(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0143634
(43) 공개일자 2022년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2021.08)
A61K 31/352 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7016027
(22) 출원일자(국제) 2020년10월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/055826
(87) 국제공개번호 WO 2021/076788
국제공개일자 2021년04월22일
(30) 우선권주장
62/916,110 2019년10월16일 미국(US)

(71) 출원인
우모자 바이오파마 인코포레이티드
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616
(72) 발명자
샤렌버그 앤드류
미국 98101 워싱턴 시애틀 10 플로어 테리 애비뉴 1920 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인(유한)케이비케이

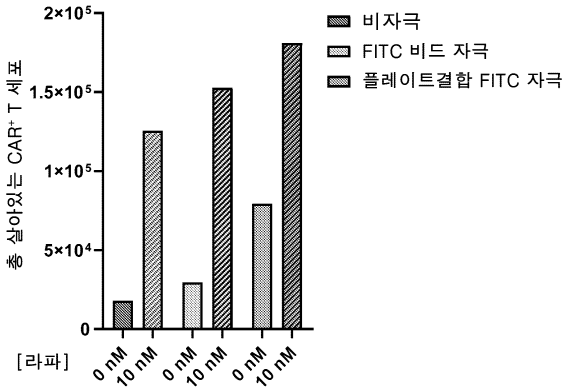
전체 청구항 수 : 총 89 항

(54) 발명의 명칭 **보편적 수용체 요법을 위한 레트로바이러스 벡터**

(57) 요 약

본 개시내용은 합텐-결합 수용체 및 T 세포 활성화 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 레트로바이러스 벡터에 관한 것이다. 레트로바이러스 벡터는 또한 형질도입 인핸서를 포함할 수 있다. 또한, 어댑터 분자와 레트로바이러스 벡터 및 레트로바이러스로 형질도입된 T 세포와 함께 사용하는 것이 개시된다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 47/544 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
A61K 2039/5256 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2740/10045 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 표적화 모이어티 및 합텐을 포함하는 어댑터 분자를 대상체에게 투여하는 단계; 및

(b) (i) 복수의 재조합 레트로바이러스 입자 또는 (ii) 생체외에서 복수의 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하는 방법으로서,

상기 각각의 레트로바이러스 입자는 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 그리고

상기 각각의 레트로바이러스 입자는 바이러스 외피를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역 세포는 T 세포인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 상기 면역 세포에 특이적으로 결합하는 세포-표면 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포-표면 수용체는 다분할 신호전달 복합체를 포함하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 다분할 신호전달 복합체는 브리징 인자 (bridging factor)의 존재 하에 기능적 다분할 신호전달 복합체를 형성하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 하나 이상의 형질도입 인핸서를 포함하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 각각의 형질도입 인핸서는 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체, 또는 공동-자극 분자인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 합텐에 공유 결합된 하나 이상의 차폐 모이어티를 포함하는 차폐 합텐을 포함하는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 상기 합텐으로부터 상기 차폐 모이어티를 제거하기 위한 화학 반응을 허용하도록 구성되는, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 반응성 산소 종(species)이 상기 합텐으로부터 상기 차폐 모이어티를 제거하는 것을 허용하도록 구성되는, 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 하이드록시페닐 기를 포함하는, 방법.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐은 2,4-디니트로페놀 (DNP) 기를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐은 플루오레세인을 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 합텐은 하이드록시페닐 플루오레세인 (HPF)을 포함하는 차폐 합텐인, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 합텐은 플루오레세인-DNP를 포함하는 차폐 합텐인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 인지질 에테르 (PLE)를 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 엽산을 포함하는, 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 PLE에 접합된 HPF를 포함하는, 방법.

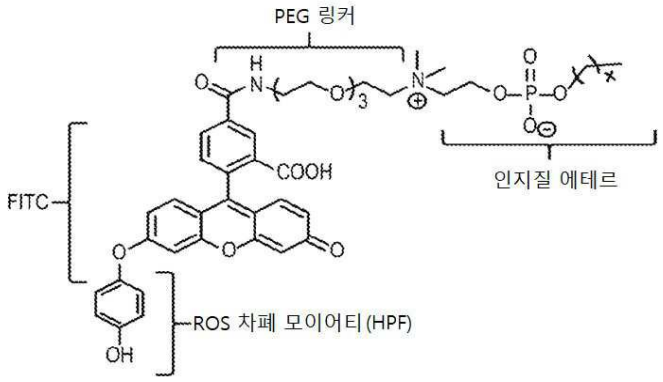
청구항 20

제15항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 HPF-PEG_3-C_{18}-알킬인지질을 포함하는, 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 하기 화학식 I의 분자를 포함하는, 방법:

[화학식 I]



청구항 22

제17항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 HPF-{링커}-에루포신을 포함하는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 코칼 (Cocal) 균주로부터의 바이러스 융합 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 SEQ ID NO: 1 (코칼 G 단백질)과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 바이러스 융합 당단백질을 포함하는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 형질도입 인핸서는 항-CD3scFv, CD86, 및 CD137L 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질도입 인핸서는 항-CD3scFv, CD86, 및 CD137L를 모두 포함하는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질은 이량체 T-세포 활성화제 수용체인, 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질은 제1 이량체화 도메인을 포함하는 제1 수용체 단백질 및 제2 이량체화 도메인을 포함하는 제2 수용체 단백질을 포함하고,

상기 제1 이량체화 도메인 및 상기 제2 이량체화 도메인은 분자에 반응하여 서로에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 분자는 FK1012, 타크로리무스 (FK506), FKCsA, 라파마이신, 쿠메르마이신, 지베렐린, HaXS, TMP-HTag, ABT-737, 및 이들의 기능적 유도체로 이루어진 목록에서 선택되는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 상기 수용체는 항체의 합텐 특이적 항원-결합 단편을 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 항원-결합 단편은 Fab 단편, 단일 쇄 Fv 단편 (scFv) 또는 단일 중쇄 항체를 포함하는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 상기 수용체는 합텐-특이적 키메라 항원 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 합텐-특이적 키메라 항원 수용체는 아미노산 서열 합텐: NN과 적어도 95% 동일한 아미노

산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 T 세포는 상기 레트로바이러스 입자에 의해 형질도입되는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 T 세포는 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 발현하는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 상기 대상체의 암 세포에 특이적으로 결합하고/하거나 암 세포를 표지하는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 상기 대상체에서의 화학 반응에 의해 제거되는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 레트로바이러스 입자에 의해 형질도입된 T 세포는 차폐되지 않은 합텐을 포함하는 암 세포를 특이적으로 사멸시키는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 암을 앓고 있고 상기 방법은 상기 암을 치료하는 것인, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 종양 세포를 사멸시키는, 방법.

청구항 42

(a) 표적화 모이어티 및 차폐 합텐을 포함하는 어댑터 분자; 및

(b) 복수의 재조합 레트로바이러스 입자

를 포함하는 시스템, 치료용 시스템, 또는 조성물로서,

상기 차폐 합텐은 합텐에 결합된 차폐 모이어티를 포함하고,

상기 각각의 레트로바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로:

(i) 5'UTR,

(ii) 프로모터,

(iii) 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및

(iv) 3'UTR

를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

상기 각각의 레트로바이러스 입자는:

(i) 세포-표면 수용체, 및

(ii) 하나 이상의 형질도입 인핸서

를 포함하는 바이러스 외피를 포함하고,

상기 각각의 형질도입 인핸서는 임의로 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체, 및 공동-자극 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템, 치료용 시스템, 또는 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 레트로바이러스 입자는 렌티바이러스 입자인, 시스템.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 상기 면역 세포에 특이적으로 결합하는 세포-표면 수용체를 포함하는, 시스템.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 세포-표면 수용체는 다분할 신호전달 복합체를 포함하는, 시스템.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 다분할 신호전달 복합체는 브리징 인자의 존재 하에 기능적 다분할 신호전달 복합체를 형성하는, 시스템.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 하나 이상의 형질도입 인핸서를 포함하는, 시스템.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 각각의 형질도입 인핸서는 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체, 또는 공동-자극 분자인, 시스템.

청구항 49

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 합텐에 공유 결합된 하나 이상의 차폐 모이어티를 포함하는 차폐 합텐을 포함하는, 시스템.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 상기 합텐으로부터 상기 차폐 모이어티를 제거하기 위한 화학 반응을 허용하도록 구성되는, 시스템.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 반응성 산소 종이 상기 합텐으로부터 상기 차폐 모이어티를 제거하는 것을 허용하도록 구성되는, 시스템.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 하이드록시페닐 기를 포함하는, 시스템.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐은 2,4-디니트로페놀 (DNP) 기를 포함하는, 시스템.

청구항 54

제42항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐은 플루오레세인을 포함하는, 시스템.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 합텐은 하이드록시페닐 플루오레세인 (HPF)을 포함하는 차폐 합텐인, 시스템.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 합텐은 플루오레세인-DNP를 포함하는 차폐 합텐인, 시스템.

청구항 57

제42항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 인-지질 에테르 (PLE)를 포함하는, 시스템.

청구항 58

제42항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 엽산을 포함하는, 시스템.

청구항 59

제57항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 PLE에 접합된 HPF를 포함하는, 시스템.

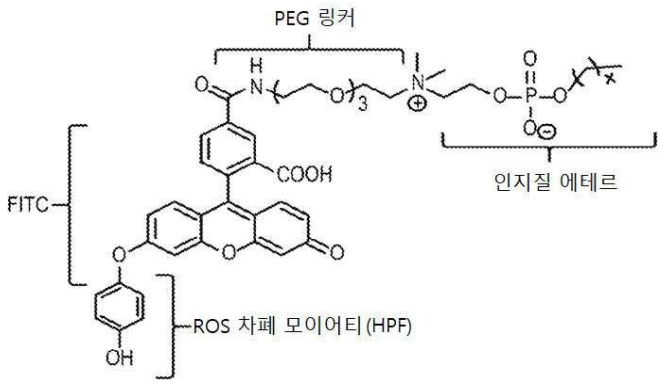
청구항 60

제57항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 HPF-FITC-PEG_3-C_{18}-알킬인지질을 포함하는, 시스템.

청구항 61

제49항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 하기 화학식 I의 분자를 포함하는, 시스템:

[화학식 I]



청구항 62

제57항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 HPF-{링커}-에루포신을 포함하는, 시스템.

청구항 63

제42항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 코칼 균주로부터의 바이러스 융합 단백질 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는, 시스템.

청구항 64

제42항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 SEQ ID NO: 1 (코칼 G 단백질)과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 바이러스 융합 당단백질을 포함하는, 시스템.

청구항 65

제42항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 형질도입 인핸서는 항-CD3scFv, CD86, 및 CD137L 중 하나 이상을 포함하는, 시스템.

청구항 66

제42항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질도입 인핸서는 항-CD3scFv, CD86, 및 CD137L를 모두 포함하는, 시스템.

청구항 67

제42항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는, 시스템.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질은 이량체 T-세포 활성화제 수용체인, 시스템.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질은 제1 이량체화 도메인을 포함하는 제1 수용체 단백질 및 제2 이량체화 도메인을 포함하는 제2 수용체 단백질을 포함하고,

상기 제1 이량체화 도메인 및 상기 제2 이량체화 도메인은 분자에 반응하여 서로에 특이적으로 결합하는, 시스템.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 분자는 FK1012, 타크로리무스 (FK506), FKCsA, 라파마이신, 쿠메르마이신, 지베렐린, HaXS, TMP-HTag, ABT-737, 및 이들의 기능적 유도체로 이루어진 목록에서 선택되는, 시스템.

청구항 71

제42항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 상기 수용체는 항체의 합텐 특이적 항원-결합 단편을 포함하는, 시스템.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 항원-결합 단편은 Fab 단편, 단일 쇄 Fv 단편 (scFv) 또는 단일 중쇄 항체를 포함하는, 시스템.

청구항 73

제42항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 상기 수용체는 합텐-특이적 키메라 항원 수용체를 포함하는, 시스템.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 합텐-특이적 키메라 항원 수용체는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 53과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 시스템.

청구항 75

제42항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 T 세포는 상기 레트로바이러스 입자에 의해 형질도입되는, 시스템.

청구항 76

제42항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 T 세포는 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 발현하는, 시스템.

청구항 77

제42항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 어댑터 분자는 상기 대상체의 암 세포에 특이적으로 결합하고/하거나 암 세포를 표지하는, 시스템.

청구항 78

제42항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 차폐 합텐은 상기 대상체에서의 화학 반응에 의해 제거되는, 시스템.

청구항 79

제42항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 레트로바이러스 입자에 의해 형질도입된 T 세포는 차폐되지 않은 합텐을 포함하는 암 세포를 특이적으로 사멸시키는, 시스템.

청구항 80

제42항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 암을 앓고 있고 상기 방법은 상기 암을 치료하는 것인, 시스템.

청구항 81

제42항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 종양 세포를 사멸시키는, 시스템.

청구항 82

제42항 내지 제81항 중 어느 한 항에 따른 시스템 및 상기 시스템의 사용 지침을 포함하는, 키트.

청구항 83

레트로바이러스 입자로서,

(a) 5'에서 3'순서로:

(i) 5'LTR 또는 UTR,

(ii) 프로모터,

(iii) 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및

(iv) 3'LTR 또는 UTR

을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및

(b) (i) 세포-표면 수용체, 및

(ii) 하나 이상의 형질도입 인핸서

를 포함하는 바이러스 외피

를 포함하는 레트로바이러스 입자이면서,

상기 각각의 형질도입 인핸서는 임의로 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체, 또는 공동-자극 분자인, 레트로바이러스 입자.

청구항 84

표적화 모이어티 및 차폐 합텐을 포함하는 어댑터 분자가 투여되었거나 투여 중이거나 투여될 대상체에서 암 세포를 사멸시키기에 충분한 양의 제83항의 레트로바이러스 입자를 포함하는 치료용 조성물.

청구항 85

대상체의 암을 치료하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 방법으로서,

제83항의 레트로바이러스 입자의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,

상기 투여하는 단계 전, 중, 또는 후에, 상기 대상체는 표적화 모이어티 및 암 세포를 합텐으로 표지하는데 효과적인 차폐 합텐을 포함하는 어댑터 분자의 투여량을 받았거나 받는 중인, 방법.

청구항 86

대상체의 종양을 치료하고/하거나 종양 세포를 사멸시키는 방법으로서,

어댑터 분자의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,

상기 어댑터 분자는 종양 세포를 차폐 합텐으로 표지하고;

상기 차폐 합텐은 활성 산소 종에 의해 활성화되어 합텐을 생성하고; 그리고

상기 투여하는 단계 전, 중, 또는 후에, 상기 대상체는 제83항의 레트로바이러스 입자를 받았거나 받은, 방법.

청구항 87

대상체의 암을 치료하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 방법으로서, 제83항의 레트로바이러스 입자의 치료학적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 투여하는 단계 전에, 상기 대상체는 표적화 모이어티 및 암 세포를 합텐으로 표지하는데 효과적인 차폐 합텐의 투여량을 받은, 방법.

청구항 88

제83항의 레트로바이러스 입자를 생성하도록 구성된 세포주.

