn His Ser

100 105 110

Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro

115 120

<210> 284

<211> 304

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 1 NM_001172567_1

<400> 284

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu
50 55 60

Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly
65 70 75 80

Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu
85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro
115 120 125

Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu
130 135 140

Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg
145 150 155 160

Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln Phe Val Gln
165 170 175

Glu Met Ile Arg Gln Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Arg Leu Lys Leu Cys
180 185 190

Val Ser Asp Arg Asp Val Leu Pro Gly Thr Cys Val Trp Ser Ile Ala
195 200 205

Ser Glu Leu Ile Glu Lys Arg Leu Ala Arg Arg Pro Arg Gly Gly Cys
210 215 220

Arg Arg Met Val Val Val Val Ser Asp Asp Tyr Leu Gln Ser Lys Glu
225 230 235 240

Cys Asp Phe Gln Thr Lys Phe Ala Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala His
245 250 255
Gln Lys Arg Leu Ile Pro Ile Lys Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe
260 265 270
Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys
275 280 285
Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro
290 295 300

<210> 285

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 2 NM_002468_4

<400> 285

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
1 5 10 15
Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
20 25 30
Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu
50 55 60
Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly
65 70 75 80
Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu
85 90 95
Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro
115 120 125
Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu
130 135 140

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala His Gln Lys Arg Leu Ile Pro Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr
 260 265 270
 Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg
 275 280 285
 Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro
 290 295

<210> 286

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 3 NM_001172568_1

<400> 286

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
 35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Gly His Met

100

105

110

Pro Glu Arg Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln

115

120

125

Phe Val Gln Glu Met Ile Arg Gln Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Arg Leu

130

135

140

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

145

150

155

160

Ser Ile Ala Ser Glu Leu Ile Glu Lys Arg Cys Arg Arg Met Val Val

165

170

175

Val Val Ser Asp Asp Tyr Leu Gln Ser Lys Glu Cys Asp Phe Gln Thr

180

185

190

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

195

200

205

Pro Ile Lys Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg

210

215

220

Phe Ile Thr Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe

225

230

235

240

Trp Thr Arg Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro

245

250

<210> 287

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 4 NM_001172569_1

<400> 287

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu
50 55 60

Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly
65 70 75 80

Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu
85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro
115 120 125

Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu
130 135 140

Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly Ala Ala Gly Trp Trp
145 150 155 160

Trp Leu Ser Leu Met Ile Thr Cys Arg Ala Arg Asn Val Thr Ser Arg
165 170 175

Pro Asn Leu His Ser Ala Ser Leu Gln Val Pro Ile Arg Ser Asp
180 185 190

<210> 288

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 5 NM_001172566_1

<400> 288

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser

1 5 10 15
 Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
 20 25 30

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

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Gly Ala Ala
 100 105 110
 Gly Trp Trp Trp Leu Ser Leu Met Ile Thr Cys Arg Ala Arg Asn Val
 115 120 125
 Thr Ser Arg Pro Asn Leu His Ser Ala Ser Leu Gln Val Pro Ile Arg
 130 135 140

Ser Asp

145

<210> 289

<211> 172

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 1 NM_001172567_1

<400> 289

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

50

55

60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp

100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro

115 120 125

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

130 135 140

Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg

145 150 155 160

Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile

165 170

<210> 290

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 3 NM_001172568_1

<400> 290

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser

1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr

35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu
85 90 95
Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Gly His Met
100 105 110
Pro Glu Arg Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile
115 120 125

<210> 291

<211> 304

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 1 NM_001172567_1

<400> 291

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
1 5 10 15
Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
20 25 30
Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu
50 55 60
Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly
65 70 75 80
Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu
85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp
100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro
115 120 125
Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu
130 135 140
Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg
145 150 155 160

Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln Phe Val Gln
165 170 175

Glu Met Ile Arg Gln Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Arg Leu Lys Leu Cys
180 185 190

Val Ser Asp Arg Asp Val Leu Pro Gly Thr Cys Val Trp Ser Ile Ala
195 200 205

Ser Glu Leu Ile Glu Lys Arg Leu Ala Arg Arg Pro Arg Gly Gly Cys
210 215 220

Arg Arg Met Val Val Val Val Ser Asp Asp Tyr Leu Gln Ser Lys Glu
225 230 235 240

Cys Asp Phe Gln Thr Lys Phe Ala Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala His
245 250 255

Gln Lys Arg Pro Ile Pro Ile Lys Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe
260 265 270

Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys
275 280 285

Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro
290 295 300

<210> 292

<211> 296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 2 NM_002468_4

<400> 292

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu

50 55 60
 Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly
 65 70 75 80
 Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu
 85 90 95
 Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp
 100 105 110

 Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro
 115 120 125
 Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu
 130 135 140
 Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg
 145 150 155 160
 Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln Phe Val Gln
 165 170 175

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

 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala His Gln Lys Arg Pro Ile Pro Ile Lys
 245 250 255
 Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr
 260 265 270
 Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg
 275 280 285
 Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro
 290 295
 <210> 293

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MYD88 transcript variant 3 NM_001172568_1

<400> 293

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser

1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr

35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Gly His Met

100 105 110

Pro Glu Arg Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln

115 120 125

Phe Val Gln Glu Met Ile Arg Gln Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Arg Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Ile Ala Ser Glu Leu Ile Glu Lys Arg Cys Arg Arg Met Val Val

165 170 175

Val Val Ser Asp Asp Tyr Leu Gln Ser Lys Glu Cys Asp Phe Gln Thr

180 185 190

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

195 200 205

Pro Ile Lys Tyr Lys Ala Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg
 210 215 220
 Phe Ile Thr Val Cys Asp Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe
 225 230 235 240
 Trp Thr Arg Leu Ala Lys Ala Leu Ser Leu Pro
 245 250

<210> 294
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: OSMR transcript variant 4 NM_001323505_1
 <400> 294

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

Val Ser Lys Pro Glu Gly Thr Lys Ile Gln Phe Leu Gly Thr Arg Lys
 50 55 60
 Ser Leu Thr Glu Thr Glu Leu Thr Lys Pro Asn Tyr Leu Tyr Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Thr Glu Lys Asn His Ser Gly Pro Gly Pro Cys Ile Cys Phe Glu
 85 90 95
 Asn Leu Thr Tyr Asn Gln Ala Ala Ser Asp Ser Gly Ser Cys Gly His
 100 105 110

Val Pro Val Ser Pro Lys Ala Pro Ser Met Leu Gly Leu Met Thr Ser
 115 120 125
 Pro Glu Asn Val Leu Lys Ala Leu Glu Lys Asn Tyr Met Asn Ser Leu
 130 135 140
 Gly Glu Ile Pro Ala Gly Glu Thr Ser Leu Asn Tyr Val Ser Gln Leu
 145 150 155 160

Ala Ser Pro Met Phe Gly Asp Lys Asp Ser Leu Pro Thr Asn Pro Val
165 170 175

Glu Ala Pro His Cys Ser Glu Tyr Lys Met Gln Met Ala Val Ser Leu
180 185 190

Arg Leu Ala Leu Pro Pro Pro Thr Glu Asn Ser Ser Leu Ser Ser Ile
195 200 205

Thr Leu Leu Asp Pro Gly Glu His Tyr Cys
210 215

<210> 295

<211> 364

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PRLR transcript variant 1 NM_000949_6

<400> 295

Lys Gly Tyr Ser Met Val Thr Cys Ile Phe Pro Pro Val Pro Gly Pro

1 5 10 15
Lys Ile Lys Gly Phe Asp Ala His Leu Leu Glu Lys Gly Lys Ser Glu
20 25 30

Glu Leu Leu Ser Ala Leu Gly Cys Gln Asp Phe Pro Pro Thr Ser Asp
35 40 45

Tyr Glu Asp Leu Leu Val Glu Tyr Leu Glu Val Asp Asp Ser Glu Asp
50 55 60

Gln His Leu Met Ser Val His Ser Lys Glu His Pro Ser Gln Gly Met

65 70 75 80
Lys Pro Thr Tyr Leu Asp Pro Asp Thr Asp Ser Gly Arg Gly Ser Cys
85 90 95

Asp Ser Pro Ser Leu Leu Ser Glu Lys Cys Glu Glu Pro Gln Ala Asn
100 105 110

Pro Ser Thr Phe Tyr Asp Pro Glu Val Ile Glu Lys Pro Glu Asn Pro
115 120 125

Glu Thr Thr His Thr Trp Asp Pro Gln Cys Ile Ser Met Glu Gly Lys

130 135 140
 Ile Pro Tyr Phe His Ala Gly Gly Ser Lys Cys Ser Thr Trp Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Gln Pro Ser Gln His Asn Pro Arg Ser Ser Tyr His Asn Ile Thr
 165 170 175
 Asp Val Cys Glu Leu Ala Val Gly Pro Ala Gly Ala Pro Ala Thr Leu
 180 185 190
 Leu Asn Glu Ala Gly Lys Asp Ala Leu Lys Ser Ser Gln Thr Ile Lys

 195 200 205
 Ser Arg Glu Glu Gly Lys Ala Thr Gln Gln Arg Glu Val Glu Ser Phe
 210 215 220
 His Ser Glu Thr Asp Gln Asp Thr Pro Trp Leu Leu Pro Gln Glu Lys
 225 230 235 240
 Thr Pro Phe Gly Ser Ala Lys Pro Leu Asp Tyr Val Glu Ile His Lys
 245 250 255
 Val Asn Lys Asp Gly Ala Leu Ser Leu Leu Pro Lys Gln Arg Glu Asn

 260 265 270
 Ser Gly Lys Pro Lys Lys Pro Gly Thr Pro Glu Asn Asn Lys Glu Tyr
 275 280 285
 Ala Lys Val Ser Gly Val Met Asp Asn Asn Ile Leu Val Leu Val Pro
 290 295 300
 Asp Pro His Ala Lys Asn Val Ala Cys Phe Glu Glu Ser Ala Lys Glu
 305 310 315 320
 Ala Pro Pro Ser Leu Glu Gln Asn Gln Ala Glu Lys Ala Leu Ala Asn

 325 330 335
 Phe Thr Ala Thr Ser Ser Lys Cys Arg Leu Gln Leu Gly Gly Leu Asp
 340 345 350
 Tyr Leu Asp Pro Ala Cys Phe Thr His Ser Phe His
 355 360
 <210> 296
 <211> 42
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF4 NM_003327_3

<400> 296

Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His
1 5 10 15

Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln
20 25 30

Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile
35 40

<210> 297

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF8 transcript variant 1 NM_001243_4