청구항 89

대상체의 암을 치료하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 방법으로서, 제42항 내지 제81항 중 어느 한 항의 시스템을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2019년 10월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 제62/916,110호의 우선권 및 이익을 주장하며, 그 내용은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원에는 EFS-Web을 통해 ASCII 형식으로 제출된 서열 목록이 포함되어 있으며, 그 전체가 참조로 본원에 포함된다. 2020년 10월 15일에 생성된 ASCII 사본의 이름은 "UMOJ-003-01WO_SeqList_ST25.txt"이며 크기는 72 KB이다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 개시내용은 형질도입 인핸서, 합성 T 세포 활성화 수용체, 및/또는 합텐-결합 수용체를 암호화하는 바이러스 벡터, 이를 포함하는 조성물, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 바이러스 벡터와 함께 사용하기 위해 합텐을 포함하는 어댑터 분자의 용도에 관한 것이다. 개시된 조성물 및 방법은 질환, 예를 들어 암을 치료하는 데 유용할 수 있다.

배 경 기 술

[0007] 키메라 항원 수용체 (CAR)는 입양 세포 면역요법에 사용하기 위해 T 세포를 유전적으로 조작하는데 사용되는 조작된 수용체이다 (문헌 [Pule et al., *Cytother.* 5:3, 2003; Restifo et al., *Nat. Rev. Immunol.* 12:269, 2012] 참고). 이들 수용체는 가장 일반적으로 CD3 단독 또는 하나 이상의 공동 자극 도메인과 조합된 세포내 신호전달 성분에 연결된 세포외 리간드 결합 도메인, 가장 일반적으로 단일클론 항체의 단일 쇄 가변 단편 (scFv)을 포함한다. 항원 결합은 CAR의 세포내 세그먼트에서 신호 전달을 자극하여 신호 전달 경로를 활성화한다. CAR 기반 입양 세포 면역요법은 기존 표준 치료에 반응하지 않는 종양을 갖는 암 환자를 치료하는 데 사용되었다 (문헌 [Grupp et al., *N. Engl. J. Med.* 368:1509, 2013; Kalos et al., *Sci. Transl. Med.* 3:95ra73, 2011] 참고).

[0008] 자가 T 세포는 생체내 전달 후 효능을 증진시키도록 조작된 이식유전자를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, CD19 B 세포 계통 악성 종양의 설정에서 이식유전자 변형 T 세포의 성공적인 입양 전달에도 불구하고 모든 형태의 암에 존재하지만 정상 세포는 아닌 보편적인 CAR 표적 항원은 확인되지 않았다. 따라서, 이 분야는 종양 세포에 자연적으로 존재하고 신체의 정상 세포/조직에 의해 최소한으로 발현되는 세포 표면 표적을

식별해야 하는 필요성으로 인해 방해를 받는다. 따라서, CAR T 세포 치료제를 개발하는 것은 수십에서 수백 개의 검증된 CAR 표적과 인간을 괴롭히는 대부분의 암 유형을 포괄하는 CAR이 필요할 것이라는 전망으로 인해 방해를 받는다. 또한, 기존의 CAR 기술은 숙주에 CAR T 세포를 다시 주입하기 전에 CAR 벡터로 T 세포를 활성화하고 형질도입하기 위해 비싸고 시간 소모적인 생체외 조작 단계를 종종 필요로 한다. 또한 CAR T 세포는 위험하고, 심지어 치명적인 부작용을 유발할 수 있는 수많은 표적 외 효과를 가질 수 있다.

[0009] 더 안전하고, 더 비용 효율적이며, 보편적인 CAR T 세포 기술에 대한 요구는 충족되지 않고 있다.

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 일반적으로 (a) 표적화 모이어티 및 합텐을 포함하는 어댑터 분자를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (b) (i) 복수의 재조합 레트로바이러스 입자 또는 (ii) 생체외에서 면역 세포를 복수의 재조합 바이러스 입자와 접촉시켜 생성된 세포를 대상체에게 투여하는 단계;를 포함하는 방법에 관한 것이다. 상기 각각의 레트로바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 다음을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다: (i) 5' 긴 말단 반복부 (long terminal repeat, LTR) 또는 비번역 영역 (UTR), (ii) 프로모터, (iii) 상기 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및 (iv) 3' LTR 또는 UTR. 상기 각각의 레트로바이러스 입자는 바이러스 외피를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하는 방법이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체의 종양 세포를 사멸시키는 방법이다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 (a) 표적화 모이어티 및 합텐을 포함하는 어댑터 분자; 및 (b) (i) 복수의 재조합 레트로바이러스 입자 또는 (ii) 생체외에서 면역 세포를 복수의 재조합 레트로바이러스 입자와 접촉시켜 생성된 세포;를 포함하는 시스템 또는 조성물을 제공한다. 상기 각각의 레트로바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 다음을 포함하는 뉴클레오티드를 포함한다: (i) 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 또는 UTR, (ii) 프로모터, (iii) 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및 (iv) 3' LTR 또는 UTR. 상기 각각의 레트로바이러스 입자는 바이러스 외피를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시스템 또는 조성물은 이의 사용 지침을 포함하는 키트에 제공된다.

[0012] 본 발명의 추가 측면 및 실시예는 하기의 상세한 설명에 의해 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a-1d는 형질도입된 T 세포에서 FITC-CAR 구축물의 표면 발현을 도시하는 유세포 분석 염색 플롯이다. 도 1a는 단일 세포를 시각화하기 위해 추가로 개폐된 림프구의 유세포 분석 염색 플롯을 도시한다 (도 1b). 단일 세포를 추가로 개폐하여 CD3+ 세포를 시각화하였다 (도 1c). CD3+ 세포를 추가로 개폐하여 FITC-CAR+ 세포를 시각화하였다 (도 1d).

도 2a-2f는 RACR-CAR 페이로드 (payload)를 발현하는 형질도입된 T 세포가 RACR을 활성화하기 위해 라파마이신의 첨가에 의해 농축되고 (도 2a 및 도 2d)/되거나 CAR을 활성화하기 위해 FITC 항원 (도 2b-2c, 및 도 2e-2f)의 첨가에 의해 농축되는 방법을 도시하는 유세포 분석 염색 플롯이다. 도 2a-2c는 0 nM 라파마이신으로 처리된 형질도입된 세포를 도시하고 도 2d-2f는 10 nM 라파마이신으로 처리된 형질도입된 세포를 도시한다. 도 2b 및 2e는 FITC 코팅된 비드로 자극된 형질도입된 세포를 도시하고, 도 2c 및 2f는 플레이트 결합 FITC로 자극된 형질도입된 세포를 도시한다.

도 3은 비자극되거나, FITC 코팅된 비드로 자극되거나, 플레이트 결합 FITC로 자극되고 라파마이신을 포함 (10 nM)하거나 미포함 (0 nM)하는 형질도입된 세포에서 살아있는 FITC-CAR+ T 세포의 백분율을 나타내는 그래프이다.

도 4는 비자극되거나, FITC 코팅된 비드로 자극되거나, 플레이트 결합 FITC로 자극되고 라파마이신을 포함 (10 nM)하거나 미포함 (0 nM)하는 형질도입된 세포에서 살아있는 FITC-CAR+ T 세포의 총 수를 나타내는 그래프이다.

도 5는 비자극되거나, FITC 코팅된 비드로 자극되거나, 플레이트 결합 FITC로 자극되고 라파마이신을 포함 (10 nM)하거나 미포함 (0 nM)하는 형질도입된 세포에서 활성화 마커 CD25의 상향조절을 나타내는 그래프이다. gMFI=기하 평균 형광 강도.

도 6은 FITC CAR-Frb-RACR에 대한 벡터 맵을 도시한다.

도 7은 CD3-코칼 (Cocal) 바이러스 입자 외피에 대한 벡터 맵을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 개시내용은 일반적으로 (a) 표적화 모이어티 및 합텐을 포함하는 어댑터 분자를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (b) (i) 복수의 재조합 바이러스 입자 또는 (ii) 생체외에서 면역 세포를 복수의 재조합 바이러스 입자와 접촉시켜 생성된 세포를 대상체에게 투여하는 단계;를 포함하는 방법에 관한 것이다. 각각의 레트로 바이러스 입자는 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 각각의 레트로바이러스 입자는 바이러스 외피를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체의 암을 치료하는 방법이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체의 종양 세포를 사멸시키는 방법이다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 (a) 표적화 모이어티 및 합텐을 포함하는 어댑터 분자; 및 (b) (i) 복수의 재조합 바이러스 입자 또는 (ii) 생체외에서 면역 세포를 복수의 재조합 바이러스 입자와 접촉시켜 생성된 세포를 포함하는 시스템 또는 조성물을 제공한다. 각각의 레트로바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 다음을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다: (i) 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 또는 비번역 영역 (UTR), (ii) 프로모터, (iii) 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및 (iv) 3' LTR 또는 UTR. 각각의 레트로바이러스 입자는 바이러스 외피를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템 또는 조성물은 이의 사용 지침을 포함하는 키트에 제공된다.

[0016] **레트로바이러스 입자**

[0017] 레트로바이러스는 렌티바이러스, 감마-레트로바이러스, 및 알파-레트로바이러스를 포함하며, 이들 각각은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 폴리뉴클레오티르들 전달하는 데 사용될 수 있다. 렌티바이러스는 공통적인 레트로바이러스 유전자 gag, pol, 및 env 이외에 조절 또는 구조적 기능을 갖는 다른 유전자를 함유하는 복잡한 레트로바이러스이다. 복잡성이 높을수록 바이러스는 잠복 감염 과정에서와 같이 수명 주기를 조절할 수 있다. 렌티바이러스의 몇가지 예로는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV-1 및 HIV-2)와 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV)가 있다. 레트로바이러스 벡터는 HIV 독성 유전자를 다중 약화시킴으로써 생성되었고, 예를 들어 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef가 삭제되어 벡터가 생물학적으로 안전하다.

[0018] 예시적인 렌키바이러스 벡터는 문헌 [Naldini et al. (1996) *Science* 272:263-7; Zufferey et al. (1998) J. *Virol*. 72:9873-9880; Dull et al. (1998) *J. Virol*. 72:8463-8471]; 미국 특허 제6,013,516호; 및 미국 특허 제5,994,136호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다. 일반적으로, 이들 벡터는 벡터를 함유하는 세포의 선택, 렌티바이러스 입자 내로 외래 핵산의 혼입, 및 표적 세포 내로의 핵산의 전달을 위한 필수 서열을 보유하도록 구성된다.

[0019] 공통적으로 사용되는 렌티바이러스 벡터 시스템은 소위 3세대 시스템이다. 3세대 렌티바이러스 벡터 시스템은 4개의 플라스미드를 포함한다. "전달 플라스미드"는 렌티바이러스 벡터 시스템에 의해 표적 세포에 전달되는 폴리뉴클레오티드 서열을 암호화한다. 전달 플라스미드는 일반적으로 숙주 게놈으로의 전달 플라스미드 서열의 통합을 촉진시키는 긴 말단 반복부 (LTR) 서열이 측면에 있는 하나 이상의 관심 이식유전자 서열을 갖는다. 안전상의 이유로, 전달 플라스미드는 일반적으로 생성된 벡터 복제를 무능하게 만들도록 설계된다. 예를 들어, 전달 플라스미드는 숙주 세포에서 감염 입자의 생성에 필요한 유전자 요소가 부족하다. 또한, 전달 플라스미드는 3' LTR을 삭제하여 바이러스를 "자가-비활성화" (SIN) 하도록 설계될 수 있다. 문헌 [Dull et al. (1998) J. *Virol*. 72:8463-71; Miyoshi et al. (1998) *J. Virol*. 72:8150-57]을 참고한다. 바이러스 입자는 또한 3' 비번역 영역 (UTR) 및 5' UTR을 포함할 수 있다. UTR은 레트로바이러스 입자에 의한 세포의 접촉 후 세포 내로 프로바이러스 게놈의 패키징, 역전사 및 통합을 지원하는 레트로바이러스 조절 요소를 포함한다.

[0020] 3세대 시스템에는 일반적으로 두 개의 "패키징 플라스미드 (packaging plasmid)" 및 "외피 플라스미드 (envelope plasmid)"가 포함된다. "외피 플라스미드"는 일반적으로 프로모터에 작용적으로 연결된 Env 유전자를 암호화한다. 예시적인 3세대 시스템에서, Env 유전자는 VSV-G이고 프로모터는 CMV 프로모터이다. 3세대 시스템은 2개의 패키징 플라스미드를 사용하며 이 중 하나는 gag 및 pol을 암호화하고 다른 하나는 rev를 추가 안전 기능으로 암호화하는데 이는 소위 2세대 시스템의 단일 패키징 플라스미드보다 개선된 것이다. 3세대 시스템은 더 안전하지만 사용하기가 더 복잡할 수 있으며 추가 플라스미드의 추가로 인해 바이러스 역가가 더 낮아질 수 있다. 예시적인 패킹 플라스미드는 pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE, 및 pRRL-GOI을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0021] 많은 레트로바이러스 벡터 시스템은 "패키징 세포주"의 사용에 의존한다. 일반적으로 패키징 세포주는 전달 플

라스미드, 패키징 플라스미드(들) 및 외피 플라스미드가 세포 내로 도입될 때 전염성 레트로바이러스 입자를 생성할 수 있는 세포주이다. 형질감염 또는 전기천공을 포함한, 세포 내로 플라스미드를 도입하는 다양한 방법이 사용될 수 있다. 일부 경우, 패키징 세포주는 레트로바이러스 벡터 시스템을 레트로바이러스 입자로 고효율 패키징하는데 적합하였다.

[0022] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스 벡터" 또는 "렌티바이러스 벡터"는 게놈 패키징에 필요한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 cis 핵산 및 표적 세포 내로 전달될 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 암호화한다. 레트로바이러스 입자 및 렌티바이러스 입자는 일반적으로 RNA 게놈 (전달 플라스미드에서 유래), Env 단백질이 내장된 지질-이중층 외피, 및 인테그라제, 프로테아제 및 기질 단백질을 비롯한 기타 보조 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스 입자" 및 "렌티바이러스 입자"는 외피를 포함하고 렌티바이러스의 하나 이상의 특성을 가지며 표적 숙주 세포를 침범할 수 있는 바이러스 입자를 지칭한다. 이러한 특성에는 예를 들어, 하나 이상의 gag 구조적 폴리펩티드, 예를 들어 p7, p24, 및 p17을 포함한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 비리온, 하나 이상의 env 암호화된 당단백질, 예를 들어 p41, p120, 및 p160을 포함한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 외피, 복제, 프로바이러스 통합 또는 전사에서 기능하는 하나 이상의 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 cis-작용 서열을 포함한 게놈, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 프로테아제, 역전사 효소 또는 인테그라제를 암호화하는 게놈, 또는 Tat 또는 Rev와 같은 조절 활동을 암호화하는 게놈을 함유하는, 비분열 숙주 세포 감염, 비분열 숙주 세포 형질도입, 숙주 면역 세포 감염 또는 형질도입을 포함한다. 전달 플라스미드는 미국 특허 제8,093,042호에 기재된 바와 같이 cPPT 서열을 포함할 수 있다.

[0023] 시스템의 효율은 벡터 조작에서 중요한 관심사이다. 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 시스템의 효율은 정량 중합효소 연쇄 반응 (qPCR)과 같은 벡터 복제수 (VCN) 또는 벡터 게놈 (vg) 또는 밀리리터당 감염 단위 (IU/mL)의 바이러스 역가의 측정을 포함하여 당업계에 알려진 다양한 방식으로 평가할 수 있다. 예를 들어, 역가는 문헌 [Humbert et al. Development of Third-generation Cocal Envelope Producer Cell Lines for Robust Retroviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells. *Molecular Therapy* 24:1237-1246 (2016)]에 기재된 바와 같이 배양된 종양 세포주 HT1080에 대해 수행된 기능적 검정을 사용하여 평가될 수 있다. 지속적으로 분열하는 배양된 세포주에서 역가를 평가할 때 자극이 필요하지 않으므로, 측정된 역가는 레트로바이러스 입자의 표면 조작에 의한 영향을 받지 않는다. 레트로바이러스 벡터 시스템의 효율을 평가하는 다른 방법은 문헌 [Gaererts et al. Comparison of retroviral vector titration methods. *BMC Biotechnol.* 6:34 (2006)]에 제공되어 있다.

[0024] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 레트로바이러스 입자 및/또는 렌티바이러스 입자는 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열은 프로모터에 작용적으로 연결된다. 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, CAG 프로모터, SV40 프로모터, SV40/CD43 프로모터, 및 MND 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 입자는 형질도입 인핸서를 포함한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 입자는 T 세포 활성화제 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 입자는 합텐-결합 수용체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 입자는 태깅 단백질을 포함한다.

[0026] 일부 구현예에서, 각각의 레트로바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 다음을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다: (i) 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 또는 비번역 영역 (UTR), (ii) 프로모터, (iii) 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및 (iv) 3' LTR 또는 UTR.

[0027] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 입자는 표적 숙주 세포 상의 리간드에 결합하여 숙주 세포 형질도입을 허용하는 세포 표면 수용체를 포함한다. 바이러스 벡터는 위형 바이러스 벡터를 제공하는 이종 바이러스 외피 당단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 외피 당단백질은 RD114 또는 이의 변이체 중 하나, VSV-G, 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GALV)로부터 유래할 수 있거나, 양쪽성 외피, 홍역 외피 또는 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질이다. 일부 구현예에서, 세포-표면 수용체는 코칼 균주로부터의 VSV G 단백질 또는 이의 기능적 변이체이다. 일부 구현예에서, 바이러스 융합 당단백질은 SEQ ID NO: 1 (코칼 G 단백질)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 융합 당단백질은 SEQ ID NO:1 (코칼 G 단백질)과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 융합 당단백질은 SEQ ID NO:1 (코칼 G 단백질)과 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적

어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] NFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQ
PTSEQCKESIKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFPNGKCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITF
FSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFAYEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSK
IRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKYFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLFMIGHGML
DSDLHKTSQAEVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFR
K

[0029] (SEQ ID NO: 1)

[0030] 다양한 융합 당단백질은 위형 렌티바이러스 벡터에 사용될 수 있다. 가장 일반적으로 사용되는 예는 수포성 구내염 바이러스 (VSVG)의 외피 당단백질이지만, 다른 많은 바이러스 단백질 또한 렌티바이러스 벡터의 위형화(pseudotyping)에 사용되었다. 문헌 [Joglekar et al. *Human Gene Therapy Methods* 28:291-301 (2017)] 참고. 본 개시내용은 바이러스 융합 당단백질의 치환을 고려한다. 특히, 일부 융합 당단백질은 벡터 효율을 높인다.

[0031] 일부 구현예에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체를 위형화하는 것은 T 세포 또는 NK-세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 특정 세포 유형의 표적화된 형질도입을 촉진한다. 일부 구현예에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) gp160, 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) gp70, 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GALV) gp70, 고양이 백혈병 바이러스 (RD114) gp70, 양종향성 레트로바이러스 (Ampho) gp70, 10A1 MLV (10A1) gp70, 동족지향성 레트로바이러스 (Eco) gp70, 개코 원숭이 백혈병 바이러스 (BaEV) gp70, 홍역 바이러스 (MV) H 및 F, 니파 바이러스 (NiV) H 및 F, 광견병 바이러스 (RabV) G, 모콜라 바이러스 (MOKV) G, 에볼라 자이르 바이러스 (EboZ) G, 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV) GP1 및 GP2, 바큘로바이러스 GP64, 치군군야 바이러스 (CHIKV) E1 및 E2, 로스 리버 바이러스 (RRV) E1 및 E2, 셈리키 삼림열 바이러스 (SFV) E1 및 E2, 신드비스 바이러스 (SV) E1 및 E2, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV) E1 및 E2, 서부 말 뇌염 바이러스 (WEEV) E1 및 E2, 인플루엔자 A, B, C, 또는 D HA, 조류 흑사병 바이러스 (FPV) HA, 수포성 구내염 바이러스 VSV-G, 또는 찬디푸라 바이러스 및 피리 바이러스 CNV-G 및 PRV-G의 전체-길이 폴리펩티드(들), 기능적 단편(들), 상동체(들), 또는 기능적 변이체(들)이다.

[0032] 일부 구현예에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 수포성 구내염 알라고아스 바이러스 (VSAV), 카라야스 수포성바이러스 (CJSV), 찬디포라 수포성바이러스 (CHPV), 코칼 수포성바이러스 (COCV), 수포성 구내염 인디아나 바이러스 (VSIV), 이스파한 수포성바이러스 (ISFV), 마라바 수포성바이러스 (MARAV), 수포성 구내염 뉴저지 바이러스 (VSNJV), 바스-콩고 바이러스 (BASV)의 G 단백질의 전장 폴리펩티드, 기능적 단편, 상동체, 또는 기능적 변이체이다. 일부 구현예에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 코칼 바이러스 G 단백질이다.

[0033] 일부 구현예에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 수포성 구내염 알라고아스 바이러스 (VSAV), 카라야스 수포성바이러스 (CJSV), 찬디푸라 수포바이러스 (CHPV), 코칼 수포성 바이러스 (COCV), 수포성 구내염 인디아나 바이러스 (VSIV), 이스파한 수포성바이러스 (ISFV), 마라바 수포성바이러스 (MARAV), 수포성 구내염 뉴저지 바이러스 (VSNJV), 바스-콩고 바이러스 (BASV)의 G 단백질의 전장 폴리펩티드, 기능적 단편, 상동체 또는 기능적 변이체이다. 일부 구현예에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 코칼 바이러스 G 단백질이다.

[0034] 본 개시내용은 감마-레트로바이러스 벡터, 알파-레트로바이러스 벡터, 및 렌티바이러스 벡터를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 레트로바이러스 벡터를 추가로 제공한다.

[0035] **형질도입 인핸서**

[0036] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 바이러스 입자는 형질도입 인핸서를 포함한다.

[0037] "형질도입 인핸서"는 본원에 사용된 바와 같이 T 세포를 활성화시키는 막횡단 단백질을 지칭한다. 형질도입 인핸서는 본 개시내용에 따른 바이러스 외피 내로 혼입될 수 있다. 형질도입 인핸서는 미토겐 및/또는 사이토카인-기반 도메인을 포함할 수 있다. 형질도입 인핸서는 T 세포 활성화 수용체, NK 세포 활성화 수용체, 공동-자극 분자, 또는 이들의 일부를 포함할 수 있다.

[0038] *미토겐 형질도입 인핸서*

[0039] 본 발명의 바이러스 벡터는 바이러스 외피에 미토겐 형질도입 인핸서를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 미토겐 형질도입 인핸서는 레트로바이러스 벡터를 생산하는 동안 숙주 세포로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 미토겐 형질도입 인핸서는 패키징 세포에 의해 만들어지고 세포 표면에서 발현된다. 초기 레트로바이러스 벡터가 숙

주 세포막에서 싹을 틔우면 미토겐 형질도입 인핸서가 패키징 세포-유래 지질 이중층의 일부로 바이러스 외피에 포함될 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 숙주-세포 유래된 것이다. 용어 "숙주-세포 유래된"은 미토겐 형질도입 인핸서가 전술한 바와 같이 숙주 세포로부터 유래하고 주요 구조 단백질을 암호화하는 gag; 또는 외피 단백질을 인코딩하는 env와 같은 바이러스 유전자 중 하나로부터 융합 또는 키메라로 생성되지 않음을 나타낸다.

[0041] 외피 단백질은 단백질을 지질막에 고정시키는 막횡단 (TM), 및 세포 수용체에 결합하는 표면 (SU)과 같은 2개의 서브 유닛에 의해 형성된다. 일부 구현예에서, 패키징-세포 유래 미토겐 형질도입 인핸서는 표면 외피 서브유닛 (SU)을 포함하지 않는다.

[0042] 미토겐 형질도입 인핸서는 다음의 구조를 가질 수 있다: M-S-TM, 여기서 M은 미토겐 도메인이고; S는 선택적 스페이서 도메인이고 TM은 막횡단 도메인이다.

[0043] *형질도입 인핸서 미토겐 도메인*

[0044] 미토겐 도메인은 T-세포 활성화를 유발하는 미토겐 형질도입 인핸서의 일부이다. 이는 T 세포와 직접 또는 간접적으로 결합하거나 상호작용하여 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. 특히, 미토겐 도메인은 CD3, CD28, CD134 및 CD137과 같은 T 세포 표면 항원에 결합할 수 있다.

[0045] CD3는 T-세포-공동-수용체이다. 이는 4개의 별개의 사슬로 구성된 단백질 복합체이다. 포유류에서, 복합체는 CD3y 사슬, CD35 사슬, 및 2개의 CD3e 사슬을 함유한다. 이들 사슬은 T-세포 수용체 (TCR) 및 ζ-사슬과 결합하여 T 림프구에서 활성화 신호를 생성한다. TCR, ζ-사슬, 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 구성한다.

[0046] 일부 구현예에서, 미토겐 도메인은 CD3 ε 사슬에 결합할 수 있다.

[0047] CD28은 T 세포 활성화 및 생존에 필요한 공동-자극 신호를 제공하는 T 세포에서 발현되는 단백질 중 하나이다. T-세포 수용체 (TCR) 외에 CD28을 통한 T 세포 자극은 다양한 인터루킨 (특히 IL-6)의 생성을 위한 강력한 신호를 제공할 수 있다. OX40로도 알려진 CD134는 CD28과는 달리 휴지기 나이브 T 세포에서 본질적으로 발현되지 않은 수용체의 TNFR-수퍼패밀리의 구성원이다. OX40은 활성화 후 24 내지 72시간 후에 발현되는 이차 공동자극 분자이고; 이의 리간드인 OX40L은 또한 휴지기 항원 제시 세포에서 발현되지 않지만 그들의 활성화를 따른다. OX40의 발현은 T 세포의 완전한 활성화에 의존하고; CD28이 없으면, OX40의 발현이 지연되고 4배 더 낮은 수준이 된다.

[0048] 4-1BB로도 알려진 CD137은 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 패밀리의 구성원이다. CD137은 활성화된 T 세포에 의해 발현될 수 있지만 CD4 T 세포보다 CD8에서 더 많이 발현된다. 또한, CD137 발현은 수지상 세포, 여포 수지상 세포, 자연 살해 세포, 과립구 및 염증 부위의 혈관벽 세포에서 발견된다. CD137의 가장 특징적인 활성은 활성화된 T 세포에 대한 동시자극 활성이다. CD137의 가교는 T 세포 증식, IL-2 분비 생존 및 세포용해 활성을 향상시킨다.

[0049] 미토겐 도메인은 T-세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 기타 분자의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 항체는 TCR 또는 CD28을 활성화할 수 있다. 항체는 TCR, CD3 또는CD28에 결합할 수 있다. 이러한 항체의 예로는 OKT3, 15E8 및 TGN1412가 있다. 다른 적합한 항체는 다음을 포함한다:

[0050] 항-CD28: CD28.2, 10F3

[0051] 항 -CD3/TCR: UCHT1, YTH12.5, TR66

[0052] 미토겐 도메인은 OKT3, 15E8, TGN1412, CD28.2, 10F3, UCHT1, YTH12.5 또는 TR66으로부터의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0053] 미토겐 도메인은 OX40L 및 41 BBL과 같은 공동-자극 분자의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 미토겐 도메인은 OX40L 또는 41 BBL로부터의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0054] 또한 무로모나브-CD3으로도 알려진 OKT3은 CD3e 사슬을 표적으로 하는 항체이다. 이는 장기 이식 환자의 급성 거부 반응을 줄이기 위해 임상적으로 사용된다. 이는 인간에 대한 임상 사용이 승인된 최초의 단일클론 항체이다. OKT3의 CDR은 다음과 같다:

[0055] CDRH1: GYTFTRY (SEQ ID NO. 4)

[0056] CDRH2: NPSRGY (SEQ ID NO. 5)

[0057] CDRH3: YYDDHYCLDY (SEQ ID NO. 6)

[0058] CDRL1 : SASSSVSYMN (SEQ ID NO. 7)

[0059] CDRL2: DTSKLAS (SEQ ID NO. 8)

[0060] CDRL3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO. 9)

[0061] 15E8은 인간 CD28에 대한 마우스 단일클론 항체이다. 그 CDR은 다음과 같다:

[0062] CDRH1 : GFSLTSY (SEQ ID NO. 10)

[0063] CDRH2: WAGGS (SEQ ID NO. 11)

[0064] CDRH3: DKRAPGKLYYGYPDY (SEQ ID NO. 12)

[0065] CDRL1 : RASESVEYYVTSLMQ (SEQ ID NO. 13)

[0066] CDRL2: AASNVES (SEQ ID NO. 14)

[0067] CDRL3: QQTRKVPST (SEQ ID NO. 15)

[0068] TGN1412 (CD28-SuperMAB으로도 알려짐)는 CD28 수용체에 결합할 뿐만 아니라 강력한 작용제인 인간화 단일클론 항체이다. 그 CDR은 다음과 같다:

[0069] CDRH1 : GYTFSY (SEQ ID NO. 16)

[0070] CDRH2: YPGNVN (SEQ ID NO. 17)

[0071] CDRH3: SHYGLDWNFDV (SEQ ID NO. 18)

[0072] CDRL1 : HASQNIYVLN (SEQ ID NO. 19)

[0073] CDRL2: KASNLHT (SEQ ID NO. 20)

[0074] CDRL3: QQGQTYPYT (SEQ ID NO. 21)

[0075] OX40L은 CD134에 대한 리간드이며, Th2 세포 분화의 증폭을 가능하게 하는 DC2 (수지상 세포의 아형)와 같은 세포에서 발현된다. OX40L은 또한 CD252 (분화 클러스터 252)로 지정되었다.

[0076] OX40L 서열 (SEQ ID NO. 22)

[0077]
```
MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSAL
QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNYLISLKGYFS
QEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSL
DDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
```

[0078] 4-1BBL은 종양 괴사 인자 (TNF) 리간드 계열에 속하는 사이토카인이다. 이 막횡단 사이토카인은 T 림프구의 공동자극 수용체 분자인 4-1BB에 대한 리간드 역할을 하는 양방향 신호 트랜스듀서이다. 4-1BBL은 T 림프구 증식을 촉진하는 것 외에도 무증상 T 림프구를 재활성화하는 것으로 나타났다.