<400> 297

His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys
1 5 10 15

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

20 25 30

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

Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr
50 55 60

Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp
65 70 75 80

Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro

85 90 95

Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile
100 105 110

Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro
115 120 125

Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu

130 135 140
Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro

145 150 155 160
Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly

165 170 175
Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys

180 185

<210> 298

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF9 NM_001561_5

<400> 298

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 299

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF14 transcript variant 1 NM_003820_3

<400> 299

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile

20 25 30

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

35 40 45

Thr Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His

50 55 60

<210> 300

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF18 transcript variant 1 NM_004195_2

<400> 300

Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Ser Gln Cys Met Trp Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp Leu Trp Val

50 55

<210> 301

<211> 51

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TNFRSF18 transcript variant 3_NM_148902_1

<400> 301

Gln Leu Gly Leu His Ile Trp Gln Leu Arg Lys Thr Gln Leu Leu Leu

1 5 10 15

Glu Val Pro Pro Ser Thr Glu Asp Ala Arg Ser Cys Gln Phe Pro Glu

20 25 30

Glu Glu Arg Gly Glu Arg Ser Ala Glu Glu Lys Gly Arg Leu Gly Asp

35 40 45

Leu Trp Val

50

<210> 302

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: Linker

<400> 302

Gly Ser Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Ala Ala Thr

1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser

20

<210> 303

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TRAF1, TRAF2, and TRAF3 consensus binding sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 303

Pro Xaa Gln Xaa Thr

1 5

<210> 304

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TRAF2 consensus binding sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 304

Ser Xaa Xaa Glu

1

<210> 305

<211> 6

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: TRAF6 consensus binding sequence

<220

><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 305

Gln Xaa Pro Xaa Glu Xaa

1 5

<210> 306

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Box1 motif

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223

> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 306

Pro Xaa Xaa Pro

1

<210> 307

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Shc phosphotyrosine-binding binding motif

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 307

Asn Xaa Xaa Tyr

1

<210> 308

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: STAT3 consensus binding sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 308

Tyr Xaa Xaa Gln

1

<210> 309

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: STAT5 recruitment sequence

<400> 309

Tyr Leu Pro Leu

1

<210> 310

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: STAT5 consensus recruitment sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is phosphorylated tyrosine

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 310

Xaa Leu Xaa Leu

1

<210> 311

<211> 570

<212> PRT

<213> Influenza virus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(570)

<223> Influenze A HA from H1N1

<400> 311

Met Lys Ala Asn Leu Leu Val Leu Leu Cys Ala Leu Ala Ala Asp

1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr

20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn

35 40 45

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

50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Leu Leu Gly

65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Asp Pro Leu Leu Pro Val Arg Ser Trp Ser Tyr Ile

85 90 95

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

100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe

115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Asn

130 135 140

Thr Asn Gly Val Thr Ala Ala Cys Ser His Glu Gly Lys Ser Ser Phe

145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys Glu Gly Ser Tyr Pro Lys
 165 170 175
 Leu Lys Asn Ser Tyr Val Asn Lys Lys Gly Lys Glu Val Leu Val Leu
 180 185 190
 Trp Gly Ile His His Pro Pro Asn Ser Lys Glu Gln Gln Asn Leu Tyr
 195 200 205
 Gln Asn Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Thr Ser Asn Tyr Asn Arg
 210 215 220

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

 His Glu Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Ala Ile Asn Ser
 290 295 300
 Ser Leu Pro Tyr Gln Asn Ile His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
 305 310 315 320
 Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
 325 330 335
 Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly
 340 345 350

 Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Ile Asp Gly
 355 360 365
 Trp Tyr Gly Tyr His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala
 370 375 380
 Asp Gln Lys Ser Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val
 385 390 395 400
 Asn Thr Val Ile Glu Lys Met Asn Ile Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys

405 410 415
 Glu Phe Asn Lys Leu Glu Lys Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val
 420 425 430
 Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val
 435 440 445
 Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys
 450 455 460
 Asn Leu Tyr Glu Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu
 465 470 475 480

 Ile Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys
 485 490 495
 Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu
 500 505 510
 Glu Ser Lys Leu Asn Arg Glu Lys Val Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser
 515 520 525
 Met Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser
 530 535 540

 Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser
 545 550 555 560
 Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565 570

 <210> 312
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Influenza virus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(470)
 <223> Influenze A NA from H10N7
 <400> 312
 Met Asn Pro Asn Gln Lys Leu Phe Ala Leu Ser Gly Val Ala Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Ser Ile Leu Asn Leu Leu Ile Gly Ile Ser Asn Val Gly Leu Asn

20 25 30

Val Ser Leu His Leu Lys Gly Ser Ser Asp Gln Asp Lys Asn Trp Thr

35 40 45

Cys Thr Ser Val Thr Gln Asn Asn Thr Thr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr

50 55 60

Val Asn Asn Thr Thr Val Ile Asn Lys Gly Thr Gly Thr Thr Lys Gln

65 70 75 80

Asn Tyr Leu Met Leu Asn Lys Ser Leu Cys Lys Val Glu Gly Trp Val

85 90 95

Val Val Ala Lys Asp Asn Ala Ile Arg Phe Gly Glu Ser Glu Gln Ile

100 105 110

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

115 120 125

Met Tyr Ala Leu His Gln Gly Thr Thr Ile Arg Asn Lys His Ser Asn

130 135 140

Gly Thr Ile His Asp Arg Thr Ala Phe Arg Gly Leu Ile Ser Thr Pro

145 150 155 160

Leu Gly Ser Pro Pro Val Val Ser Asn Ser Asp Phe Leu Cys Val Gly

165 170 175

Trp Ser Ser Thr Ser Cys His Asp Gly Ile Gly Arg Met Thr Ile Cys

180 185 190

Val Gln Gly Asn Asn Asn Asn Ala Thr Ala Thr Val Tyr Tyr Asp Arg

195 200 205

Arg Leu Thr Thr Thr Ile Lys Thr Trp Ala Gly Asn Ile Leu Arg Thr

210 215 220

Gln Glu Ser Glu Cys Val Cys His Asn Gly Thr Cys Val Val Ile Met

225 230 235 240

Thr Asp Gly Ser Ala Ser Ser Gln Ala His Thr Lys Val Leu Tyr Phe

245 250 255

His Lys Gly Leu Val Ile Lys Glu Glu Ala Leu Lys Gly Ser Ala Arg

260 265 270
His Ile Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Gly His Asn Ser Lys Val Thr Cys

275 280 285
Val Cys Arg Asp Asn Trp Gln Gly Ala Asn Arg Pro Val Ile Glu Ile

290 295 300
Asp Met Asn Ala Met Glu His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Thr Gly Val

305 310 315 320
Leu Thr Asp Thr Ser Arg Pro Ser Asp Lys Ser Met Gly Asp Cys Asn

325 330 335
Asn Pro Ile Thr Gly Ser Pro Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly Phe Gly

340 345 350
Phe Leu Asp Ser Asp Asn Thr Trp Leu Gly Arg Thr Ile Ser Pro Arg

355 360 365
Ser Arg Ser Gly Phe Glu Met Leu Lys Ile Pro Asn Ala Gly Thr Asp

370 375 380
Pro Asn Ser Arg Ile Thr Glu Arg Gln Glu Ile Val Asp Asn Asn Asn

385 390 395 400
Trp Ser Gly Tyr Ser Gly Ser Phe Ile Asp Tyr Trp Asp Glu Ser Ser

405 410 415
Val Cys Tyr Asn Pro Cys Phe Tyr Val Glu Leu Ile Arg Gly Arg Pro

420 425 430
Glu Glu Ala Lys Tyr Val Trp Trp Thr Ser Asn Ser Leu Val Ala Leu

435 440 445
Cys Gly Ser Pro Ile Ser Val Gly Ser Gly Ser Phe Pro Asp Gly Ala

450 455 460
Gln Ile Gln Tyr Phe Ser

465 470

<210> 313

<211> 523

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MV(ed)-F-delta-30

<400> 313

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

1 5 10 15

Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn

20 25 30

Leu Ser Lys Ile Gly Val Val Gly Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Lys Val

35 40 45

Met Thr Arg Ser Ser His Gln Ser Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Asn

50 55 60

Ile Thr Leu Leu Asn Asn Cys Thr Arg Val Glu Ile Ala Glu Tyr Arg

65 70 75 80

Arg Leu Leu Arg Thr Val Leu Glu Pro Ile Arg Asp Ala Leu Asn Ala

85 90 95

Met Thr Gln Asn Ile Arg Pro Val Gln Ser Val Ala Ser Ser Arg Arg

100 105 110

His Lys Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val

115 120 125

Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met

130 135 140

Leu Asn Ser Gln Ala Ile Asp Asn Leu Arg Ala Ser Leu Glu Thr Thr

145 150 155 160

Asn Gln Ala Ile Glu Ala Ile Arg Gln Ala Gly Gln Glu Met Ile Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Leu Leu Arg Tyr Tyr Thr Glu Ile Leu Ser Leu Phe Gly Pro Ser Leu

210 215 220

Arg Asp Pro Ile Ser Ala Glu Ile Ser Ile Gln Ala Leu Ser Tyr Ala

225 230 235 240

 Leu Gly Gly Asp Ile Asn Lys Val Leu Glu Lys Leu Gly Tyr Ser Gly
 245 250 255
 Gly Asp Leu Leu Gly Ile Leu Glu Ser Arg Gly Ile Lys Ala Arg Ile
 260 265 270
 Thr His Val Asp Thr Glu Ser Tyr Phe Ile Val Leu Ser Ile Ala Tyr
 275 280 285
 Pro Thr Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 290 295 300

 Val Ser Tyr Asn Ile Gly Ser Gln Glu Trp Tyr Thr Thr Val Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Ala Thr Gln Gly Tyr Leu Ile Ser Asn Phe Asp Glu Ser Ser
 325 330 335
 Cys Thr Phe Met Pro Glu Gly Thr Val Cys Ser Gln Asn Ala Leu Tyr
 340 345 350
 Pro Met Ser Pro Leu Leu Gln Glu Cys Leu Arg Gly Ser Thr Lys Ser
 355 360 365