[0079] 41 BBL 서열 (SEQ ID NO. 23)

[0080]
```
MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVS
GARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD
PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ
PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH
AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
```

[0081] *형질도입 인핸서 스페이서 도메인*

[0082] 미토겐 형질도입 인핸서 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 항원-결합 도메인을 막횡단 도메인과 연결하기 위한 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 유연한 스페이서는 항원-결합 도메인이 결합을 용이하게 하기 위해 다른 방향으로 배향되도록 한다.

[0083] 스페이서 서열은 예를 들어 lgG1 Fc 영역, lgG1 힌지 또는 인간 CD8 줄기 또는 마우스 CD8 줄기를 포함할 수 있다. 스페이서는 대안적으로 lgG1 Fc 영역, lgG1 힌지 또는 CD8 줄기와 유사한 길이 및/또는 도메인 간격 특성을 갖는 대안적인 링커 서열을 포함할 수 있다. 인간 lgG1 스페이서는 Fc 결합 모티프를 제거하기 위해 변경될 수 있다.

[0084] 이들 스페이서에 대한 아미노산 서열의 예는 하기에 제공된다:

[0085] SEQ ID NO. 24 (인간 lgG1의 힌지- CH2CH3)

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCWVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGKKD

[0086]

[0087] SEQ ID NO. 25 (인간 CD8 줄기):

[0088] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

[0089] SEQ ID NO. 26 (인간 lgG1 힌지):

[0090] AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

[0091] SEQ ID NO. 27 (CD2 엑토도메인):

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKKIAQFRKEKETFKEKD
TYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCIN
TTLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSV
EPVSCPEKGLD

[0092]

[0093] SEQ ID NO. 28 (CD34 엑토도메인):

SLDNNGTATPELPTQGTFSNVSTNVSYQETTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNITE
TTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDL
STTSTSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKD
RGEGLARVLCGEEQADADAGAQVCSLLLAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMK
KHQSDLKKLGI LDFTEQDVASHQSYSQKT

[0094]

[0095] 일부 구현예에서, 스페이서 서열은 인간 단백질로부터 유래할 수 있다.

[0096] *형질도입 인핸서 막횡단 도메인*

[0097] 막횡단 도메인은 막에 걸쳐 있는 미토겐 형질도입 인핸서 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서의 서열이다. 막횡단 도메인은 소수성 알파 나선을 포함할 수 있다. 막횡단 도메인은 CD28로부터 유래할 수 있다. 일부 구현예에서, 막횡단 도메인은 인간 단백질로부터 유래할 수 있다.

[0098] 막횡단 도메인에 대한 대안적인 옵션은 GPI 앵커와 같은 막-효적화 도메인이다. GPI 고정은 소포체에서 발생하는 번역 후 변형이다. 사전 조립된 GPI 앵커 전구체는 C-말단 GPI 신호 서열을 보유하는 단백질로 전달된다. 프로세싱 동안, GPI 앵커는 GPI 신호 서열을 대체하고 아미드 결합을 통해 표적 단백질에 연결된다. GPI 앵커는 성숙한 단백질을 막으로 표적화한다. 일부 구현예에서, 본 태깅 단백질은 GPI 신호 서열을 포함한다.

[0099] *사이토카인-기반 형질도입 인핸서*

[0100] 본 발명의 바이러스 벡터는 바이러스 외피에 사이토카인-기반 형질도입 인핸서를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 바이러스 벡터를 생성하는 동안 숙주 세포로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 숙주 세포에 의해 만들어지고 세포 표면에서 발현된다. 초기 바이러스 벡터가 숙주 세포막에서 싹을 틔우면 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 패키징 세포-유래 지질 이중층의 일부로 바이러스 외피에 포함될 수 있다.

[0101] 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 사이토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 이는 C-S-TM 구조를 가질 수 있으며, 여기서 C는 사이토카인 도메인이고, S는 선택적 스페이서 도메인이며 TM은 막횡단 도메인이다. 스페이서 도메인 및 막횡단 도메인은 상기 정의한 바와 같다.

[0102] *형질도입 인핸서 사이토카인 도메인*

[0103] 사이토카인 도메인은 IL2, IL7 및 IL15와 같은 T-세포 활성화 사이토카인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 사이토카인 도메인은 특정 수용체에 결합하고 T-세포를 활성화하는 능력을 유지하는 한 사이토카인의 일부를 포함할 수 있다.

[0104] IL2는 T 세포 및 특정 B 세포의 성장 및 분화를 조절하기 위해 T 세포에 의해 분비되는 인자 중 하나이다. IL2는 반응성 T 세포의 증식을 유도하는 림포카인이다. 이는 단일 클리코실화 폴리펩티드로 분비되며 이의 활성을 위해 서는 신호 서열의 절단이 필요하다. NMR 용액은 IL2의 구조가 4개의 나선 묶음 (A-D라고 함)으로 구성되어 있고, 그 옆에는 2개의 더 짧은 나선과 몇 개의 잘못 정의된 루프가 있음을 시사한다. 나선 A의 잔류물과 나선 A와 B 사이의 루프 영역은 수용체 결합에 중요하다. IL2의 서열은 SEQ ID NO. 29로 표시된다.

[0105] SEQ ID NO. 29:

MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR
MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK
GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0106]

[0107] IL7은 B- 및 T-세포 계통의 초기 림프 세포에 대한 성장 인자 역할을 하는 사이토카인이다. IL7의 서열은 SEQ ID NO. 30로 표시된다.

[0108] SEQ ID NO. 30:

MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSN
CLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILL
NCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILM
GTKEH

[0109]

[0110] IL15는 IL-2와 구조적으로 유사한 사이토카인이다. IL-2와 마찬가지로, IL-15는 IL-2/IL-15 수용체 베타 사슬과 공통 감마 사슬로 구성된 복합체에 결합하여 이를 통해 신호를 전달한다. IL-15는 바이러스(들)에 의한 감염 후 단핵식세포와 일부 다른 세포에서 분비된다. 이 사이토카인은 자연 살패 세포의 세포 증식을 유도하고; 타고난 면역계의 세포의 주된 역할은 바이러스에 감염된 세포를 죽이는 것이다. IL-15의 서열은 SEQ ID NO. 31로 표시된다.

[0111] SEQ ID NO. 31

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKI
EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANN
SLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0112]

[0113] 사이토카인 기반 형질도입 인핸서는 하기 서열 중 하나 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다:

[0114] SEQ ID NO. 32 (막-IL7)

MAHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSN
CLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILL
NCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILM
GTKEHSGGGSPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0115]

[0116] SEQ ID NO. 33 (막-IL15)

MGLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVIS
DLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVE
NLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSPAKPTTTP
APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

[0117]

[0118] 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 변이체 서열은 필요한 특성, 즉 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 외피 단백질에 존재할 때 T 세포를 활성화시키는 능력을 갖는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서이면 적어도 80, 85, 90, 95, 98 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 SEQ ID NO. 32 또는 33로 표시된 서열의 변이체를 포함할 수 있다.

[0119] *형질도입 인핸서의 예시적인 이점*

[0120] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 내장형 형질도입 인핸서를 갖는 바이러스 벡터를 제공한다. 벡터는 T-세포를 자극하고 유전자 삽입에도 영향을 미치는 능력을 가질 수 있다. 이것은 다음을 포함한 하나 이상의 이점을 생성할 수 있다: (1) 하나의 구성요소만 추가하면 되므로 T-세포 조작 프로세스를 단순화한다; (2) 바이러스가 불안정하고 제거할 필요가 없으므로 비드 제거 및 이와 관련된 수율 감소를 피한다; (3) 하나의 구성 요소만 제조하면 되므로 T-세포 조작 비용을 줄인다; (4) 각 T-세포 조작 프로세스가 유전자-전달 벡터를 만드는 것을 포함하고 동일한 제품을 제품을 "맞추기 (fit)" 위해 형질도입 인핸서로 만들 수 도 있으므로 설계 유연성을 높일 수 있다; (5) 생산 공정을 단축시킨다: 가용성 앙원/비드-기반 접근법에서, 미토겐 및 벡터는 일반적으로 1일, 2일 또는 때로는 3일 간격으로 순차적으로 제공되며, 이는 형질도입 향상 및 바이러스 진입이 동기화되고 동시적이기 때문에 본 발명의 레트로바이러스 벡터로 피할 수 있다; (6) 발현 및 기능에 대해 많은 상이한 융합 단백질을 시험할 필요가 없기 때문에 조작을 단순화한다; (7) 동시에 하나 이상의 신호를 추가할 수 있는 가능성을 허용한다; 그리고; (8) 각각의 신호/단백질의 발현 및/또는 발현 수준의 조절을 개별적으로 허용한다.

[0121] *형질도입 인핸서를 포함하는 바이러스 벡터의 예시적인 실시예*

[0122] 일부 구현예에서, 바이러스 외피는 하나 이상의 형질도입 인핸서를 포함한다. 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 T-세포 활성화 수용체, NK 세포 활성화 수용체, 및/또는 공동-자극 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 형질도입 인핸서는 항-CD3scFv, CD86, 및 CD137L 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 항-CD3 scFv, CD86, 및 CD137L을 모두 포함한다.

[0123] 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 미토겐 자극, 및/또는사이토카인 자극을 포함하며, 이는 바이러스가 T 세포를 활성화하고 형질도입하도록 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 캡시드 내로 혼입된다. 이것은 벡터, 미토겐 및 사이토카인을 별도로 추가할 필요를 없게 한다. 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 미토겐 막횡단 단백질 및/또는 생산자는 패키징 세포에 포함된 사이토카인-기반 막횡단 단백질을 포함하며, 이는 생산자/패키징 세포막에서 싹이 트면 레트로바이러스 내로 혼입된다. 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 바이러스 외피 당단백질의 일부가 아니라 생산자 세포에서 별도의 세포 효면 분자로 발현된다.

[0124] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 바이러스 외피를 갖는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 제공한다:

[0125] (i) 미토겐 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 미토겐 형질도입 인핸서; 및/또는

[0126] (ii) 사이토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서.

[0127] 일부 구현예에서, 형질도입 인핸서는 바이러스 외피 당단백질의 일부가 아니다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 env 유전자에 의해 인코딩된 별도의 바이러스 외피 당단백질을 포함한다. 미토겐 자극 및/또는 사이토카인 자극이 바이러스 외피 당단백질과 별개인 분자에 제공되기 때문에, 바이러스 외피 당단백질의 무결성이 유지되고 바이러스 역가에 부정적인 영향이 없다.

[0128] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0129] (i) 바이러스 외피 당단백질: 및

[0130] (ii) 다음의 구조를 갖는 미토겐 형질도입 인핸서: M-S-TM

[0131] 여기서, M은 미토겐 도메인이고; S는 선택적 스페이서이며 TM은 막횡단 도메인이고; 및/또는

[0132] (iii) 사이토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서.

[0133] 일부 구현예에서, 미토겐 형질도입 인핸서 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 바이러스 외피 당단백질의 일부가 아니다. 일부 구현예에서, 그들은 바이러스 외피에 별도의 단백질로 존재하며 별도의 유전자에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 미토겐 형질도입 인핸서는 다음의 구조를 갖는다:

[0134] M-S-TM

[0135] 여기서, M은 미토겐 도메인이고; S는 선택적 스페이서이며 TM은 막횡단 도메인이다.

[0136] 일부 구현예에서, 미토겐 형질도입 인핸서는 T-세포 효면 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원은 CD3, CD28, CD134 또는 CD137이다. 미토겐 형질도입 인핸서는 이러한 활성화 T-세포 표면 항원에 대한 작용제를 포함할 수 있다.

[0137] 미토겐 형질도입 인핸서는 OKT3, 15E8, TGN1412와 같은 항체; 또는 OX40L 또는 41 BBL와 같은 공동자극 분자로부터의 결합 도메인을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 바이러스 외피에 2개 이상의 미토겐 형질도입 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 CD3에 결합하는 미토겐 형질도입 인핸서 및 CD28에 결합하는 제2 미토겐 형질도입 인핸서를 포함할 수 있다. 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 예를 들어 IL2, IL7 및 IL15로부터 선택된 사이토카인을 포함할 수 있다.

[0138] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 갖는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0139] (a) CD3에 결합하는 제1 미토겐 형질도입 인핸서; 및

[0140] (b) CD28에 결합하는 제2 미토겐 형질도입 인핸서.

[0141] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 갖는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0142] (a) CD3에 결합하는 제1 미토겐 형질도입 인핸서;

[0143] (b) CD28에 결합하는 제2 미토겐 형질도입 인핸서; 및

[0144] (c) IL2를 포함하는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서.

[0145] 일부 구현예에서, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 갖는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스가 제공된다:

[0146] (a) CD3에 결합하는 제1 미토겐 형질도입 인핸서;

[0147] (b) CD28에 결합하는 제2 미토겐 형질도입 인핸서;

[0148] (c) IL7을 포함하는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서; 및

[0149] (d) IL15를 포함하는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서.

[0150] **T 세포 활성화제 단백질**

[0151] 본 개시내용은 또한 T 세포 활성화제 단백질 또는 T 세포 활성화제 단백질 복합체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 제공한다. 본원에서 언급된 바와 같이, 용어 "T 세포 활성화제 단백질" 및 "T 세포 활성화제 단백질 복합체"는 상호 교환 가능하게 사용될 수 있으며, 단일 단백질 또는 별개의 단백질 복합체를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 T 세포가 상기 단백질을 발현하도록 T 세포 활성화제 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 T 세포를 형질도입한다. T 세포 활성화제 단백질이 결합되어 형질도입된 T 세포를 활성화할 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화제 단백질은 약물-유도성 T

세포 활성화제 단백질이다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화제 단밸질은 화학적-유도 신호전달 복합체를 형성한다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화제 단백질은 리간드-유도 이량체화의 직접적인 결과로서 세포의 내부로 신호를 개시하는 조작된 복합체를 형성한다. T 세포 활성화제 단백질은 동종이량체 (2개의 동일한 성분의 이량체화) 또는 이종이량체 (2개의 별개 성분의 이량체화)에 포함될 수 있다. T 세포 활성화제 단백질 복합체는 본원에 기재된 바와 같은 합성 복합체일 수 있다. 당업자는 T 세포 활성화제 단백질 복합체의 성분 일부가 복합체로의 혼입에 유용한 합성 성분으로 구성될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본원에 제공된 예는 한정하려는 의도가 아니다. 본원에서 구현될 수 있는 추가 T 세포 활성화제 단백질은 제 WO 2016/139463호 및 제 WO 2018/111834호에서 찾을 수 있으며, 이들의 개시내용은 그 전체가 본원에 포함된다.

[0152] 일부 구현예에서, T 세포 활성화제 단백질 서열은 제1 및 제2 서열을 가질 수 있다. 제1 서열은 제1 세포외 결합 도메인 또는 이의 일부, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 이의 일부를 포함할 수 있는 제1 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분을 암호화할 수 있다. 제2 서열은 제2 세포외 결합 도메인 또는 이의 일부, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 이의 일부를 포함하는 수 있는 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분을 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 성분은 발현될 때 리간드의 존재 하에 이들이 이량체화되도록 위치할 수 있다.

[0153] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "라파마이신 활성화된 사이토카인 수용체" 또는 "RACR"은 라파마이신의 존재 하에 세포의 증식 및/또는 활성을 촉진시키는 세포내 신호를 유도적으로 생성하는 다분형 수용체를 상호 교환 가능하게 지칭한다. RACR은 IL-2R 세포내 도메인(들) 또는 이의 변이체를 통해 라파마이신의 존재 하에 T 세포에서 IL2-유사 신호를 형질도입할 수 있다.

[0154] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 이종이량체 2성분 T 세포 활성화제 단백질 복합체에 대한 단백질 서열 또는 서열을 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 성분은 IL2Rɣ 복합체이다. 일부 구현예에서, IL2Rɣ 복합체는 SEQ ID NO: 34에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0155] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID NO: 34).

[0156] 일부 구현예에서, IL2Rɣ 복합체는 SEQ ID NO: 36에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0157] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID NO: 36).

[0158] 일부 구현예에서, IL2Rɣ 복합체는 SEQ ID NO: 37에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0159] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID NO: 37).

[0160] 일부 구현예에서, IL2Rɣ 복합체는 SEQ ID NO: 38에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0161] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID NO: 38)

[0162] 일부 구현예에서, 제1 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 단백질 서열을 포함한다. 구현예는 또한 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제1 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 단백질 서열은 SEQ ID NO: 1, 3, 5, 또는 7에 기재된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 서열 동일성을 포함하거나 전술한 백분율 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위 내에 있는 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0163] 일부 구현예에서, 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분은 IL2Rβ 복합체이다. 일부 구현예에서, IL2Rβ 복합체는 SEQ ID NO: 39에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL
LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQ
GEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 39).

[0165] 일부 구현예에서, IL2Rβ 복합체는 SEQ ID NO: 40에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0166] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL
LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARL
PLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 40).

[0167] 일부 구현예에서, IL2Rβ 복합체는 SEQ ID NO: 41에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0168] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL
LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARL
PLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 41).

[0169] 일부 구현예에서, IL2Rβ 복합체는 SEQ ID NO: 42에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0170] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL
LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARL
PLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 42).

[0171] 일부 구현예에서, 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분은 IL7Rα 복합체이다. 일부 구현예에서, IL7Rα 복합체는 SEQ ID NO: 43에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0172] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA
WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL
LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARL
PLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 43).

[0173] 일부 구현예에서, 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분에 대한 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 단백질 서열을 포함한다. 구현예는 또한 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 단백질 서열은 SEQ ID NOs: 39-43에 기재된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 서열 동일성을 포함하거나, 전술한 백분율 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위 내에 있는 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0174] 일부 구현예에서, 단백질 서열은 링커를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산, 예컨데 글리신, 또는 전술한 숫자 중 2개에 의해 정의된 범위 내에 있는 다수의 아미노산, 예컨데 글리신을 포함한다. 일부 구현예에서, 글리신 스페이서는 3개 이상의 글리신을 포함한다. 일부 구현예에서, 글리신 스페이서는 SEQ ID NO: 44 (GGGS; SEQ ID NO: 44), SEQ ID NO: 45 (GGGSGGG; SEQ ID NO: 45) 또는 SEQ ID NO: 46 (GGG; SEQ ID NO: 46)에 기재된 서열을 포함한다. 구현예는 또한 SEQ ID NOs: 44-46을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 막횡단 도메인은 신호전달 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 힌지 도메인은 막횡단 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 링커는 힌지 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 세포외 결합 도메인은 링커에 대해 N-말단에 위치한다.

[0175] 일부 구현예에서 동종이량체 2성분 T 세포 활성화제 단백질 복합체에 대한 단백질 서열 또는 서열이 제공된다.

일부 구현예에서, 제1 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분은 IL2Rɣ 복합체이다. 일부 구현예에서, IL2Rɣ 복합체는 SEQ ID NO: 47에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0176] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYA YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESL QPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID NO: 47).

[0177] 일부 구현예에서, 제1 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분에 대한 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 단백질 서열을 포함한다. 구현예는 또한 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제1 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 단백질 성분은 SEQ ID NOs: 47에 기재된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 서열 동일성을 포함하거나 전술한 백분율 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위 내에 있는 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0178] 일부 구현예에서, 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분은 IL2Rβ 복합체 또는 IL2Rα 복합체이다. 일부 구현예에서, IL2Rβ 복합체는 SEQ ID NO: 48에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0179] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARL PLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 48).

[0180] 일부 구현예에서, IL2Rα 복합체는 SEQ ID NO: 49에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0181] (MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQA WDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDL LLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARL PLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV; SEQ ID NO: 49).

[0182] 일부 구현예에서, 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분에 대한 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 단백질 서열을 포함한다. 구현예는 또한 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서 제2 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인 을 포함하는 제2 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분의 단백질 서열은 SEQ ID NO: 48 또는 SEQ ID NO: 49에 기재된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 또는 80% 서열 동일성을 포함하거나 전술한 백분율 중 적어도 2개에 의해 정의된 범위 내에 있는 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0183] 일부 구현예에서, 동종이량체화 2성분 T 세포 활성화제 단백질 복합체에 대한 서열은 리간드 AP1903을 사용한 동종이량체화를 위한 FKBP F36V 도메인을 포함한다.

[0184] 일부 구현예에서 단일 성분 동종이량체화 T 세포 활성화제 단백질 복합체에 대한 단백질 서열 또는 서열이 제공된다. 일부 구현예에서, 단일 성분 T 세포 활성화제 단백질 복합체는 IL7Rα 복합체이다. 일부 구현예에서, IL7Rα 복합체는 SEQ ID NO: 50에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0185] (MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYA YGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESL QPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID NO: 50).

[0186] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 T-세포 활성화제 단백질은 제1 이량체화 도메인을 포함하는 제1 수용체 단백질 및 제2 이량체화 도메인을 포함하는 제2 수용체 단백질을 포함하고, 여기서 제1 이량체화 도메인 및 제2 이량체화 도메인은 분자에 반응하여 서로 특이적으로 결합한다. 대안적으로 "리간드" 또는 "작용제"라고도 하는 T 세포 활성화제 단백질에 의해 결합된 분자는 원하는 생물학적 효과를 갖는 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 리간드는 세포외 결합 도메인에 의해 인식되고 결합되어 리간드와 2개의 결합 T 세포 활성화제 단백질 복합체 성분을 포함하는 삼중항체 복합체를 형성한다. 리간드는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 번역후 변형된 단백질, 항

체 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 단백질성 분자; 소분자 (1000 달톤 미만), 무기 또는 유기 화합물; 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA, 또는 이중 가닥 또는 단일 가닥 RNA (예를 들어, 안티센스, RNAi 등), 압타머, 뿐만 아니라 삼중 나선 핵산 분자를 포함하지만 이에 한정되지 않는 핵산 분자를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 리간드는 임의의 공지된 유기체 (동물, (예를 들어, 포유류 (인간 및 비-인간 포유류)), 식물, 박테리아, 진균, 및 원생생물, 또는 바이러스를 포함하지만 이에 한정되지 않음)로부터 또는 합성 분자 라이브러리로부터 유래하거나 얻어질 수 있다. 일부 구현예에서, 리간드는 단백질, 항체, 소분자, 또는 약물이다. 일부 구현예에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (라팔로그)이다. 라팔로그는 라파마이신에 대해 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 환원, 제거 또는 유도체화; 6원 피페콜레이트 고리를 5원 프롤릴 고리로 대체; 및 사이클로헥실 고리 상의 대안적인 치환 또는 사이클로헥실 고리를 치환된 사이클로펜틸 고리로 대체. 따라서, 일부 구현예에서, 라팔로그는 에베롤리무스, 노볼리무스, 피메크로리무스, 리다포롤리무스, 타크로리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 조타리무스, CCI-779, C20-메탈릴라팜마이신, C16- (S)-3-메틸인돌레라파마이신, C16-iRap, AP21967, 미코페놀산 나트륨, 베니디핀 하이드로클로라이드, 라파민, AP23573, 또는 AP1903, 또는 이들의 대사산물, 유도체 및/또는 조합이다. 일부 구현예에서, 리간드는 IMID-계열 약물 (예를 들어, 탈리도마이드, 포말리디미드, 레날리도마이드 또는 관련 유사체)이다.

[0187] 일부 구현예에서, 분자는 FK1012, 타크로리무스 (FK506), FKCsA, 라파마이신, 쿠메르마이신, 지베렐린, HaXS, TMP-HTag, 및 ABT-737 또는 이들의 기능적 유도체로부터 선택된다.

[0188] **어댑터 분자**

[0189] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "어댑터 분자"는 표적화 모이어티에 연결된 수용체에 의해 인식될 수 있는 합텐 모이어티를 갖는 임의의 분자를 지칭한다. "표적화 모이어티"는 표적 세포에 특이적으도 또는 비특이적으로 결합하는 임의의 분자이다. 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 단백질이다. 표적화 모이어티로서 사용하기 위한 예시적인 단백질은 미국 특허 제9,233,125호에 기재된 것들을 포함하며, 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 일부 구현예에서, 단백질은 항원 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 종양 항원에 특이적이다. 예시적인 단백질은 세툭시맙 (항-EGFR), 니모투주맙 (항-EGFR), 파니투무맙 (항 -EGFR), 리툭시맙 (항 -CD20), 오말리주맙 (항 -CD20), 토시투모맙 (항 -CD20), 트라스투주맙 (항 -Her2), 젬투주맙 (항 -CD33), 알렘투주맙 (항 -CD52), 및 베바시주맙 (항 -VEGF)과 같은 항암 기반 단일클론 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0190] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 소분자이다. 표적화 모이어티로서 사용하기 위한 예시적인 단백질은 미국 특허 출원 제15/296,666호, 제16/092,054호, 및 제16/253,562호에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 표적화 모이어티로서 유용한 예시적인 소분자에는 엽산, 디카르복시프로필)우레이도]펜탄디오산 (DUPA), NK-1R 리간드, CAIX 리간드, 감마 글루타밀 트랜스펩티다제의 리간드, NKG2D 리간드, 또는 콜레시스토키닌 2 수용체 (CCK2R) 리간드가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0191] 일부 구현예에서 표적화 모이어티는 지질, 또는 보다 구체적으로 인-지질 에테르 (PLE)이다. 표적화 모이어티로서 사용하기 위한 예시적인 단백질은 국제 특허 공보 제 WO2018148224호, 제WO2019060425호, 및 제 WO2018148224호에 기재된 것을을 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 일부 구현예에서, 지질은 극성 헤드 기 및 소수성 기를 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 기는 탄소 사슬 또는 지방족 사슬과 같은 지방산이다. 일부 구현예에서, 탄소 사슬 또는 지방산은 포화 또는 불포화이다. 일부 구현예에서, 소수성 기는 알킬, 알케닐 또는 알키닐 기를 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 기는 스테로이드 또는 콜레스테롤과 같은 테르페노이드 지질을 포함하거나 방향족 고리를 포함한다. 일부 구현예에서,소수성 기는 에테르 결합을 포함하고, 여기서 에테르 결합은 극성 헤드 기와 지방족 사슬 사이에 있다. 일부 구현예에서, 지질은 인지질 에테르이다. 일부 구현예에서, 극성 헤드는 콜린, 포스파티딜콜린, 스핑고미엘린, 포스포에탄올아민 기, 올리고당 잔기, 당 잔기, 포스파티딜 세린 또는 포스파티딜 이노시톨을 포함한다. 일부 구현예에서, 당은 글리세롤이다. 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 합텐, poly(his) tag, Strep-tag, FLAG-tag, VS-tag, Myc-tag, HA-tag, NE-tag, 비오틴, 디곡시제닌, 디니트로페놀 또는 플루오레세인을 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 기는 탄소 알킬 사슬을 포함하고, 여기서 탄소 알킬 사슬은 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 사슬 또는 전술한 값 중 임의의 2개에 의해 정의된 범위 내에 있는 임의의 수를 포함한다. 일부 구현예에서, 탄소 사슬 사슬은 8-12, 12-14, 14-16, 또는 16-22개의 탄소와 같은 8-22개의 탄소를 포함한다. 일부 구현예에서, 극성 헤드 기는 포스포콜린, 피페리딘 모이어티 또는 트리메틸아르세노-에틸-포스페이트 모이어

티를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질은 극성 헤드 기로부터 표적화 모이어티를 분리하는 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 PEG 스페이서, 합텐 (2x) 스페이서, 합텐 (3x) 스페이서, 합텐 (4x) 스페이서, 합텐 (5x) 스페이서, 또는 알칸 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 폴리(카르복시베타인), 펩티드, 폴리글리시돌, 폴리에틸렌, 폴리무수물, 폴리포스포에스테르, 폴리카프로락톤 또는 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함한다. 일부 구현예에서, PEG 스페이서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 PEG 분자, 또는 임의의 2개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 내에 있는 임의의 양의 PEG 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질은 암세포와 같은 표적 세포의 지질 이중층에 삽입된다.

[0192] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 용어 "항체"는 본원에 사용된 바와 같이, 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 온전한 면역글로불린일 수 있고 온전한 면역글로불린의 면역 반응성 부분일 수 있다. 이 용어는 가장 넓은 의미로 사용되고 단편 항원-결합 (Fab) 단편, F(ab')2 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG (rIgG) 단편을 포함한 온전한 항체 및 기능적 (항원-결합) 항체 단편, 단일 사슬 가변 단편 (scFv), 디아바디, 및 단일 도메인 항체 (예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편을 포함한 단일 사슬 항체 단편을 포함한 다클론 및 단일클론 항체를 포함한다. 이 용어는 면역 글로불린의 유전적으로 조작되고/되거나 달리 변형된 형태, 예컨데 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체, 및 이종접합 항체, 다중 특이적, 예를 들어, 이중 특이적, 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디, 탠덤 di-scFv, 탠덤 tri-scFv을 포함한다. 달리 언급하지 않는 한, 용어 "항체"는 이의 기능적 항체 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 IgG 및 이의 서브클래스, IgM, IgE, IgA, 및 IgD을 포함하는 임의의 클래스 또는 서브클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전장 항체를 포함한다. 용어 "항체 단편"은 무손상 항체의 일부를 지칭하며 무손상 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예에는 단편 항원-결합 (Fab) 단편, F(ab')2 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG (rIgG) 단편, 단일 사슬 가변 단편 (scFv), 단일 도메인 항체 (예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편, 디아바디, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한 단일 사슬 항체 단편이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 항체 단편은 scFv이다. 항체 또는 이의 결합 단편의 비제한적인 예에는 단일클론 항체, 이중특이적 항체, Fab, Fab2, Fab3, scFv, Bis-scFv, 미니바디, 트리아바디, 디아바디, 테트라바디, VhH 도메인, V-NAR 도메인, IgNAR, 및 카멜 Ig가 있다. 항체의 추가 예에는 IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgM, IgE, IgD, 및 IgA가 있다. 항체의 비제한적인 예는 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체를 포함한다. 재조합 항체의 비제한적인 예는 종양 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.