 Cys Ala Arg Thr Leu Val Ser Gly Ser Phe Gly Asn Arg Phe Ile Leu
 370 375 380
 Ser Gln Gly Asn Leu Ile Ala Asn Cys Ala Ser Ile Leu Cys Lys Cys
 385 390 395 400
 Tyr Thr Thr Gly Thr Ile Ile Asn Gln Asp Pro Asp Lys Ile Leu Thr
 405 410 415
 Tyr Ile Ala Ala Asp His Cys Pro Val Val Glu Val Asn Gly Val Thr
 420 425 430

 Ile Gln Val Gly Ser Arg Arg Tyr Pro Asp Ala Val Tyr Leu His Arg
 435 440 445
 Ile Asp Leu Gly Pro Pro Ile Ser Leu Glu Arg Leu Asp Val Gly Thr
 450 455 460
 Asn Leu Gly Asn Ala Ile Ala Lys Leu Glu Asp Ala Lys Glu Leu Leu
 465 470 475 480

Glu Ser Ser Asp Gln Ile Leu Arg Ser Met Lys Gly Leu Ser Ser Thr
485 490 495

Ser Ile Val Tyr Ile Leu Ile Ala Val Cys Leu Gly Gly Leu Ile Gly
500 505 510

Ile Pro Ala Leu Ile Cys Cys Cys Arg Gly Arg
515 520

<210> 314

<211> 599

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MV(ed)-H-delta-18

<400> 314

Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg

1 5 10 15

Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Ser Leu Ser Leu Ile

20 25 30

Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr

35 40 45

Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn

50 55 60

Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu

100 105 110

Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile

115 120 125

Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu

130 135 140

Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn

145 150 155 160
 Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile
 165 170 175
 Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu
 180 185 190
 Ser Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly
 195 200 205
 Met Tyr Gly Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser Ser Lys

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

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

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

Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly Pro Leu

405 410 415

Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His Asn Asn

420 425 430

Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu Gly Val

435 440 445

Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser Pro Asn Leu

450 455 460

Phe Thr Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Glu Asp Cys His Ala Pro Thr

465 470 475 480

Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser Ser Asn Leu

485 490 495

Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr Tyr Asp

500 505 510

Thr Ser Arg Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Gly

515 520 525

Arg Ser Phe Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val

530 535 540

Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp

545 550 555 560

Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile

565 570 575

Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg

580 585 590

Glu Asp Gly Thr Asn Arg Arg

595

<210> 315

<211> 593

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MV(ed)-H-delta-24

<400> 315

Met Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg Pro Tyr Val Leu Leu Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr Thr Ala Glu Ile His Lys

35 40 45

Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn Ser Ile Glu His Gln Val

50 55 60

Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile Ile Gly Asp Glu Val Gly

65 70 75 80

Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu Val Lys Phe Ile Ser Asp

85 90 95

Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu Tyr Asp Phe Arg Asp Leu

100 105 110

Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile Lys Leu Asp Tyr Asp Gln

115 120 125

Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu Met Asn Ala Leu Val Asn

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile Arg Gly Gln Phe Ser Asn

165 170 175

Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu Ser Arg Gly Tyr Asn Val

180 185 190

Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly Met Tyr Gly Gly Thr Tyr

195 200 205

Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser Ser Lys Arg Ser Glu Leu Ser Gln

210 215 220

Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu Val Gly Val Ile Arg Asn Pro Gly

225 230 235 240

Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met Thr Asn Tyr Leu Glu Gln Pro Val
 245 250 255
 Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys Met Val Ala Leu Gly Glu Leu Lys Leu
 260 265 270
 Ala Ala Leu Cys His Gly Glu Asp Ser Ile Thr Ile Pro Tyr Gln Gly
 275 280 285
 Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe Gln Leu Val Lys Leu Gly Val Trp Lys
 290 295 300

 Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser Trp Val Pro Leu Ser Thr Asp Asp Pro
 305 310 315 320
 Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu Ser Ser His Arg Gly Val Ile Ala Asp
 325 330 335
 Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val Pro Thr Thr Arg Thr Asp Asp Lys Leu
 340 345 350
 Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln Gln Ala Cys Lys Gly Lys Ile Gln Ala
 355 360 365

 Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp Ala Pro Leu Lys Asp Asn Arg Ile Pro
 370 375 380
 Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val Asp Leu Ser Leu Thr Val Glu Leu Lys
 385 390 395 400
 Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly Pro Leu Ile Thr His Gly Ser Gly
 405 410 415
 Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His Asn Asn Val Tyr Trp Leu Thr Ile
 420 425 430

 Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu Gly Val Ile Asn Thr Leu Glu Trp
 435 440 445
 Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser Pro Asn Leu Phe Thr Val Pro Ile Lys
 450 455 460
 Glu Ala Gly Glu Asp Cys His Ala Pro Thr Tyr Leu Pro Ala Glu Val
 465 470 475 480
 Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser Ser Asn Leu Val Ile Leu Pro Gly Gln

485 490 495

Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr Tyr Asp Thr Ser Arg Val Glu His

500 505 510

Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Gly Arg Ser Phe Ser Tyr Phe

515 520 525

Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val Pro Ile Glu Leu Gln Val

530 535 540

Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp Cys Arg His Phe Cys Val

545 550 555 560

Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile Thr His Ser Gly Met Val

565 570 575

Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg Glu Asp Gly Thr Asn Arg

580 585 590

Arg

<210> 316

<211> 477

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: hGH polyA

<400> 316

gggtggcatc cctgtgaccc ctccccagtg cctctcctgg ccctggaagt tgccactcca 60

gtgcccacca gccttgtcct aataaaatta agttgcatca ttttgtctga ctagggtgcc 120

ttctataata ttatgggggtg gaggggggtg gtatggagca aggggcaagt tgggaagaca 180

acctgtaggg cctgcgggggt ctgttgggaa ccaagctgga gtgcagtggc acaatcttgg 240

ctcactgcaa tcctcgctc ctgggttcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcccagttg 300

ttgggattcc aggcattgat gaccaggtc agctaatttt tgtttttttg gtagagacgg 360

ggtttcacca tattggccag gctgtgtctc aactcctaata ctcaggtgat ctaccacct 420

tggcctccca aattgctggg attacaggcg tgaaccactg ctcccttccc tgtcctt 477

<210> 317

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: SPA1

<400> 317

aataaaagat cttatatttc attagatctg tgtgttggtt ttttgtgtg 49

<210> 318

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: SPA2

<400> 318

aataaaatat ctcagagctc tagacatctg tgtgttggtt ttttgtgtg agtaatgagg 60

atctggagat attgaagtat cttccggacg actaacagct gtcattggcg gatcttaata 120

<210> 319

<211> 295

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: b-globin polyA spacer B

<400> 319

atctcaagag tggcagcggc cttgagtggc agcggcggta tacggcagcg gcatgtaact 60

agctcctcag tggcagcgat gaggaggcaa taaaggaaat tgattttcat tgcaatagtg 120

tggttgaatt ttttgtgtct ctcaagggtc tgtaagtaa ctgaaccaa tgcgttagt 180

gacgcttagc tcttaagagg tcaactgacct aacaatctca agagtggcag cggctcttag 240

tggcagcggc ggtatacggc agcgtatct aagtagtaac aagtagcgtg gggca 295

<210> 320

<211> 512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: b-globin polyA spacer A

<400> 320

acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 60

ctacacttgc cagcgcctta gcgcccgctc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca 120

cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccttttaggg ttccgattta 180

gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggtaa taaaggaaat 240
 tgattttcat tgcaatagtg tgttggaatt tttgtgtct ctcacacgta gtgggccatc 300
 gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgtttctcg atagtggact 360
 ctgtttccaa acitggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg attataaagg 420

gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc 480
 gaattttaac aaaatattaa cgcttagaat tt 512

<210> 321

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 250 cHS4 insulator v1

<400> 321

gagctcacgg ggacagcccc ccccaaaagc ccccagggat gtaattacgt ccttcccccg 60
 ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc 120
 ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgtgc tctttgagcc tgcagacacg tggggggata cggggaaaag 240
 ctt 243

<210> 322

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 250 cHS4 insulator v2

<400> 322

gagctcacgg ggacagcccc ccccaaaagc ccccagggat gtaattacgt ccttcccccg 60
 ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc 120
 ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgtgc tctttgagcg tgcagacacg tggggggata cggggaaaag 240
 ctt 243

<210> 323

<211> 650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 650 cHS4 insulator

<400> 323

gagctcacgg ggacagcccc cccccaaagc ccccagggat gtaattacgt ccctcccccg	60
ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc	120
ccgagccggc agcgtgcggg gacagccccg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc	180
ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagca tgcagacaca tggggggata cggggaaaaa	240
gcttttagct ctgcatgttt gatggtgtat ggatgcaagc agaaggggtg gaagagcttg	300
cctggagaga tacagctggg tcagtaggac tgggacaggc agctggagaa ttgccatgta	360
gatgttcata caatcgtaa atcatgaagg ctggaaaagc cctccaagat ccccaagacc	420
aacccaacc caccagcgt gccactggc catgtccctc agtgccacat cccacagtt	480
cttcatcacc tccaggagc gtgaccccc cacctccgtg ggcagctgtg ccaactgcagc	540
accgctcttt ggagaagata aatcttgcta aatccagccc gacctcccc tggcacaaca	600
taaggccatt atctctcatc caactccagg acggagtcag tgagaatatt	650

<210> 324

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 400 cHS4 insulator

<400> 324

gagctcacgg ggacagcccc cccccaaagc ccccagggat gtaattacgt ccctcccccg	60
ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc	120
ccgagccggc agcgtgcggg gacagccccg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc	180
ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagca tgcagacaca tggggggata cggggaaaaa	240
gcttttagct gaaagagaga tttagaatga cagaatcata gaacggcctg ggttgcaaag	300
gagcacagtg ctcatccaga tccaaccccc tgctatgtgc agggtcacat accagcagcc	360
caggctgccc agagccacat ccagcctggc cttgaatgcc tgcagggatg gggcatccac	420

<210> 325

<211> 949

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 650 cHS4 insulator and b-globin polyA spacer B