[0193] 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 인지질 에테르 (PLE)를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 엽산을 포함한다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 PLE에 접합된 HPF를 포함한다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 HPF-FITC-PEG3-C18-알킬인지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 HPF-{링커}-에루포신을 포함한다.

[0194] 본원에 사용된 바와 같이, "합텐"은 키메라 항원 수용체 등과 같은 수용체에 의해 특이적으로 인식될 수 있는 임의의 모이어티를 지칭한다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 2, 3, 4, 5, 6, 또는 그 이상의 합텐과 같이 둘 이상의 합텐을 함유한다. 합텐은 서로 같거나 다를 수 있다. 일반적으로 합텐 (또는 합텐들)은 직접적으로 또는 스페이서를 통해 표적화 모이어티에 공유적으로 연결된다. 여러 유형의 "스페이서"가, 폴리(카르복시베타인), 펩티드, 폴리글리시돌, 폴리에틸렌, 폴리무수물, 폴리포스포에스테르, 폴리카프로락톤, 폴리(에틸렌 옥사이드), PEG 스페이서, 작은 펩티드 또는 알칸 사슬을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 본원에 기재된 구현예와 함께 사용하기 위해 고려된다. 일부 구현예에서, 알칸 스페이서는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 18개의 탄소, 또는 임의의 2개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 사이에 있는 임의의 수의 탄소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 스페이서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21개의 PEG 분자 또는 임의의 2개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 내에 있는 임의의 양의 PEG 분자를 포함한다.

[0195] 다양한 소분자 합텐이 당업계에 공지되어 있다. 본 개시내용의 조성물 및 방법에 사용하기 위한 예시적인 합테는 국제 특허 출원 공보 제 WO2018148224호에 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 당업계에 공지된 항-합텐 항체 생산 기술을 이용하여 새로운 합텐을 선택하고 그 합텐에 특이적인 항체를 생성하는 것을 고려한다. 일부 구현예에서, 합텐은 플루오레세인을 포함한다. 재조합 인간 항체 E2는 플루오레세인에 결합할 수 있는 항체이다. 일부 구현예에서, 합텐은 플루오레세인을 포함하고, 합텐-결합 수용체는 항-플루오레세인 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 예를 들어 항체 E2을 포함한다. 일부 구

현예에서, 합텐은 2,4-디니트로페놀 (DNP)을 포함한다.

[0196] 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 합텐에 공유적으로 연결된 하나 이상의 차폐 모이어티 (masking moieties)를 포함하여, 적어도 하나의 합텐 및 적어도 하나의 차폐 모이어티를 포함하는 "차폐 합텐 (masked hapten)"을 생성한다. "차폐 모이어티"는 차폐되지 않은 형태의 합텐에 일반적으로 결합할 수 있는 리간드 또는 수용체의 파폐된 형태의 합텐에 대한 결합을 방지하거나 억제하는 화학적 모이어티이다. 차폐 모이어티는 합텐에 특이적인 합텐-결합 수용체 (예를 들어, 키메라 항원 수용체)의 결합 및 인식을 차단함으로써 합텐의 인식을 방지하는 보호 기를 포함할 수 있다. 어댑터 분자가 종양 환경 또는 반응성 산소 종의 부위에 존재하는 세포 내로 혼입될 때, 차폐 모이어티는 자가 절단될 수 있으므로 키메라 항원 수용체에 의한 합텐의 결합 및 인식을 허용한다. 일부 구현예에서, 표적화 모이어티는 인지질 에테르인 지질이다. 일부 구현예에서, 차폐 모이어티는 페놀성 하이드록실 기 또는 PEG를 포함한다. 일부 구현예에서, 페놀성 하이드록실 기는 플루오레세인의 크산텐 모이어티에 있는 하이드록실에 결합된다. 일부 구현예에서, 차폐 모이어티는 종양 미세환경에서 특이적으로 절단 가능하도록 선택적으로 구성되는 절단 가능한 모이어티에 의해 어댑터 분자에 결합된다. 일부 구현예에서, 종양 미세환경에서 절단 가능하도록 구성된 절단 가능한 모이어티는 반응성 산소종 반응, 산성 pH, 저산소증 또는 니트로실화에 의해 절단된다. 일부 구현예에서, 인지질 에테르는 합텐을 포함하고 CAR은 상기 합텐과의 상호작용을 통해 상기 인지질 에테르에 연결된다. 일부 구현예에서, 인지질 에테르는 극성 헤드 기 및 탄소 알킬 사슬을 포함한다. 일부 구현예에서, 탄소 알킬 사슬은 적어도 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22개의 탄소 또는 임의의 2개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 내에 있는 임의의 수를 포함한다. 일부 구현예에서, 탄소 알킬 사슬은 8-12, 12-14, 14-16, 또는 16-22개의 탄소와 같은 8-22개의 탄소를 포함한다. 일부 구현예에서, 차폐 모이어티는 조성물이 산성 환경 내에 있을 때 제거된다. 일부 구현예에서, 산성 환경은 pH 또는 4, 5, 6 또는 6.5 또는 임의의 2개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 사이의 임의의 pH를 포함한다. 일부 구현예에서, 차폐 모이어티는 니트로실화에 의해 제거된다.

[0197] 일부 구현예에서, 차폐 합텐은 합텐으로부터 차폐 모이어티를 제거하는 화학 반응을 허용하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 차폐 합텐은 반응성 산소 종이 합텐으로부터 차폐 모이어티를 제거하는 것을 허용하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 차폐 합텐은 하이드록시페닐기를 포함한다. 일부 구현예에서, 차폐 모이어티는 2,4-디니트로페놀 (DNP) 기를 포함한다. 일부 구현예에서, 합텐은 플루오레세인을 포함한다. 일부 구현예에서, 차폐 합텐은 하이드록시페닐 플루오레세인 (HPF)을 포함한다. 일부 구현예에서, 차폐 합텐은 플루오레세인-DNP를 포함한다.

[0198] **합텐-결합 수용체**

[0199] 본 개시내용은 또한 어댑터 분자에 결합하는 수용체, 특히 어댑터 분자에 포함된 합텐에 결합하는 수용체를 제공한다. 합텐 및 어댑터 분자는 전술한 섹션에 기재된 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 합텐에 자연적으로 결합하는 세포 표면 수용체이다. 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 부분적으로 또는 전체적으로 합성이다. 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 재조합 단백질이다. 일부 구현예에서, 합텐 결합 수용체는 키메라 수용체이다.

[0200] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 키메라 항원 수용체이다. 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "키메라 T 세포 수용체"는 분자에 결합하는 항체 또는 다른 단백질 서열의 리간드 결합 도메인, 막횡단 도메인, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인, 및 하나 이상의 공동 자극 도메인을 포함하는 합성적으로 설계된 수용체를 지칭한다. 리간드 결합 도메인은 스페이서 도메인을 통해 T 세포 또는 다른 수용체의 하나 이상의 세포내 신호 전달 도메인, 예컨데 공동 자극 도메인에 연결된다. 키메라 수용체는 또한 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 키메라 면역수용체 및 키메라 항원 수용체 (CAR)로 지칭될 수 있다. 이러한 CAR은 면역 수용체 세포의 임의의 특이성을 접목할 수 있는 조작된 수용체이다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체에 대한 스페이서는 CAR에 대한 원하는 결합 특성을 달성하기 위해 (예를 들어, 스페이서 내의 아미노산의 특정 길이에 대해) 선택된다. 다양한 길이의 스페이서를 갖는, 예를 들어 세포 상에 존재하는 CAR은 이어서 CAR이 향하는 어댑터 분자 및/또는 합텐에 결합하거나 상호작용하는 능력에 대해 스크리닝 된다.

[0201] 본원의 일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-I (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이의 일부로부터 유래한다.

[0202] 일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의 공동-자극 도메인을 포함한다. "공동-자극 도메인"은 예를 들어 TCR/CD3 복합체의 CD3 제타 사슬에 의해 제공되는 1차 신호 외에 활성화, 증식, 분화, 사이토카인 분비 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는T 세포 반응을 매개하는 신호를 T 세포에 제공하는 신호 모이어티를 의미하며, 다. 공동-자

극 도메인은 CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-I (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드의 전부 또는 일부를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 공동-자극 도메인은 활성화, 증식, 분화 및 사이토카인 분비 등을 포함하는 세포 반응을 매개하기 위해 다른 세포내 매개체와 상호작용하는 세포내 신호전달 도메인이다. 일부 구현예에서, 본원에서 공동-자극 도메인은 41bb 및 CD3zeta를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포가 제공되며, 여기서 T 세포는 어댑터 분자 상의 합텐에 특이적인 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포는 806 CAR (항- EGFR(806)(41BB-CD3zeta CAR)를 추가로 포함한다.

[0203] 일부 구현예에서, 상기 키메라 수용체는 다음과 적어도 80% 아미노산 동일성, 적어도 90% 아미노산 동일성 또는 적어도 95% 아미노산 동일성을 갖는다: SVLTQPSSVSAAPGQKVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSEFLFGTGTKLTVLGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSFSMSWVRQAPGGGLEWVAGLSARSSLTHYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRVEDTAVYYCARRSYDSSGYWGHFYSYMDVWGQGTLVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 53), 또는 동일한 상보성 결정 영역을 공유하는 이의 변이체.

[0204] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 CD28 막횡단 스팬 및 짧은 IgG4 링커를 통한 4-1BB 제타 신호전달 꼬리에 접합된 항-FITC scFv를 포함한다.

[0205] 항-FITC scFv를 포함하는 예시적인 키메라 항원 수용체는 미국 특허 제 63/052,806호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0206] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 항체의 합텐-특이적 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 단편은 Fab 단편 또는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)을 포함한다. 일부 구현예에서, 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체는 합텐-특이적 키메라 항원 수용체를 포함한다.

[0207] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 T 세포 수용체 (TCR) 또는 이의 기능적 부분이다. "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 주요 조직 적합성 복합 분자에 결합된 항원의 단편을 인식하는 것을 담당하는 T 림프구 또는 T 세포의 표면에서 발견되는 분자를 지칭한다.

[0208] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 이량체화 활성화 수용체 개시 복합체 (DARIC)이다. DARIC는 각각 별도의 융합 단백질로 발현죄지만 세포 표면에서 두 기능적 성분의 재결합을 위한 세포외 다량체화 메커니즘 (브리징 인자)을 포함하는 결합 성분 및 신호전달 성분을 제공한다 (그 전체가 참고로 본원에 명시적으로 포함되는 미국 특허 출원 제2016/0311901호 참조). 중요하게도, DARIC 시스템의 브리징 인자는 자체적으로 중요한 신호를 생성하지 않는 이종이량체 수용체 복합체를 형성한다. 기재된 DARIC 복합체는 다른 DARIC 복합체와의 추가 공동 국소화 후에 생리학적으로 관련된 신호만 개시한다. 따라서, 이들은 (예를 들어 DARIC 성분 중 하나에 혼입된 결합 도메인에 의해 결합된 리간드를 발현하는 종양 세포와의 접촉에 의한) DARIC 복합체의 추가 다량체화를 위한 메커니즘 없이 원하는 세포 유형의 선택적 확장을 허용하지 않는다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같이, 일부 구현예에서, DARIC 성분에 혼입된 결합 도메인은 본원에 개시된 바와 같은 어댑터 분자에 포함된 합텐에 결합한다.

[0209] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체의 합텐-결합 부분은 항체의 항원-결합 부분 또는 항원-결합 항체 유도체를 포함할 수 있다. 항체의 항원-결합 부분 또는 유도체는 Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, scFv, 디아바디, 선형 항체, 단일 쇄 항체, 미니바디 등일 수 있다. 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체의 합텐-결합 부분은 DARPin 또는 센티린을 포함할 수 있다.

[0210] 합텐-결합 수용체는 질환 또는 장애와 관련된 분자에 결합할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 분자는 어댑터 분자에 포함된 합텐일 수 있다. 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체가 결합하거나 상호작용하는 합텐은 기재, 예컨데 막, 비드, 또는 지지체 (예를 들어, 웰) 또는 결합제, 예컨데 지질 (예를 들어, PLE), 합텐, 리간드, 또는 항체, 또는 이의 결합 단편 상에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 암 세포에 존재하는 항원에 대한 특이성을 갖는 결합제이다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 바이러스 또는 박테리아와 같은 병원체에 대해 특이성을 갖는 결합제이다. 하나의 접근법에 의해, 원하는 합텐을 포함하는 기질 또는 어댑터 분자는 상기 합텐에 특이적인 합텐-결합 수용체를 포함하는 복수의 세포와 접촉하고 기질 또는 결합제 상에 존재하는 합텐에 대해 합텐-결합 수용체를 포함하는 세포의 결합 수준 또는 양이 결정된다. 이러한 결합의 평가는 어댑터 분자에

결합된 세포에 대한 염색 또는 형광 평가 또는 형광 소실을 포함할 수 있다. 다시 말하면, 다양한 스페이서 길이와 같은 합텐-결합 수용체 구조에 대한 변형은 이러한 방식으로 평가될 수 있다. 일부 접근법에서, 표적 세포 또한 제공되며, 방법은 표적화 모이어티 및 합텐을 포함하는 어댑터 분자에 특이적인 합텐-결합 수용체를 포함하는 T 세포와 같은 세포를 암 세포 또는 박테리아 세포 또는 표적 바이러스와 같은 표적 세포의 존재 하에 접촉시키는 단계, 및 합텐-결합 수용체를 포함하는 세포의 어댑터 분자에 대한 결합을 평가하는 단계 및/또는 합텐-결합 수용체를 포함하는 세포의 표적 세포 또는 표적 바이러스에 대한 결합을 평가하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 합텐-결합 수용체의 다른 요소의 변이는 특정 에피토프 또는 항원에 대해 더 강한 결합 친화성을 유도할 수 있다.

[0211] 본원에 기재된 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 종양 또는 암 세포를 표적으로 하는 지질 또는 펩티드에 특이적이며, 여기서 지질 또는 펩티드는 합텐을 포함하고 합텐-결합 수용체는 상기 합텐과의 상호작용을 통해 상기 지질에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질은 인지질 에테르이다. 본원에 기재된 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 인지질 에테르에 특이적이며, 여기서 인지질 에테르는 상기 합텐과의 상호작용을 통해 상기 인지질 에테르에 특이적으로 결합한다.

[0212] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 항체 또는 이의 결합 단편에 부착된 합텐에 특이적이며, 여기서 합텐-결합 수용체는 상기 합텐과의 상호작용을 통해 상기 항체 또는 이의 결합 단편에 특이적으로 결합한다. 상기 항체 또는 이의 겨합 단편에 접합될 수 있는 예시적인 합텐은 poly(his) tag, Strep-tag, FLAG-tag, VS-tag, Myc-tag, HA-tag, NE-tag, 비오틴, 디곡시제닌, 디니트로페놀, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질, 주황색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 원적색 형광 단백질, 또는 플루오레세인 (예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC))을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 암 세포 또는 병원체 (예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 병원체)에 존재하는 항원 또는 리간드에 특이적이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 종양 세포, 바이러스, 바람직하게는 만성 바이러스 (예를 들어, HBV 또는 HCV와 같은 간염 바이러스, 또는 HIV), 또는 박테리아 세포에 특이적이다.

[0213] 일부 구현예에서, 합텐-결합 수용체는 막횡단 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 막횡단 도메인은 막에 키메라 수용체의 고정을 제공한다.

[0214] 일부 구현예에서, 복합체가 제공되고, 여기서 복합체는 지질에 결합된 결합 수용체를 포함하고, 여기서 지질은 합텐을 포함하고 합텐-결합 수용체는 상기 합텐과의 상호작용을 통해 상기 지질에 결합된다.

[0215] 일부 구현예에서, 복합체가 제공되고, 여기서 복합체는 항체 또는 이의 결합 단편에 연결된 합텐-결합 수용체를 포함하고, 여기서 항체 또는 이의 결합 단편은 합텐 (예를 들어, poly(his) tag, Strep-tag, FLAG-tag, VS-tag, Myc-tag, HA-tag, NE-tag, 비오틴, 디곡시제닌, 디니트로페놀, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질, 주황색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 원적색 형광 단백질, 또는 플루오레세인 (예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC))를 포함하고, 합텐-결합 수용체는 상기 합텐과 상호작용을 통해 상기 항체 또는 이의 결합 단편에 연결된다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 암 세포 또는 병원체 (예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 병원체) 상에 존재하는 항원 또는 리간드에 추가로 연결된다. 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 종양 세포, 바이러스, 바람직하게는 만성 바이러스 (예를 들어, HBV 또는 HCV와 같은 간염 바이러스, 또는 HIV), 또는 박테리아 세포에 존재하는 항원 또는 리간드에 연결된다. 일부 구현예에서, 합텐은 암 세포 또는 병원체 (예를 들어, 바이러스 또는 박테리아 세포)에 특이적인 항체 또는 이의 결합 단편 상에 존재하고, 상기 합텐은 합텐-결합 수용체를 갖는 세포가 암 세포 또는 병원체로 다시 향하도록 세포 (예를 들어, T 세포)의 표면에 존재하는 합텐-결합 수용체에 의해 결합된다.

[0216] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 합텐-결합 수용체 또는 T 세포 활성화제 단백질은 면역 세포에 면역 억제제 또는 항-증식제에 대한 내성을 부여한다. 일부 경우에, 렌티바이러스 벡터는 면역 억제제 또는 항-증식제에 대한 내성을 형질도입된 세포에 부여하여 표적 세포의 선택적 확장을 촉진함으로써 표적 세포의 선택적 확장을 촉진한다. 본 개시내용은 면역 억제제 또는 항-증식제에 대한 내성을 부여하는 임의의 핵산 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 제공한다. 면역 억제제 또는 항-증식제의 예에는 라파 마이신 또는 이의 유도체, 라팔로그 또는 이의 유도체, 타크로리무스 또는 이의 유도체, 사이클로스포린 또는 이의 유도체, 메토트렉세이트 또는 이의 유도체, 및 미코페놀레이트 모페틸 (MMF) 또는 이의 유도체가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 다양한 내성 유전자가 당업계에 공지되어 있다. 라파마이신에 대한 내성은 mTOR 도메인에서 발견되고 FKBP-라파마이신 복합체의 표적으로 알려진 단백질 도메인 FRb를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 부여될 수 있다. 타크로리무스에 대한 내성은 칼시뉴린 돌연변이 CNa22 또는 칼시뉴린 돌연변이 CNb30을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서

열에 의해 부여될 수 있다. 사이클로스포린에 대한 내성은 칼시뉴린 돌연변이 CNa12 또는 칼시뉴린 돌연변이 CNb30을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 부여될 수 있다. 이러한 칼시뉴린 돌연변이는 문헌 [Brewin et al. (2009) *Blood* 114:4792-803]에 기술되어 있다. 메토트렉세이트에 대한 내성은 다양한 돌연변이 형태의 디-하이드로폴레이트 환원효소 (DHFR), 문헌 [Volpato et al. (2011) *J Mol Recognition* 24:188-198]에 의해 제공될 수 있고, MMF에 대한 내성은 다양한 형태의 이노신 모노포스페이트 탈수소효소 (IMPDH), 문헌 [Yam et al. (2006) *Mol Ther* 14:236-244]에 의해 제공될 수 있다.

[0217] 면역 억제제 또는 항-증식제 (예를 들어, 면역 억제 약물)는 일반적으로 ACT 전, 중, 및/또는 후에 사용된다. 일부 경우에, 면역 억제제를 사용하여 치료 결과를 개선할 수 있다. 일부 경우에, 면역 억제제를 사용하면 제한 없이 급성 이식편대숙주병, 만성 이식편대숙주병 및 이식 후 림프증식성질환과 같은 치료의 부작용을 감소시킬 수 있다. 본 개시내용은 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 세포에 면역 억제 약물에 대한 내성을 부여하는 본 개시내용의 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 본 개시내용의 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는 임의의 방법과 함께 면역 억제 약물을 사용하는 것을 고려한다.

[0218] **폴리뉴클레오티드**

[0219] 본 개시내용은 또한 개시된 형질도입 인핸서, T 세포 활성화제 단백질, 어댑터 분자, 및 합텐-결합 수용체를 암호화하는 핵산 및 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 핵산은 전술한 단백질 중 임의의 것을 암호화하는 복수의 서열을 포함하는 작제물의 형태일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", 및 "핵산"이라는 용어는 서로 동의어로 사용된다.

[0220] 수 많은 상이한 폴리뉴클레오티드 및 핵산이 유전자 코드의 퇴화의 결과로서 동일한 폴리펩티드를 암호화할 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한, 당업자는 일상적인 기술을 사용하여 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오티드 치환을 수행하여 폴리펩티드가 발현될 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영할 수 있음을 이해해야 한다.

[0221] 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산은 또한 합성 또는 변형된 뉴클레오티드를 그 안에 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 대한 다수의 상이한 유형의 변형이 당업계에 공지되어 있다. 여기에는 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 백본, 분자의 3' 및/또는 5' 말단에 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 추가가 포함된다. 본원에 기재된 바와 같은 용도를 위해, 폴리뉴클레오티드는 당업계에서 이용 가능한 임의의 방법에 의해 변형될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변형은 관심 있는 폴리뉴클레오티드의 생체내 활성 또는 수명을 증진시키기 위해 수행될 수 있다.

[0222] 뉴클레오티드 서열과 관련하여 용어 "변이체", "상동체" 또는 "유도체"는 서열로부터 또는 서열에 하나 (또는 그 이상)의 핵산을 임의로 치환, 변이, 변형, 대체, 삭제 또는 추가하는 것을 포함한다. 핵산은 미토겐 형질도입 인핸서를 암호화하는 하나 이상의 서열 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서를 암호화하는 하나 이상의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 절단 부위는 자가 절단될 수 있으므로, 폴리펩티드가 생성될 때 절단 부위는 임의의 외부 절단 활성의 필요 없이 수용체 성분 및 신호전달 성분으로 즉시 절단된다.

[0223] 구제역 바이러스 (FMDV) 2a 자가-절단 펩티드 및 다양한 변이체 및 2A-유사 펩티드를 비롯한 다양한 자가-절단 부위가 공지되어 있다. 펩티드는 SEQ ID NO. 51 또는 52로 나타낸 서열을 가질 수 있다.

[0224] SEQ ID NO: 51: RAEGRGSLLTCGDVEENPGP.

[0225] SEQ ID NO: 52: QCTNYALLKLAGDVESNPGP.

[0226] 공동-발현 서열은 내부 리보솜 진입 서열 (IRES)일 수 있다. 공동-발현 서열은 내부 프로모터일 수 있다.

[0227] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 그것으로 형질도입된 면역 세포에 항혈관신생제에 대한 내성을 부여하는 단백질을 암호화한다. 폴리뉴클레오티드는 그것으로 형질도입된 면역 세포에 항혈관신생제에 대한 내성을 부여하는 단백질을 암호화한다.

[0228] **바이러스 입자 태깅 단백질**

[0229] 바이러스 벡터의 바이러스 외피는 또한 포획 모이어티 및 막횡단 도메인에 결합하는 결합 도메인을 포함하는 태깅 단백질을 포함할 수 있다.

[0230] 태깅 단백질은 포획 모이어티; 스페이서; 및 막횡단 도메인에 결합하는 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0231] 태깅 단백질은 포획 모이어티에 대한 태깅 단백질의 결합을 통해 세포 상청액으로부터 바이러스 벡터의 정제를 용이하게 한다. '결합 도메인'은 표적 개체, 예를 들어 포획 모이어티를 인식하고 특이적으로 결합할 수 있는 개체, 예를 들어 에피토프를 지칭한다. 결합 도메인은 포획 모이어티에 특이적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 예를 들어, 결합 도메인은 포획 모이어티에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 에피토프를 포함할 수 있다. 결합 도메인이 하나 이상의 에피토프를 포함하는 경우, 각 에피토프는 본원에 기재된 바와 같이 링커 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0232] 결합 도메인은 결합 도메인과 비교하여 포획 모이어티에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖는 개체를 추가할 시 포획 모이어티로부터 방출될 수 있다.

[0233] 결합 도메인은 하나 이상의 스트렙타비딘-결합 에피토프(들)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 결합 도메인은 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 스트렙타비딘-결합 에피토프를 포함할 수 있다.

[0234] 스트렙타비딘은 박테리아 스트렙토마이세스 아비디니 (bacterium Streptomyces avidinii)에서 정제된 52.8 kDa 단백질이다. 스트렙타비딘 동종사량체는 해리 상수 (Kd) ~ 10"15 M 으로 비오틴 (비타민 B7 또는 비타민 H)에 대해 매우 높은 친화도를 갖는다. 스트렙타비딘은 당업계에 잘 알려져 있으며 유기 용매, 변성제, 단백질 분해효소, 및 극한의 온도 및 pH에 대한 스트렙타비딘-비오틴 복합체의 내성으로 인해 분자 생물학 및 바이오나노기술에서 광범위하게 사용된다. 강력한 스트렙타비딘-비오틴 결합은 다양한 생체 분자를 서로 부착하거나 고체 지지체에 부착하는데 사용할 수 있다. 그러나 스트렙타비딘-비오틴 상호작용을 깨기 위해서는 엄격한 조건이 필요하며, 이는 정제 대상 단백질을 변성시킬 수 있다.

[0235] 결합 도메인은 예를 들어 비오틴 모방체일 수 있다. '비오틴 모방체'는 스트렙타비딘에 특이적으로 결합하는 짧은 펩티드 서열 (예를 들어 6 내지 20, 6 내지 18, 8 내지 18 또는 8 내지 15개의 아미노산)을 지칭할 수 있다. 전술한 바와 같이, 비오틴/스트렙타비딘 상호작용의 친화도는 매우 높다. 따라서, 결합 도메인이 비오틴 자체에 비해 스트렙타비딘에 대해 더 낮은 친화도를 갖는 비오틴 모방체를 포함할 수 있다는 것이 본 발명의 이점이다.

[0236] 특히, 비오틴 모방체는 비오틴보다 더 낮은 결합 친화도로 스트렙타비딘에 결합할 수 있으므로, 비오틴은 스트렙타비딘-포획 레트로바이러스 벡터를 용리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 비오틴 모방체는 1 nM 내지 100uM의 Kd를 갖는 스트렙타비딘에 결합할 수 있다.

[0237] 비오틴 모방체는 다음의 그룹으로부터 선택될 수 있다: Streptagll, Flankedccstreptag 및 ccstreptag. 결합 도메인은 하나 이상의 비오틴 모방체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 결합 도메인은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 비오틴 모방체를 포함할 수 있다. 결합 도메인이 하나 이상의 비오틴 모방체를 포함하는 경우, 각각의 모방체는 동일하거나 상이한 모방체일 수 있다.

[0238] 본 개시내용은 또한 정제될 수 있는 바이러스 입자 및 이의 정제 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터의 바이러스 외피는 또한 포획 모이어티에 결합하는 결합 도메인; 스페이서; 및 막횡단 도메인을 포함하는 태깅 단백질을 포함할 수 있으며, 이 태깅 단백질은 포획 모이어티에 대한 태깅 단백질의 결합을 통해 세포 상청액으로부터 바이러스 벡터의 정제를 용이하게 한다.

[0239] 태깅 단백질의 결합 도메인은 하나 이상의 스트렙타비딘-결합 에피토프(들)를 포함한다. 스트렙타비딘-결합 에피토프(들)는 비오틴보다 낮은 친화도로 스트렙타비딘에 결합하는 비오틴 모방체와 같은 비오틴 모방체일 수 있으므로, 비오틴은 패키징 세포에 의해 생성된 스트렙타비딘-포획 레트로바이러스 벡터를 용출하는데 사용될 수 있다. 적합한 비오틴 모방체의 예는 다음을 포함한다: Streptagll, Flankedccstretag, 및 ccstreptag. 본 발명의 제1 측면의 바이러스 벡터는 T-세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 바이러스-유사 입자 (VLP)일 수 있다.

[0240] **생산/패키징 세포주**

[0241] 본 개시내용은 본 개시내용에 따른 바이러스 입자의 생산을 위한 숙주 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 세포 표면에서 미토겐 형질도입 인핸서 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서를 발현한다. 숙주 세포는 전술한 구현예에 따른 바이러스 벡터의 생산을 위한 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 바이러스 입자의 정제에 유용한 태깅 단백질을 포함할 수 있다.

[0242] 숙주 세포는 패키징 세포일 수 있고 다음의 유전자 중 하나 이상을 포함할 수 있다: gag, pol, env 및 rev. 레트로바이러스 벡터용 패키징 세포는 gag, pol 및 env 유전자를 포함할 수 있다. 렌티바이러스 벡터용 패키징 세포는 gag, pol, env 및 rev 유전자를 포함할 수 있다.

[0243] 숙주 세포는 생산자 세포일 수 있고 gag, pol, env 및 임의로 rev 유전자 및 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 유전자 요법에 사용하기 위한 전형적인 재조합 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에서, 하나 이상의 gag-pol 및 env 단백질 암호화 영역의 적어도 일부는 바이러스로부터 제거되고 패키징 세포에 의해 제공될 수 있다. 이것은 바이러스가 게놈을 숙주 게놈에 혼입시킬 수 있지만 변형된 바이러스 게놈은 구조적 단백질의 부족으로 인해 자체적으로 증식할 수 없으므로 바이러스 벡터 복제-결손을 만든다.

[0244] 패키징 세포는 일정량의 바이러스 벡터를 증식 및 분리하는데 사용되며, 즉 표적 세포의 형질도입을 위한 레트로바이러스 벡터의 적절한 역가를 제조하는 데 사용된다.

[0245] 일부 경우에, 증식 및 분리는 레트로 바이러스 gagpol 및 env (및 렌티바이러스의 경우 rev) 유전자의 분리 및 패키징 세포주를 생성하기 위해 숙주 세포로의 개별 도입을 수반할 수 있다. 패키징 세포주는 레트로바이러스 DNA 패키징에 필요한 당백질을 생성하지만 psi 영역이 없기 때문에 캡슐화를 일으키지 못한다. 그러나, psi 영역을 갖는 재조합 벡터가 패키징 세포주에 도입될 때, 헬퍼 단백질은 psi-양성 재조합 벡터를 패키징하여 재조합 바이러스 스톡을 생성할 수 있다.