<400> 325

gagctcacgg ggacagcccc ccccaaaagc cccaggggat gtaattacgt ccctcccccg 60
ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc 120
ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180
ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagca tgcagacaca tggggggata cggggaaaaa 240

gctttaggct ctgcatgttt gatgtgtat ggatgcaagc agaaggggtg gaagagcttg 300
cctggagaga tacagctggg tcagtaggac tgggacaggc agctggagaa ttgcatgta 360
gatgttcata caatcgtaa atcatgaagg ctggaaaagc cctccaagat cccaagacc 420
aaccaccaacc caccagcgt gccactggc catgtccctc agtgccacat cccacagtt 480
cttcatcacc tccagggacg gtgaccccc cactccgtg ggacgtgtg cactgcagc 540
accgctcttt ggagaagata aatcttgcta aatccagccc gaccctccc tggcacaaca 600
taagccatt atctctcacc caactccagg acggagtcag tgagaatatt gcgatgcccc 660

acgctacttg ttactactta gatagcgctg ccgtataccg ccgtgccac tcaagaccgc 720
tgccactctt gagattgtta ggtcagtgac ctcttaagag ctaagcgtca ctaacgacat 780
tgggttcagt tacttaacag aaccttgaga gacacaaaaa attccaacac actattgcaa 840
tgaaaataca tttcctttat tgccctctca tcgctgccac tgaggagcta gttacatgcc 900
gctgccgtat accgccgtg ccaactcaaga ccgtgccac tcttgagat 949

<210> 326

<211> 949

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: b-globin polyA spacer B and 650 cHS4 insulator

<400> 326

atctcaagag tggcagcggc cttgagtggc agcggcggta tacggcagcg gcatgtaact 60
agctcctcag tggcagcgat gaggaggcaa taaaggaaat tgattttcat tgcaatagt 120
tggttgaatt ttttgtgtct ctcaagggtc tgtaagtaa ctgaaccaa tgtcgttagt 180
gacgcttagc tcttaagagg tcactgacct aacaatctca agagtggcag cggctctgag 240
tggcagcggc ggtatacggc agcgctatct aagtagtaac aagtagcgtg gggcatcgcg 300
agctcacggg gacagccccc ccccaagcc cccagggatg gtcgtacgtc cctccccgc 360
tagggggcag cagcgagccg cccggggctc cgctccggtc cggcgctccc cccgcatccc 420

cgagccggca gcgtgcgggg acagcccggg cacggggaag gtggcacggg atcgctttcc 480
tctgaacgct tctcgctgct ctttgagcat gcagacacat ggggggatac ggggaaaaag 540

cttttaggctc tgcattgtttg atgggtgtatg gatgcaagca gaaggggtgg aagagcttgc 600
ctggagagat acagctgggt cagtaggact gggacaggca gctggagaat tgccatgtag 660
atgttcatac aatcgtcaaa tcatgaaggc tggaaaagcc ctccaagatc cccaagacca 720
acccaaccc acccagcgtg cccactggcc atgtccctca gtgccacatc cccacagttc 780
ttcatcacct ccagggacgg tgaccccccc acctccgtgg gcagctgtgc cactgcagca 840

ccgctctttg gagaagataa atcttgctaa atccagcccg acctcccct ggcacaacat 900
aaggccatta tcttcatcc aactccagga cggagtcagt gagaatatt 949

<210> 327

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Kozak sequence

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> nnn, if present, is GCC

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> n is A or G

<400> 327

nnngccgccn ccatg 15

<210> 328

<211>

> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Kozak sequence

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> n is T or U

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> n, if present, is G

<400> 328

ccaccangn 9

<210> 329
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Kozak-type sequence 2
 <220><221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n is T or U
 <220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)
 <223> n, if present, is G

<400> 329

ccgccangn

9

<210> 330
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Kozak-type sequence 3
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n is T or U
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n, if present, is G
 <400> 330

gccgccgccca ngn

13

<210> 331
 <211> 13
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Kozak sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> n is T or U
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n, if present, is G
 <400> 331
 gccgccacca ngn 13
 <210> 332
 <211> 12
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Kozak sequence
 <400> 332
 gccgccacca ug 12
 <210>
 > 333
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> SIBR (synthetic inhibitory BIC-derived RNA)
 <400> 333
 ctggaggctt gctgaaggct gtatgctg 28
 <210> 334
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(45)
 <223> 3 microRNA flanking sequence of miR-155
 <400> 334
 caggacacaa ggctgttac tagcactcac atggaacaaa tggcc 45
 <210> 335
 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: synthetic DNA encoding stem

<400> 335

gttttgcca ctgactgac

19

<210> 336

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: VSV-G envelope protein

<400> 336

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn

20 25 30

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp

35 40 45

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

50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp

65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His

85 90 95

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile

100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln

115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln

130 135 140

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val

145 150 155 160

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr

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

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

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

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

 405 410 415

Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
420 425 430
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
435 440 445
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
450 455 460
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
485 490 495
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510
<210> 337
<211> 563
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: Baboon retroviral envelope glycoprotein
<400> 337
Met Gly Phe Thr Thr Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Asn Leu Val Leu Val
1 5 10 15
Tyr Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Glu Leu Val Gln Lys
20 25 30
Arg Tyr Gly Arg Pro Cys Asp Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Pro
35 40 45
Pro Ser Asp Arg Val Ser Gln Val Thr Cys Ser Gly Lys Thr Ala Tyr
50 55 60
Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr
65 70 75 80
Ser Pro Ser Gly Pro Leu Gln Glu Cys Pro Cys Asn Ser Tyr Gln Ser
85 90 95
Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly
100 105 110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly
 115 120 125
 Thr Ser Asp Val Gln Val Leu Gly Ser Thr Asn Lys Leu Ile Gln Ser
 130 135 140
 Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile
 165 170 175
 Lys Ser Val Gln Arg Lys Leu Glu Glu Ile His Lys Ala Leu Tyr Pro
 180 185 190
 Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Ile Pro Lys Val Arg Asp Asn Leu
 195 200 205
 Met Val Asp Ala Gln Thr Leu Asn Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Asn Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Ser Asn Thr Ser Leu Val Asp Asp Cys Trp Leu Cys Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Gly Pro Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Asn Phe Leu Leu Ser
 245 250 255
 Tyr Val Thr Arg Ser Ser Asp Asn Ile Ser Cys Leu Ile Ile Pro Pro
 260 265 270
 Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Phe Ser
 275 280 285
 Pro Ser Tyr Asn Ser Thr Glu Glu Ile Asp Leu Gly His Val Ala Phe
 290 295 300
 Ser Asn Cys Thr Ser Ile Thr Asn Val Thr Gly Pro Ile Cys Ala Val
 305 310 315 320
 Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu
 325 330 335
 Pro Thr Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Leu Ala Thr Leu Leu Pro Asp
 340 345 350
 Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp

355 360 365
His Phe Ile Tyr Arg Pro Lys Arg Ala Ile Gln Phe Ile Pro Leu Leu

370 375 380
Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu

385 390 395 400
Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ile Ser

405 410 415
Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val

420 425 430
Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu

435 440 445
Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys

450 455 460
Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr

465 470 475 480
Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro

485 490 495
Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Phe Leu

500 505 510
Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Thr Ile Gly Pro Cys Ile

515 520 525
Phe Asn Arg Leu Thr Ala Phe Ile Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ile His

530 535 540
Ala Met Val Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Val Leu Arg Thr Asp Glu Glu

545 550 555 560
Ala Gln Asp

<210> 338

<211> 654

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MuLV envelope protein

<400> 338

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

1 5 10 15

Trp Lys Pro Leu Ile Val Met Gly Val Leu Leu Gly Val Gly Met Ala

20 25 30

Glu Ser Pro His Gln Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu

35 40 45

Met Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln

50 55 60

Asp Ala Phe Pro Lys Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu

65 70 75 80

Glu Trp Asp Pro Ser Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys

85 90 95

Tyr Pro Ala Gly Arg Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys

100 105 110

Pro Gly His Thr Val Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ser Ser Trp Asp Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn

180 185 190

Pro Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp

195 200 205

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

210 215 220

Ile Thr Met Phe Ser Leu Thr Arg Gln Val Leu Asn Val Gly Pro Arg

225 230 235 240

Val Pro Ile Gly Pro Asn Pro Val Leu Pro Asp Gln Arg Leu Pro Ser
245 250 255

Ser Pro Ile Glu Ile Val Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ser Pro Leu Asn
260 265 270

Thr Ser Tyr Pro Pro Ser Thr Thr Ser Thr Pro Ser Thr Ser Pro Thr
275 280 285

Ser Pro Ser Val Pro Gln Pro Pro Gly Thr Gly Asp Arg Leu Leu
290 295 300

Ala Leu Val Lys Gly Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Asn Pro Asp
305 310 315 320

Lys Thr Gln Glu Cys Trp Leu Cys Leu Val Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr
325 330 335

Glu Gly Val Ala Val Val Gly Thr Tyr Thr Asn His Ser Thr Ala Pro
340 345 350

Ala Asn Cys Thr Ala Thr Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val
355 360 365

Thr Gly Gln Gly Leu Cys Met Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala
370 375 380

Leu Cys Asn Thr Thr Gln Ser Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
385 390 395 400

Ala Pro Ala Gly Thr Met Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys
405 410 415

Leu Ser Thr Thr Val Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val
420 425 430

Glu Leu Trp Pro Arg Val Ile Tyr His Ser Pro Asp Tyr Met Tyr Gly
435 440 445

Gln Leu Glu Gln Arg Thr Lys Tyr Lys Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr
450 455 460

Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly
465 470 475 480

Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Ile Lys Thr Gln Gln Phe Glu Gln

485 490 495
 Leu His Ala Ala Ile Gln Thr Asp Leu Asn Glu Val Glu Lys Ser Ile
 500 505 510
 Thr Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln

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

580 585 590
 Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile
 595 600 605
 Val Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu
 610 615 620
 Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu
 625 630 635 640
 Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro

645 650
 <210> 339
 <211> 545
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: Baboon retroviral envelope glycoprotein -delta-R (HA)
 <400> 339

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

Arg Tyr Gly Arg Pro Cys Asp Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Pro

35 40 45

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

50 55 60

Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly

100 105 110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala

145 150 155 160

Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile

165 170 175

Lys Ser Val Gln Arg Lys Leu Glu Glu Ile His Lys Ala Leu Tyr Pro

180 185 190

Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Ile Pro Lys Val Arg Asp Asn Leu

195 200 205

Met Val Asp Ala Gln Thr Leu Asn Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Asn Leu

210 215 220

Leu Leu Met Ser Asn Thr Ser Leu Val Asp Asp Cys Trp Leu Cys Leu

225 230 235 240

Lys Leu Gly Pro Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Asn Phe Leu Leu Ser

245 250 255

Tyr Val Thr Arg Ser Ser Asp Asn Ile Ser Cys Leu Ile Ile Pro Pro

260 265 270

Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Phe Ser

275 280 285
Pro Ser Tyr Asn Ser Thr Glu Glu Ile Asp Leu Gly His Val Ala Phe

290 295 300
Ser Asn Cys Thr Ser Ile Thr Asn Val Thr Gly Pro Ile Cys Ala Val
305 310 315 320
Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu
325 330 335
Pro Thr Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Leu Ala Thr Leu Leu Pro Asp
340 345 350
Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp

355 360 365
His Phe Ile Tyr Arg Pro Lys Arg Ala Ile Gln Phe Ile Pro Leu Leu
370 375 380
Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu
385 390 395 400
Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ile Ser
405 410 415
Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val

420 425 430
Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu
435 440 445
Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys
450 455 460
Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr
465 470 475 480
Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro

485 490 495
Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Phe Leu
500 505 510
Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Gly Pro Cys Ile
515 520 525

Phe Asn Arg Leu Thr Ala Phe Ile Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ile His

530

535

540

Ala

545

<210> 340

<211> 546

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Baboon retroviral envelope glycoprotein -delta-R (HAM)

<400> 340

Met Gly Phe Thr Thr Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Asn Leu Val Leu Val

1

5

10

15

Tyr Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Glu Leu Val Gln Lys

20

25

30

Arg Tyr Gly Arg Pro Cys Asp Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Pro

35

40

45

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

50

55

60

Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr

65

70

75

80

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

85

90

95

Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly

100

105

110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly

115

120

125

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

130

135

140

Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala

145

150

155

160

Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile

165					170					175						
Lys	Ser	Val	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	His	Lys	Ala	Leu	Tyr	Pro	
180					185					190						
Glu	Leu	Gln	Tyr	His	Pro	Leu	Ala	Ile	Pro	Lys	Val	Arg	Asp	Asn	Leu	
195					200					205						
Met	Val	Asp	Ala	Gln	Thr	Leu	Asn	Ile	Leu	Asn	Ala	Thr	Tyr	Asn	Leu	
210					215					220						
Leu	Leu	Met	Ser	Asn	Thr	Ser	Leu	Val	Asp	Asp	Cys	Trp	Leu	Cys	Leu	
225					230					235					240	
Lys	Leu	Gly	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Ala	Ile	Pro	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	
245					250					255						
Tyr	Val	Thr	Arg	Ser	Ser	Asp	Asn	Ile	Ser	Cys	Leu	Ile	Ile	Pro	Pro	
260					265					270						
Leu	Leu	Val	Gln	Pro	Met	Gln	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Cys	Leu	Phe	Ser	
275					280					285						
Pro	Ser	Tyr	Asn	Ser	Thr	Glu	Glu	Ile	Asp	Leu	Gly	His	Val	Ala	Phe	
290					295					300						
Ser	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Thr	Asn	Val	Thr	Gly	Pro	Ile	Cys	Ala	Val	
305					310					315					320	
Asn	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	Cys	Gly	Asn	Asn	Met	Ala	Tyr	Thr	Tyr	Leu	
325					330					335						
Pro	Thr	Asn	Trp	Thr	Gly	Leu	Cys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Pro	Asp	
340					345					350						
Ile	Asp	Ile	Ile	Pro	Gly	Asp	Glu	Pro	Val	Pro	Ile	Pro	Ala	Ile	Asp	
355					360					365						
His	Phe	Ile	Tyr	Arg	Pro	Lys	Arg	Ala	Ile	Gln	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	
370					375					380						
Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Leu	
385					390					395					400	
Gly	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Tyr	Thr	Lys	Leu	Ser	Asn	Gln	Leu	Ile	Ser	
405					410					415						

Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val
420 425 430

Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu
435 440 445

Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys
450 455 460

Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr
465 470 475 480

Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro
485 490 495

Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Phe Leu
500 505 510

Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Thr Ile Gly Pro Cys Ile
515 520 525

Phe Asn Arg Leu Thr Ala Phe Ile Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ile His
530 535 540

Ala Met

545

<210> 341

<211> 905

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Fusion of anti-CD3 scFV from UCHT1 to MuLV envelope

protein

<400> 341

Met Ala Arg Ser Thr Leu Ser Lys Pro Pro Gln Asp Lys Ile Asn Pro
1 5 10 15

Trp Lys Pro Leu Ile Val Met Gly Val Leu Leu Gly Val Gly Asp Ile
20 25 30

Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
35 40 45

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

50	55	60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr		
65	70	75
Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly		80
	85	90
Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp		95
	100	105
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe		110
	115	120
		125
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
130	135	140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly		
145	150	155
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala		160
	165	170
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala		175
	180	185
		190
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly		
195	200	205
Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val		
210	215	220
Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala		
225	230	235
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp		240
	245	250
		255
Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
260	265	270
Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Gly Arg Met Ala Glu Ser Pro His Gln		
275	280	285
Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met Thr Gly Arg Thr		
290	295	300

Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp Ala Phe Pro Lys
305 310 315 320

Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu Trp Asp Pro Ser
325 330 335

Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr Pro Ala Gly Arg
340 345 350

Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Thr Val
355 360 365

Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys Gly Lys Trp Gly
370 375 380

Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr Ser Ser Trp Asp
385 390 395 400

Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp Thr Gly Cys Ser
405 410 415

Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys Val Ser Asn Ser
420 425 430

Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro Leu Val Leu Glu
435 440 445

Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly Pro Lys Ser Trp
450 455 460

Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile Thr Met Phe Ser
465 470 475 480

Leu Thr Arg Gln Val Leu Asn Val Gly Pro Arg Val Pro Ile Gly Pro
485 490 495

Asn Pro Val Leu Pro Asp Gln Arg Leu Pro Ser Ser Pro Ile Glu Ile
500 505 510

Val Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Pro Pro
515 520 525

Ser Thr Thr Ser Thr Pro Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Ser Val Pro
530 535 540

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

545 550 555 560
 Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Asn Pro Asp Lys Thr Gln Glu Cys
 565 570 575

 Trp Leu Cys Leu Val Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Val Ala Val
 580 585 590
 Val Gly Thr Tyr Thr Asn His Ser Thr Ala Pro Ala Asn Cys Thr Ala
 595 600 605
 Thr Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val Thr Gly Gln Gly Leu
 610 615 620
 Cys Met Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Thr Thr
 625 630 635 640

 Gln Ser Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala Ala Pro Ala Gly Thr
 645 650 655
 Met Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser Thr Thr Val
 660 665 670
 Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val Glu Leu Trp Pro Arg
 675 680 685
 Val Ile Tyr His Ser Pro Asp Tyr Met Tyr Gly Gln Leu Glu Gln Arg
 690 695 700

 Thr Lys Tyr Lys Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu
 705 710 715 720
 Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr
 725 730 735
 Thr Ala Leu Ile Lys Thr Gln Gln Phe Glu Gln Leu His Ala Ala Ile
 740 745 750
 Gln Thr Asp Leu Asn Glu Val Glu Lys Ser Ile Thr Asn Leu Glu Lys
 755 760 765

 Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu
 770 775 780
 Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu
 785 790 795 800

Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met

805 810 815

Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Thr

820 825 830

Gly Gln Gly Trp Phe Glu Gly Leu Phe Asn Arg Ser Pro Trp Phe Thr

835 840 845

Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile Val Leu Leu Leu Ile

850 855 860

Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys

865 870 875 880

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

885 890 895

Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro

900 905

<210> 342

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Kozak-type sequence

<400> 342

gccgccacc 9

<210> 343

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: triple stop sequence

<400> 343

taatagtga 9

<210> 344

<211> 191

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: WPRE

<400> 344

gtcctttcca tggtgctcg cctgtgttg cactggatt ctgcgcggga cgtccttctg 60
ctacgtccct tcggccctca atccagcgga ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct 120
gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgcc tcagacgagt cggatctccc ttggggccgc 180
ctccccgct g 191

<210> 345

<211> 654

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MuLVSUx

<400> 345

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

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

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

130	135	140
Thr	Ser	Ser
Trp	Asp	Leu
Ile	Ser	Leu
Lys	Arg	Gly
Asn	Thr	Pro
Trp		
145	150	155
160		

Asp Thr Gly Cys Ser Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser
 165 170 175
 Lys Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn
 180 185 190
 Pro Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp
 195 200 205
 Gly Pro Lys Ser Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro
 210 215 220
 Ile Thr Met Phe Ser Leu Thr Arg Gln Val Leu Asn Val Gly Pro Arg
 225 230 235 240
 Val Pro Ile Gly Pro Asn Pro Val Leu Pro Asp Gln Arg Leu Pro Ser
 245 250 255
 Ser Pro Ile Glu Ile Val Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ser Pro Leu Asn
 260 265 270
 Thr Ser Tyr Pro Pro Ser Thr Thr Ser Thr Pro Ser Thr Ser Pro Thr
 275 280 285
 Ser Pro Ser Val Pro Gln Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Arg Leu Leu
 290 295 300
 Ala Leu Val Lys Gly Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Asn Pro Asp
 305 310 315 320
 Lys Thr Gln Glu Cys Trp Leu Cys Leu Val Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr
 325 330 335
 Glu Gly Val Ala Val Val Gly Thr Tyr Thr Asn His Ser Thr Ala Pro
 340 345 350
 Ala Asn Cys Thr Ala Thr Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val
 355 360 365
 Thr Gly Gln Gly Leu Cys Met Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala
 370 375 380
 Leu Cys Asn Thr Thr Gln Ser Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
 385 390 395 400
 Ala Pro Ala Gly Thr Met Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys

405 410 415
 Leu Ser Thr Thr Val Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val
 420 425 430
 Glu Leu Trp Pro Arg Val Ile Tyr His Ser Pro Asp Tyr Met Tyr Gly
 435 440 445
 Gln Leu Glu Gln Arg Thr Ile Glu Gly Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr

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

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

 580 585 590
 Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile
 595 600 605
 Val Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu
 610 615 620
 Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu
 625 630 635 640
 Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro

 645 650

<210> 346

<211> 905

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: UMuLVSUx

<400> 346

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

1 5 10 15

Trp Lys Pro Leu Ile Val Met Gly Val Leu Leu Gly Val Gly Asp Ile

20 25 30

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

35 40 45

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

50 55 60

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp

100 105 110

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala

180 185 190

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly

195 200 205

Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
 210 215 220
 Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 225 230 235 240

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
 245 250 255
 Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 260 265 270
 Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Gly Arg Met Ala Glu Ser Pro His Gln
 275 280 285
 Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met Thr Gly Arg Thr
 290 295 300

Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp Ala Phe Pro Lys
 305 310 315 320
 Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu Trp Asp Pro Ser
 325 330 335
 Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr Pro Ala Gly Arg
 340 345 350
 Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Thr Val
 355 360 365

Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys Gly Lys Trp Gly
 370 375 380
 Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr Ser Ser Trp Asp
 385 390 395 400
 Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp Thr Gly Cys Ser
 405 410 415
 Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys Val Ser Asn Ser
 420 425 430

Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro Leu Val Leu Glu
 435 440 445
 Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly Pro Lys Ser Trp

450 455 460
 Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile Thr Met Phe Ser
 465 470 475 480
 Leu Thr Arg Gln Val Leu Asn Val Gly Pro Arg Val Pro Ile Gly Pro
 485 490 495

 Asn Pro Val Leu Pro Asp Gln Arg Leu Pro Ser Ser Pro Ile Glu Ile
 500 505 510
 Val Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Pro Pro
 515 520 525
 Ser Thr Thr Ser Thr Pro Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Ser Val Pro
 530 535 540
 Gln Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Arg Leu Leu Ala Leu Val Lys Gly
 545 550 555 560

 Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Asn Pro Asp Lys Thr Gln Glu Cys
 565 570 575
 Trp Leu Cys Leu Val Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Val Ala Val
 580 585 590
 Val Gly Thr Tyr Thr Asn His Ser Thr Ala Pro Ala Asn Cys Thr Ala
 595 600 605
 Thr Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val Thr Gly Gln Gly Leu
 610 615 620

 Cys Met Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Thr Thr
 625 630 635 640
 Gln Ser Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala Ala Pro Ala Gly Thr
 645 650 655
 Met Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser Thr Thr Val
 660 665 670
 Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val Glu Leu Trp Pro Arg
 675 680 685

 Val Ile Tyr His Ser Pro Asp Tyr Met Tyr Gly Gln Leu Glu Gln Arg
 690 695 700

Thr Ile Glu Gly Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu
705 710 715 720
Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr
725 730 735
Thr Ala Leu Ile Lys Thr Gln Gln Phe Glu Gln Leu His Ala Ala Ile
740 745 750

Gln Thr Asp Leu Asn Glu Val Glu Lys Ser Ile Thr Asn Leu Glu Lys
755 760 765
Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu
770 775 780
Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu
785 790 795 800
Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met
805 810 815

Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Thr
820 825 830
Gly Gln Gly Trp Phe Glu Gly Leu Phe Asn Arg Ser Pro Trp Phe Thr
835 840 845
Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile Val Leu Leu Leu Ile
850 855 860
Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys
865 870 875 880

Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His
885 890 895
Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro
900 905
<210> 347
<211> 770
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: UCHT1-(G4S)3-VSVG
<400> 347

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

245 250 255
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Ser Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn

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

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

405 410 415
 Glu Trp Val Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile
 420 425 430
 Cys Pro Thr Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val
 435 440 445
 Lys Gly Leu Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe
 450 455 460
 Ser Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe

465 470 475 480
 Arg Ser Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met
 485 490 495

Gln Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe
500 505 510

Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys
515 520 525

Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val
530 535 540

Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln
545 550 555 560

Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp
565 570 575

Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr
580 585 590

Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val
595 600 605

Asp Ile Ala Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly
610 615 620

Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp
625 630 635 640

Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys
645 650 655

Phe Pro Leu Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His
660 665 670

Leu Ser Ser Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala
675 680 685

Ala Ser Gln Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly
690 695 700

Leu Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp
705 710 715 720

Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly
725 730 735

Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys

740 745 750
His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu
755 760 765

Gly Lys

770

<210> 348

<211> 767

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: UCHT1-hinge-VSVG

<400> 348

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1 5 10 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

20 25 30
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr

35 40 45
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

50 55 60
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

85 90 95
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

100 105 110
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

130 135 140
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

145 150 155 160
Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg

165 170 175
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr
 180 185 190
 Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile
 195 200 205
 Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 210 215 220
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 245 250 255
 Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
 275 280 285
 Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp
 290 295 300
 His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln Val Lys Met Pro Lys Ser
 305 310 315 320
 His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
 325 330 335
 Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
 340 345 350
 Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
 355 360 365
 Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
 370 375 380
 Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln
 385 390 395 400
 Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
 405 410 415

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
 420 425 430
 Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
 435 440 445
 Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
 450 455 460
 Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
 465 470 475 480
 Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
 485 490 495
 Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
 500 505 510
 Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly
 515 520 525
 Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile
 530 535 540
 Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp
 545 550 555 560
 Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
 565 570 575
 Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn
 580 585 590
 Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
 595 600 605
 Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
 610 615 620
 Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
 625 630 635 640
 Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
 645 650 655
 Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser

660 665 670
 Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
 675 680 685
 Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
 690 695 700
 Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser

 705 710 715 720
 Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
 725 730 735
 Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
 740 745 750
 Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 755 760 765

<210> 349

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker

<400> 349

Gly Ser Thr Ser Gly Ser

1 5

<210> 350

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: EF1a

<400> 350

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60
 ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120
 gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180
 gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240
 gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300

acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360
gagagttcga ggcttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttagt tgaggcctgg 420
cctgggcgct ggggccgccc cgtgcgaatc tggcggcacc ttcgcgcctg tctcgtctgt 480
ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg ctgcgacgct ttttttctgg 540
caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc 600
gcggggcgcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660
gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct 720

ggcctcgcgc cgcctgtat cgcgccccc tgggcggcaa ggctggccc gtcggcacca 780
gttgcgtgag cggaaagatg gcccttccc ggccctgctg caggagctc aaaatggagg 840
acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag taccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900
tcctcagccg tcgcttcagt tgactccact gattaccggg cgcctccag gcacctgat 960
tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg 1020
gagtttccc acactgagt ggtggagact gaagttaggc cagcttgca cttgatgtaa 1080
ttctccttgg aatttgcct ttttaggtt ggatcttgg tcatctcaa gcctcagaca 1140

gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtga 1179

<210> 351

<211> 511

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: PGK

<400> 351

ggggttgggg ttgcgccttt tccaaggcag ccctgggttt gcgcaggac gcggtgctc 60
tggcggtgtt tccgggaaac gcagcggcgc cgacctggg tctcgacat tcttcacgtc 120
cgttcgcagc gtcaccgga tcttcgccgc tacccttggt gggcccccg cgacgttcc 180
tgctccgcc ctaagtccgg aaggttctt gcggttcgcg gcgtgccgga cgtgacaaac 240
ggaagccgca cgtctacta gtaccctcgc agacggacag cgccaggag caatggcagc 300

gcgccgaccg cgatgggctg tggccaatag cgctgctca gcggggcgcg ccgagagcag 360
cgcccgga gggcggtgc gggaggcggg gtgtggggcg gtagtgtggg ccctgttctt 420
gcccgcgcgg tggtccgat tctgaagcc tccggagcgc acgtcggcag tcggctccct 480
cgttgaccga atcaccgacc tcttccccca g 511

<210> 352

<211> 30

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 1x NFAT
 <400> 352
 ggaggaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 30
 <210> 353
 <211
 > 372
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 6X NFAT
 <400> 353
 ataagcttga tatcgaatta ggaggaaaa ctgtttcata cagaaggcgt caattaggag 60
 gaaaaactgt ttcatacaga aggcgtcaat taggaggaaa aactgtttca tacagaaggc 120
 gtcaattggt cccatcgaat taggaggaaa aactgtttca tacagaaggc gtcaattagg 180
 aggaaaaact gtttcataca gaaggcgtca attaggagga aaaactgttt catacagaag 240
 gcgtcaattg gtcccgggac attttgacac ccccataata tttttccaga attaacagta 300
 taaattgcat ctcttggtca agagtccct atcactctct taaatcacta ctcatagtaa 360
 cctcaactcc tg 372
 <210> 354
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: minIL2P
 <400> 354
 cattttgaca ccccataat atttttccag aattaacagt ataaattgca tctcttggtc 60
 aagagtccc tatcactctc ttaaactact actcatagta acctcaactc ctga 114
 <210> 355
 <211> 373
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: 6X NFAT-minIL2P
 <400> 355

ataagcttga tatcgaatta ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt caattaggag 60

gaaaaactgt ttcatacaga aggcgtcaat taggaggaaa aactgtttca tacagaaggc 120

gtcaattggt cccatcgaat taggaggaaa aactgtttca tacagaaggc gtcaattagg 180

aggaaaaact gtttcataca gaaggcgtca attaggagga aaaactgttt catacagaag 240

gcgtcaattg gtcccgggac attttgacac ccccataata tttttccaga attaacagta 300

taaattgcat ctcttggtca agagtccct atcactctct taaatcacta ctcatagtaa 360

cctcaactcc tga 373

<210> 356

<211> 295

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: b-globin polyA spacer B

<400> 356

atctcaagag tggcagcggc cttgagtggc agcggcggta tacggcagcg gcatgtaact 60

agctcctcag tggcagcgat gaggaggcaa taaaggaaat tgattttcat tgcaatagt 120

tggttggaatt ttttgtgtct ctcaagggtc tgtaagtaa ctgaaccaa tgtcgttagt 180

gacgcttagc tttaagagg tcactgacct aacaatctca agagtggcag cggctcttag 240

tggcagcggc ggtatacggc agcgtatct aagtagtaac aagtagcgtg gggca 295

<210> 357

<211> 512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: b-globin polyA spacer A

<400> 357

acgcgcctg tagcggcgca ttaagcggc cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 60

ctacacttgc cagcgccta gcgccgctc ctttcgcttt cttcccttc tttctcgcca 120

cgttcgccgg ctttcccggt caagctctaa atcgggggct ccttttaggg ttccgattta 180

gtgctttacg gcacctgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttaa taaaggaaat 240

tgattttcat tgcaatagtg tggttggaatt ttttgtgtct ctcacacgta gtgggccatc 300

gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttcg atagtggact 360

cttggttcaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg 420

gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc 480

gaattttaac aaaatattaa cgcttagaat tt 512

<210> 358

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 250 cHS4 insulator v1

<400> 358

gagctcacgg ggacagcccc cccccaaagc cccagggat gtaattacgt ccctcccccg 60

ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc 120

ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagcc tgcagacacg tggggggata cggggaaaag 240

ctt 243

<210> 359

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 250 cHS4 insulator v2

<400> 359

gagctcacgg ggacagcccc cccccaaagc cccagggat gtaattacgt ccctcccccg 60

ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc 120

ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagcg tgcagacacg tggggggata cggggaaaag 240

ctt 243

<210> 360

<211> 650

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 650 cHS4 insulator

<400> 360

gagctcacgg ggacagcccc cccccaaagc cccagggat gtaattacgt ccctcccccg 60

ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc ccccgcatcc 120

ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgtgc tctttgagca tgcagacaca tggggggata cggggaaaaa 240

gcttttaggt ctgcatgttt gatggtgtat ggatgcaagc agaaggggtg gaagagcttg 300

cctggagaga tacagctggg tcagtaggac tgggacaggc agctggagaa ttgcatgta 360

gatgttcata caatcgtcaa atcatgaagg ctggaaaagc cctccaagat cccaagacc 420

aacccaacc caccagcgt gccactggc catgtccctc agtgccacat cccacagtt 480

cttcacacc tccaggagc gtgaccccc cacctccgtg ggagctgtg cactgcagc 540

accgctcttt ggagaagata aatcttgcta aatccagccc gaccctccc tggcacaaca 600

taaggccatt atctctcatc caactccagg acggagtcag tgagaatatt 650

<210> 361

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 400 cHS4 insulator

<400> 361

gagctcacgg ggacagcccc ccccaaagc cccagggat gtaattacgt ccctccccg 60

ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc cccgcatec 120

ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgtgc tctttgagca tgcagacaca tggggggata cggggaaaaa 240

gcttttaggt gaaagagaga tttagaatga cagaatcata gaacggcctg ggttgcaaag 300

gagcacagtg ctcatccaga tccaaccccc tgctatgtgc agggctatca accagcagcc 360

caggtgccc agagccacat ccagcctggc cttgaatgcc tgcagggatg gggcatccac 420

<210> 362

<211> 949

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: 650 cHS4 insulator and b-globin polyA spacer B

<400> 362

gagctcacgg ggacagcccc ccccaaagc cccagggat gtaattacgt ccctccccg 60

ctagggggca gcagcgagcc gcccggggct ccgctccggt ccggcgctcc cccgcatec 120

ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgctttc 180

ctctgaacgc ttctcgctgc tctttgagca tgcagacaca tggggggata cggggaaaaa 240
gcttttagct ctgcatgttt gatggtgtat ggatgcaagc agaaggggtg gaagagcttg 300
cctggagaga tacagctggg tcagtaggac tgggacaggc agctggagaa ttgccatgta 360
gatgttcata caatcgtaa atcatgaagg ctggaaaagc cctccaagat cccaagacc 420
aacccaacc caccagcgt gccactggc catgtccctc agtgccacat cccacagtt 480
cttcatcacc tccagggacg gtgaccccc cactccgtg ggcagctgtg cactgcagc 540
accgctcttt ggagaagata aatcttgcta aatccagccc gacctcccc tggcacaaca 600

taagccatt atctctcacc caactccagg acggagtcag tgagaatatt gcgatgcccc 660
acgtactttg ttactactta gatagcgtg ccgtataccg ccgtgccac tcaagaccgc 720
tgccactctt gagattgta ggtcagtgac ctcttaagag ctaagcgtca ctaacgacat 780
tgggttcagt tacttaacag aaccttgaga gacacaaaaa attccaacac actattgcaa 840
tgaaaatcaa tticctttat tgcctcctca tcgtgccac tgaggagcta gttacatgcc 900
gctgccgtat accgccgtg cactcaaga ccgtgccac tcttgagat 949

<210> 363

<211> 949

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: b-globin polyA spacer B and 650 cHS4 insulator

<400> 363

atctcaagag tggcagcgtt cttgagtggc agcggcggta tacggcagcg gcatgtaact 60
agctcctcag tggcagcgat gaggaggcaa taaaggaaat tgattttcat tgcaatagt 120
tgttggaatt ttttgtgtct ctcaaggttc tgttaagtaa ctgaaccaa tgctgttagt 180
gacgcttagc tcttaagagg tcactgacct aacaatctca agagtggcag cggctcttag 240
tggcagcggc ggtatacggc agcgtatct aagtagtaac aagtagctg gggcatcgcg 300
agctcacggg gacagcccc ccccaagcc cccagggatg gtcgtacgtc cctccccgc 360

tagggggcag cagcgagccg cccggggctc cgctccggtc cggcgctccc cccgcatccc 420
cgagccggca gcgtgccccg acagccccggg cacggggaag gtggcacggg atcgctttcc 480
tctgaacgtt tctcgctgct ctttgagcat gcagacacat ggggggatac ggggaaaaag 540
ctttaggctc tgcatgtttg atggtgtatg gatgcaagca gaaggggtgg aagagcttgc 600
ctggagagat acagctgggt cagtaggact gggacaggca gctggagaat tgccatgtag 660
atgttcatac aatcgtaaaa tcatgaaggc tggaaaagcc ctccaagatc cccaagacca 720

accccaaccc acccagcgtg ccactggcc atgtccctca gtgccacatc cccacagttc 780

 ttcatcacct ccaggacgg tgaccccccc acctccgtgg gcagctgtgc cactgcagca 840
 ccgctctttg gagaagataa atcttgctaa atccagcccg accctccctt ggcacaacat 900
 aaggccatta tctctcatcc aactccagga cggagtcagt gagaatatt 949
 <210> 364
 <211> 1761
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: E006-T016-S186-S050 eTag
 <400> 364

 atggctctgc ctgtgacagc tctgtctgtg cctctggctc tgcttctgca tgctgctaga 60
 cctagaaaag tgtgcaacgg catcggcatc ggagagttca aggacagcct gagcatcaac 120

 gccaccaaca tcaagcactt caagaactgc accagcatca gcggcgacct gcacattctg 180
 cctgtggcct ttagaggcga cagcttcacc cacacacctc cactggatcc ccaagagctg 240
 gacatcctga aaaccgtgaa agagatcacc ggatttctgt tgatccaggc ttggcccag 300
 aaccggacag atctgcacgc cttcgagaac ctggaaatca tcagaggccg gaccaagcag 360
 cacggccagt tttctctggc tgtggtgtcc ctgaacatca ccagcctggg cctgagaagc 420
 ctgaaagaaa tcagcgacgg cgacgtgatc atctccggca acaagaacct gtgtacgcc 480
 aacaccatca actggaagaa gctgttcggc accagcggcc agaaaacaaa gatcatcagc 540

 aaccggggcg agaacagttg caaggctaca ggccaagtgt gccacgctct gtgtagccct 600
 gaaggctgtt ggggaccga gcctagagat tgcgtgtcct gcagaaacgt gtcccggggc 660
 agagaatcgc tggacaagtg caatctgtct gaaggcgagc cccgcgagtt cgtggaanaa 720
 agcgagtgtc tccagtgtca ccccgagtgt ctccccagg ccatgaacat tacatgtacc 780
 ggcagaggcc ccgacaactg cattcagtgc gccactaca tcgacggccc tactgcgtg 840
 aaaacatgtc ctgtcggcgt gatgggagag aacaacaccc tcgtgtggaa gtatgccgac 900
 gccggacacg tgtgccacct gtgtcacct aattgcacct atggctgtac cggccctggc 960

 ctggaaggct gtccaacaaa cggcctggaa cggatcgccc ggctggaaga gaaagtgaag 1020
 acactgaagg ccagaaacag cgagctggcc tccacagcca acatgtctgag agaacaggtg 1080
 gccagctga agcagaaagt cggcggctct aatctgggca gcgtgtacat ctactgtctg 1140
 ctgatcgtgg gcacactcgt gtgcggaatc gtgctgggct tttcttttgg cggcagcaga 1200
 tggcagttcc ccgtcacta tcggagactg agacacgccc tgtggccatc tctgcccgat 1260

ctgcaccggg tgctgggcca gtatctgaga gataccgccg ctctgtctcc acctaaggcc 1320
accgtgtccg atacatgcga ggaagtggaa ccagcctgc tggaaatcct gccaagagc 1380

agcgagagaa cccctctgcc tctgtgttct agccaggctc agatggacta cgcagactg 1440
cagcctagct gcctgggaac aatgccccig tctgtgtgtc ctcccatggc cgagagcggc 1500
agctgtctga caaccacat tgccaaccac agctacctgc ctctgagcta ctggcagcaa 1560
cctggcggat caaagaaggt ggccaagaag cccaccaaca aggccctca tcctaagcaa 1620
gagcccaag agatcaactt ccccgacgat ctgcccgga gcaatactgc tgctcccggtg 1680
caagaaacc tgacgggtg tcagcccggtg acacaagagg acggcaaaga aagccggatc 1740
agcgtccaag aacggcagta a 1761

<210> 365

<211> 239

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: No Insulator spacer C

<400> 365

atctcaagag tggcagcggc cttgagtggc agcggcggta tacggcagcg gcatgtaact 60
agctcctcag tggcagcgat gaggaggcag gttctgttaa gtaactgaac ccaatgtcgt 120
tagtgacgct tagtctttaa gaggctactg acctaacaat ctcaagagtg gcagcggctc 180
tgagtggcag cggcgggtata cggcagcgct atctaagtag taacaagtag cgtggggca 239

<210> 366

<211> 905

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic: UMuLVSUx

<400> 366

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

1 5 10 15

Trp Lys Pro Leu Ile Val Met Gly Val Leu Leu Gly Val Gly Asp Ile

20 25 30

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

35 40 45

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn

50 55 60
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 85 90 95
 Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 100 105 110
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe
 115 120 125

 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
 180 185 190

 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly
 195 200 205
 Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val
 210 215 220
 Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 225 230 235 240
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp
 245 250 255

 Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 260 265 270
 Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Gly Arg Met Ala Glu Ser Pro His Gln
 275 280 285
 Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met Thr Gly Arg Thr
 290 295 300

Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp Ala Phe Pro Lys
305 310 315 320

Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu Trp Asp Pro Ser
325 330 335

Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr Pro Ala Gly Arg
340 345 350

Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro Gly His Thr Val
355 360 365

Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys Gly Lys Trp Gly
370 375 380

Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr Ser Ser Trp Asp
385 390 395 400

Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp Thr Gly Cys Ser
405 410 415

Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys Val Ser Asn Ser
420 425 430

Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro Leu Val Leu Glu
435 440 445

Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly Pro Lys Ser Trp
450 455 460

Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile Thr Met Phe Ser
465 470 475 480

Leu Thr Arg Gln Val Leu Asn Val Gly Pro Arg Val Pro Ile Gly Pro
485 490 495

Asn Pro Val Leu Pro Asp Gln Arg Leu Pro Ser Ser Pro Ile Glu Ile
500 505 510

Val Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Pro Pro
515 520 525

Ser Thr Thr Ser Thr Pro Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Ser Val Pro
530 535 540

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

545 550 555 560
 Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Leu Thr Asn Pro Asp Lys Thr Gln Glu Cys
 565 570 575

 Trp Leu Cys Leu Val Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Val Ala Val
 580 585 590
 Val Gly Thr Tyr Thr Asn His Ser Thr Ala Pro Ala Asn Cys Thr Ala
 595 600 605
 Thr Ser Gln His Lys Leu Thr Leu Ser Glu Val Thr Gly Gln Gly Leu
 610 615 620
 Cys Met Gly Ala Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Thr Thr
 625 630 635 640

 Gln Ser Ala Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala Ala Pro Ala Gly Thr
 645 650 655
 Met Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser Thr Thr Val
 660 665 670
 Leu Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Cys Val Leu Val Glu Leu Trp Pro Arg
 675 680 685
 Val Ile Tyr His Ser Pro Asp Tyr Met Tyr Gly Gln Leu Glu Gln Arg
 690 695 700

 Thr Ile Glu Gly Arg Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu
 705 710 715 720
 Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr
 725 730 735
 Thr Ala Leu Ile Lys Thr Gln Gln Phe Glu Gln Leu His Ala Ala Ile
 740 745 750
 Gln Thr Asp Leu Asn Glu Val Glu Lys Ser Ile Thr Asn Leu Glu Lys
 755 760 765

 Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu
 770 775 780
 Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu
 785 790 795 800

Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met
805 810 815

Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Thr
820 825 830

Gly Gln Gly Trp Phe Glu Gly Leu Phe Asn Arg Ser Pro Trp Phe Thr
835 840 845

Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile Val Leu Leu Leu Ile
850 855 860

Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys
865 870 875 880

Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His
885 890 895

Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro
900 905

<210> 367

<211> 770

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: UCHT1-(G4S)3-VSVG

<400> 367

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
20 25 30

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
35 40 45

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
50 55 60

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
85 90 95

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

145 150 155 160

Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg

165 170 175

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr

180 185 190

Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile

195 200 205

Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

245 250 255

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

260 265 270

Gly Gly Ser Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn

275 280 285

Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp

290 295 300

Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln Val Lys Met

305 310 315 320

Pro Lys Ser His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala

325 330 335

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

340 345 350
Ile Thr His Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys

355 360 365
Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe

370 375 380
Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val

385 390 395 400
Ile Val Gln Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly

405 410 415
Glu Trp Val Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile

420 425 430
Cys Pro Thr Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val

435 440 445
Lys Gly Leu Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe

450 455 460
Ser Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe

465 470 475 480
Arg Ser Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met

485 490 495
Gln Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe

500 505 510
Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys

515 520 525
Pro Glu Gly Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val

530 535 540
Ser Leu Ile Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln

545 550 555 560
Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp

565 570 575
Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr

580 585 590

Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val

595 600 605

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

610 615 620

Thr Thr Thr Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp

625 630 635 640

Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys

645 650 655

Phe Pro Leu Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His

660 665 670

Leu Ser Ser Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala

675 680 685

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

690 695 700

Leu Ser Lys Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp

705 710 715 720

Lys Ser Ser Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly

725 730 735

Leu Phe Leu Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys

740 745 750

His Thr Lys Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu

755 760 765

Gly Lys

770

<210> 368

<211> 376

<212> PRT

<213> herpes simplex virus 7

<400> 368

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala

1 5 10 15

Ala Arg Ser Arg Gly His Ser Asn Arg Arg Thr Ala Leu Arg Pro Arg

	20						25						30					
Arg	Gln	Gln	Glu	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Leu	Glu	Gln	Lys	Met	Pro	Thr			
35				40				45										
Leu	Leu	Arg	Val	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Gly	Met	Gly	Lys	Thr	Thr			
50				55				60										
Thr	Thr	Gln	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Asp	Asp	Ile	Val	Tyr			
65				70				75				80						
Val	Pro	Glu	Pro	Met	Thr	Tyr	Trp	Gln	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Thr			
85				90				95										
Ile	Ala	Asn	Ile	Tyr	Thr	Thr	Gln	His	Arg	Leu	Asp	Gln	Gly	Glu	Ile			
100				105				110										
Ser	Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Met	Thr	Ser	Ala	Gln	Ile	Thr	Met			
115				120				125										
Gly	Met	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	His	Ile	Gly			
130				135				140										
Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	His	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile			
145				150				155				160						
Phe	Asp	Arg	His	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	Arg			
165				170				175										
Tyr	Leu	Met	Gly	Ser	Met	Thr	Pro	Gln	Ala	Val	Leu	Ala	Phe	Val	Ala			
180				185				190										
Leu	Ile	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Asn	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Leu			
195				200				205										
Pro	Glu	Asp	Arg	His	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Lys	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly			
210				215				220										
Glu	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Met	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Val	Tyr	Gly			
225				230				235				240						
Leu	Leu	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Ser	Trp	Arg			
245				250				255										
Glu	Asp	Trp	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Val	Pro	Pro	Gln	Gly	Ala			
260				265				270										

Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
275 280 285

Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu
290 295 300

Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg
305 310 315 320

Pro Met His Val Phe Val Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys
325 330 335

Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val
340 345 350

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
355 360 365

Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
370 375

<210> 369

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 369

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20 25 30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35 40 45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50 55 60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65 70 75 80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210 215 220

Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln
225 230 235 240

Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys
245 250 255

Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe
260 265 270

Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg
275 280 285

Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp
290 295 300

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His
305 310 315 320

Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr
325 330 335

Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn

				340						345						350			
Gly	Ser	Ala	Gly	Asp	Thr	Trp	Arg	His	Leu	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	Tyr				
		355					360					365							
Gln	Pro	Glu	His	Ile	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Glu	Ala	Cys	Pro	Val	Arg				
	370					375					380								
Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Trp	Ala	Thr	Gln	Asp	Ser	Ala	Thr	Leu	Asp	Ala				
385					390					395					400				
Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Arg	Ile	Gln	Arg	Ala	Asp	Leu	Val	Glu	Ser				
				405					410					415					
Leu	Cys	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Pro	Val									
			420				425												
<210>	370																		
<211>	297																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	370																		
Met	Thr	Thr	Pro	Arg	Asn	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Glu	Pro				
1				5				10						15					
Met	Lys	Gly	Pro	Ile	Ala	Met	Gln	Ser	Gly	Pro	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg				
			20				25						30						
Arg	Met	Ser	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Phe	Phe	Met	Arg	Glu				
		35					40					45							
Ser	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Phe	His	Ile				
	50					55					60								
Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ile				
65				70						75					80				
Cys	Val	Thr	Val	Trp	Tyr	Pro	Leu	Trp	Gly	Gly	Ile	Met	Tyr	Ile	Ile				
			85						90					95					
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu				
			100						105					110					
Val	Lys	Gly	Lys	Met	Ile	Met	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Phe	Ala	Ala	Ile				

115 120 125
 Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser
 130 135 140
 His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro
 145 150 155 160
 Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
 165 170 175

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

 Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro
 245 250 255
 Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu Glu
 260 265 270
 Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser
 275 280 285
 Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295
 <210> 371
 <211> 12
 <212> PRT

 <213> Homo sapiens
 <400> 371
 Gly Gln Asn Asp Thr Ser Gln Thr Ser Ser Pro Ser
 1 5 10
 <210> 372
 <211> 654

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: MuLVSUx

<400> 372

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

1 5 10 15

Trp Lys Pro Leu Ile Val Met Gly Val Leu Leu Gly Val Gly Met Ala

20 25 30

Glu Ser Pro His Gln Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu

35 40 45

Met Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln

50 55 60

Asp Ala Phe Pro Lys Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu

65 70 75 80

Glu Trp Asp Pro Ser Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys

85 90 95

Tyr Pro Ala Gly Arg Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys

100 105 110

Pro Gly His Thr Val Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ser Ser Trp Asp Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp

145 150 155 160

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

165 170 175

Lys Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn

180 185 190

Pro Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp

195 200 205

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

210					215					220									
Ile	Thr	Met	Phe	Ser	Leu	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Gly	Pro	Arg				
225					230					235					240				
Val	Pro	Ile	Gly	Pro	Asn	Pro	Val	Leu	Pro	Asp	Gln	Arg	Leu	Pro	Ser				
245					250					255									
Ser	Pro	Ile	Glu	Ile	Val	Pro	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Asn				
260					265					270									
Thr	Ser	Tyr	Pro	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Ser	Thr	Ser	Pro	Thr				
275					280					285									
Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Asp	Arg	Leu	Leu				
290					295					300									
Ala	Leu	Val	Lys	Gly	Ala	Tyr	Gln	Ala	Leu	Asn	Leu	Thr	Asn	Pro	Asp				
305					310					315					320				
Lys	Thr	Gln	Glu	Cys	Trp	Leu	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Pro	Pro	Tyr	Tyr				
325					330					335									
Glu	Gly	Val	Ala	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asn	His	Ser	Thr	Ala	Pro				
340					345					350									
Ala	Asn	Cys	Thr	Ala	Thr	Ser	Gln	His	Lys	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Val				
355					360					365									
Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Cys	Met	Gly	Ala	Val	Pro	Lys	Thr	His	Gln	Ala				
370					375					380									
Leu	Cys	Asn	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Ala				
385					390					395					400				
Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Met	Trp	Ala	Cys	Ser	Thr	Gly	Leu	Thr	Pro	Cys				
405					410					415									
Leu	Ser	Thr	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Thr	Thr	Asp	Tyr	Cys	Val	Leu	Val				
420					425					430									
Glu	Leu	Trp	Pro	Arg	Val	Ile	Tyr	His	Ser	Pro	Asp	Tyr	Met	Tyr	Gly				
435					440					445									
Gln	Leu	Glu	Gln	Arg	Thr	Ile	Glu	Gly	Arg	Glu	Pro	Val	Ser	Leu	Thr				
450					455					460									

Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met Gly Gly Ile Ala Ala Gly
465 470 475 480

Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Ile Lys Thr Gln Gln Phe Glu Gln
485 490 495

Leu His Ala Ala Ile Gln Thr Asp Leu Asn Glu Val Glu Lys Ser Ile
500 505 510

Thr Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln
515 520 525

Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys
530 535 540

Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His Thr Gly Leu
545 550 555 560

Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Asn Gln Arg Gln
565 570 575

Lys Leu Phe Glu Thr Gly Gln Gly Trp Phe Glu Gly Leu Phe Asn Arg
580 585 590

Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Ile Ser Thr Ile Met Gly Pro Leu Ile
595 600 605

Val Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu Asn Arg Leu
610 615 620

Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu
625 630 635 640

Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro
645 650