[0246] 이용 가능한 패키징 라인의 요약은 문헌 ["Retroviruses" (1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 449)]에 제시된다.

[0247] 패키징 세포는 또한 gag, pol 및 env (및 렌티바이러스 벡터의 경우 rev) 바이러스 암호화 영역이 독립적으로 패키징 세포주로 형질감염되는 별도의 발현 플라스미드에서 수행되는 패키징 세포가 개발되었으며, 야생형 바이러스를 생산하는데 있어 3회의 재조합 이벤트가 필요하다.

[0248] 일시적 형질감염은 안정한 벡터-생성 세포주를 생성하는 데 필요한 긴 시간을 방지하며 벡터 또는 레트로바이러스 패키징 성분이 세포에 독성인 경우에 사용된다. 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터를 생성하는 데 전형적으로 사용되는 성분은 Gag/Pol 단백질을 암호화하는 플라스미드, Env 단백질 (및 렌티바이러스 벡터의 경우 rev 단백질)을 암호화하는 플라스미드, 및 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터 게놈을 포함한다. 벡터 생산에는 이러한 성분 중 하나 이상을 다른 필요한 성분을 함유하는 세포 내로 일시적 형질감염시키는 것이 포함된다. 본 발명의 패키징 세포는 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터 입자를 생성할 수 있는 임의의 포유류 세포 유형일 수 있다. 패키징 세포에는 현탁액 중에서 성장하고 혈청 없이 성장하도록 맞춰진 293T-세포 또는 293T-세포의 변이체일 수 있다.

[0249] 패키징 세포는 다음으로 일시적 형질감염에 의해 만들어질 수 있다:

[0250] a) 전달 백터

[0251] b) gagpol 발현 벡터

[0252] c) env 발현 벡터. env 유전자는 이종성일 수 있고, 위형 레트로바이러스 벡터를 유도한다. 예를 들어, env 유전자는 RD1 14 또는 이의 변이체 중 하나, VSV-G, 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GALV), 양종향성 외피 또는 홍역 바이러스 외피 또는 개코 원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질로부터 유래할 수 있다.

[0253] 렌티바이러스 벡터의 경우, rev 벡터에 의한 일시적 형질감염이 또한 수행된다.

[0254] 본 개시내용은 전술한 구현예에 따른 바이러스 입자를 발현하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 세포 표면에서 하나 이상의 형질도입 인핸서를 발현한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 세포 표면에서

[0255] (a) 미토겐 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 미토겐 형질도입 인핸서; 및/또는

[0256] (b) 사이토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서;를 발현하는 숙주 세포를 제공하여

[0257] 패키징 세포에 의해 생성된 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 전술한 구현예에 기재된 바와 같다.

[0258] 일부 구현예에서, 숙수 제포는 또한 세포 표면에서 다음을 포함하는 태깅 단백질을 발현할 수 있다: 포획 모이어티에 결합하는 결합 도메인; 및 패키징 세포에 의해 생성된 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 백터가 전술한 섹션에서 설명된 특성을 갖도록 태깅 단백질이 포획 모이어티로의 태깅 단백질의 결합을 통해 세포 상청액으로부터 바이러스 벡터의 정제를 용이하게 하는 막횡단 도메인.

[0259] 태깅 단백질은 또한 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 스페이서를 포함할 수 있다.

[0260] 용어 숙주 세포는 패키징 세포 또는 생산자 세포를 설명하는데 사용될 수 있다. 패키징 세포는 다음의 유전자 중 하나 이상을 포함할 수 있다: gag, pol, env 및/또는 rev. 생산자 세포는 gag, pol, env 및 임의로 rev 유전자를 포함할 수 있고, 또한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 게놈을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 미토겐 및/또는 사이토카인 형질도입 인핸서를 안정적으로 발현하는 임의의 적합한 세포주일 수 있다. 숙주 세포는 복제 불능 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터를 생성하기 위해 전달 벡터, gagpol, env (및 렌티바이러스의 경우 rev)로 일시적으로 형질감염될 수 있다.

[0261] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 형질도입 인핸서를 암호화하는 핵산으로 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 단계를 포함하는, 상기에 따른 숙주 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 제2 측면에 따른 세포에서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 게놈을 발현하는 단계를 포함하는, 전술한 구현예에 따른 바이러스 벡터를 생성하는 방법이 제공된다.

[0262] **시스템 및 키트**

[0263] 본 개시내용은:

[0264] (a) 표적화 모이어티, 및 차폐 합텐을 포함하는 어댑터 분자; 및

[0265] (b) 복수의 재조합 레트로바이러스 입자

[0266] 를 포함하는 시스템, 치료용 시스템, 또는 조성물을 제공하며,

[0267] 여기서 차폐 합텐은 합텐에 결합된 차폐 모이어티를 포함하고,

[0268] 각각의 레트로 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로:

[0269] (i) 5' 긴 말단 반복부 (LTR) 또는 비번역 영역 (UTR),

[0270] (ii) 프로모터,

[0271] (iii) 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및

[0272] (iv) 3' LTR 또는 UTR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고,

[0273] 여기서 각각의 레트로 바이러스 입자는:

[0274] (i) 바이러스 융합 당단백질, 및

[0275] (ii) 하나 이상의 형질도입 인핸서를 포함하는 바이러스 외피를 포함하고,

[0276] 여기서 임의로 각각의 형질도입 인핸서는 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체, 및 공동-자극 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가적으로 T 세포 활성화제 단백질을 암호화하는 서열을 포함한다.

[0277] 본 개시내용은 또한 시스템 및 시스템의 사용 지침을 포함하는 키트를 제공한다.

[0278] **형질전환 면역 세포**

[0279] 본 개시내용은 전술한 구현예 중 임의의 것에 따른 바이러스 벡터와 면역 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 활성화된 형질전환 면역 세포의 제조 방법을 제공한다. 면역 세포는 생체내 또는 생체외에서 형질도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 생체외에서 숙주 세포를 분리 및 조작할 필요 없이 면역 세포가 생체내에서 형질도입되도록 살아있는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 생체외에서 조작된 다음 이를 필요로 하는 대상체에게 되돌아온다.

[0280] 면역 세포는 일반적으로 포유류 세포이고, 전형적으로 인간 세포, 더 전형적으로 1차 인간 세포, 예를 들어 동종 또는 자가 공여자 세포이다. 세포는 생물학적 샘플과 같은 샘플, 예를 들어 대상체로부터 얻거나 대상체로부터 유래된 샘플로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 분리되는 대상체는 질환 또는 병태를 갖고 있거나 세포 요법이 필요한 대상체이거나 세포 요법이 투여될 대상체이다. 일부 구현예에서 대상체는 세포가 분리, 처리 및/또는 조작되는 입양 세포 요법과 같은 특정 치료 개입이 필요한 인간이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프, 또는 림프 기관으로부터 유래하고, 면역계의 세포, 예컨데 선천 또는 후천 면역계의 세포, 예를 들어 림프구를 포함하는 골수성 또는 림프성 세포, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 다른 예시적인 세포는 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)를 포함하는 다능 및 만능 줄기 세포와 같은 줄기 세포를 포함한다.

세포는 전형적으로 대상체로부터 직접 단리되고/되거나 대상체로부터 단리되고 동결된 것과 같은 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 하나 이상의 하위 집합, 예컨데 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 이들의 하위 집단, 예컨데 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 가능성, 확장, 재순환, 국소화, 및/또는 지속 능력, 항원 특이성, 항원 수용체 유형, 특정 기관 또는 구획에서의 존재, 마커 또는 사이토카인 분피 프로파일, 및/또는 분화 정도에 의해 정의된 것과 같은 것을 포함한다.

[0281] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위 유형 및 하위 집단 중에는 나이브 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 메모리 T 세포 및 이의 하위 유형, 예컨데 줄기 세포 메모리 T (TSCM), 중추 메모리 T (TCM), 이펙터 메모리 T (TEM), 또는 말단 분화 이펙터 메모리 T 세포, 종양-침윤 림프구 (TIL), 미성숙한 T 세포, 성숙한 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-관련 불변 T (MAIT) 세포 자연 발생 및 적응 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨데 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포이다.

[0282] 일부 구현예에서, 본원에서, 제공된 세포는 세포독성 T 림프구이다. "세포독성 T 림프구" (CTL)는 예를 들어 그의 표면 상에서 CD8을 발현하는 T 림프구 (예를 들어, CD8+ T 세포)를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 이러한 세포는 바람직하게는 항원이 경험되는 "메모리" T 세포 (TM 세포)이다. 일부 구현예에서, 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 구현예에서, 전구체 T 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중추 메모리 CD8+ T 세포, 이펙터 메모리 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중추 메모리 CD4+ T 세포, 이펙터 메모리 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다.

[0283] 본원에 사용된 바와 같이, 형질전환 T 세포 또는 형질도입된 T 세포에 대한 임의의 언급, 또는 이의 용도는 또한 본원에 개시된 임의의 다른 면역 세포 유형에 적용될 수 있다.

[0284] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 외인성 핵산 분자를 포함하는 형질전환 면역 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 형질전환 면역 세포는 합텐-결합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 형질전환 면역 세포는 형질도입 인핸서를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 형질전환 면역 세포는T 세포 활성화제 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 형질전환 면역 세포는 합텐-결합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 T 세포 활성화제 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0285] **개시된 조성물로 대상체를 치료하는 방법**

[0286] 본 개시내용은 본원에 개시된 조성물, 치료용 조성물, 세포, 벡터, 및 폴리뉴클레오티드로 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료학적 유효량의 개시된 바이러스 입자를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 암을 치료하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 방법을 제공하며, 여기서 대상체는 투여 단계 전, 중 또는 후에 암세포를 합텐으로 표지하는 데 효과적인 차폐 합텐을 포함하는 어댑터 분자의 용량을 받았거나 받는 중이다. 또한, 대상체에게 유효량의 어댑터 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 종양을 치료하고/하거나 종양 세포를 사멸시키는 방법이 제공되며, 여기서 어댑터 분자는 종양 세포를 차폐 합텐으로 표지하고; 차폐 합텐은 반응성 산소 종으로 활성화되어 합텐을 생성하고; 그리고 여기서 대상체는 투여 단계 전, 중 또는 후에 임의의 전술한 구현예 중 임의의 것에 따른 레트로바이러스 입자를 받았거나 받았다.

[0287] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 전술한 구현예 중 임의의 것에 따른 치료학적 유효량의 렌티바이러스 입자를 투여함으로써 대상체의 암을 치료하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있으며, 여기서 대상체는 투여 단계 전에 표적화 모이어티 및 암 세포를 합텐으로 표지하는데 효과적인 합텐을 포함하는 어댑터 분자의 용량을 받았다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 시스템을 투여함으로써 암을 치료하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다.

[0288] 본 개시내용은 또한 전술한 구현예 중 임의의 것의 시스템을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 암을 치료하고/하거나 암세포를 사멸시키는 방법을 제공한다.

[0289] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 조성물로 암을 치료하는 방법을 제공한다. "암"은 명세서에 비추어 읽었을 때 평범하고 통상적인 의미를 가지며, 예를 들어 신체의 다른 부분을 침범하거나 퍼질 가능성이 있는 비정상적인 세포 성장과 관련된 질환 군을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 본원에 기재된

방법을 사용하여 다룰 수 잇는 대상체는 결장암, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 난소암, 피부암 (흑생종 포함), 골암, 및 뇌암 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 암을 갖는것으로 식별되거나 선택된 대상체를 포함한다. 이러한 식별 및/또는 선택은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 흑생종, 유방암, 뇌암, 편평 세포 암종, 결장암, 백혈병, 골수종 및/또는 전립선암과 같은 종양 관련 항원 또는 분자가 알려져있다. 예에는 B 세포 림프종, 유방암, 뇌암, 전립선암 및/또는 백혈병이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 발암성 폴리펩티드는 신장암, 자궁암, 결장암, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 난소암, 피부암 (흑색종 포함), 골암, 뇌암, 선암종, 췌장암, 만성 골수성 백혈병 또는 백혈병과 관련된다. 일부 구현예에서, 대상체의 암을 치료, 개선 또는 억제하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 암은 유방암, 난소암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 흑색종, 신장암, 췌장암, 교모세포종, 신경모세포종, 수모세포종, 육종, 간암, 결장암, 피부암 (흑색종 포함), 골암 또는 뇌암이다.

[0290] 일부 구현예에서, 표적 세포는 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 T 세포 또는 B 세포이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 종양 미세환경에 존재한다.

[0291] 일부 구현예에서, 형질도입된 T 세포는 어댑터 분자 조성물의 투여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36, 48, 60 또는 72시간, 또는 임의의 두 개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 내에 있는 임의의 시간 후에 대상체에게 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 조성물의 투여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 24, 36 또는 48 시간, 또는 임의의 두 개의 전술한 값에 의해 정의된 범위 내에 있는 임의의 시간 전에 대상체에게 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 대상체에게 조성물을 제공한 후 몇 초 또는 몇분 안에, 예를 들어 한시간 이내에 대상체에게 제공된다. 일부 구현예에서, 세포 및/또는 조성물의 부스트가 대상체에게 제공된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 대상체에게 직접 투여된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 T 세포와 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터와 T 세포는 별도로 투여된다. 일부 구현예에서, T 세포는 투여된 바이러스 벡터에 의해 생체내에서 활성화되고 형질도입된다.

[0292] 일부 구현예에서, 소분자, 예를 들어 화학적 화합물, 항체 요법, 예를 들어 방사성핵종, 독소 또는 약물, 수술 및/또는 방사선에 접합되거나 접합되지 않은 인간화 단일클론 항체와 같은 추가 암 요법이 제공된다.

[0293] 일부 구현예에서, 대상체는 암 치료제, 방사선, 화학요법, 또는 암 치료를 위한 약물을 포함할 수 있는 추가 암 요법을 받도록 선택된다. 일부 구현예에서, 약물은 아비라테론, 알렘투주맙, 아나스트로졸, 아프레피탄트, 삼산화비소, 아테졸리주맙, 아자시티딘, 베바시주맙, 블레오마이신, 보르테조밉, 카바지탁셀, 카페시타빈, 카보플라틴, 세툭시맙, 화학요법 약물 조합, 시스플라틴, 크리조티닙, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 데노수맙, 도세탁셀, 독소루비신, 에리불린, 에를로티닙, 에토포사이드, 에베롤리무스, 엑세메스탄, 필그라스팀, 플루오로우라실, 풀베스트란트, 젬시타빈, 이마티닙, 이미퀴모드, 이필리무맙, 익사베필론, 라파티닙, 레날리도마이드, 레트로졸, 류프롤리드, 메스나, 메토트렉세이트, 니볼루맙, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 팔로노세트론, 펨브롤리주맙, 페메트렉세드, 프레드니손, 라듐-223, 리툭시맙, 시풀류셀-T, 소라페닙, 수니티닙, 탈크 흉막내, 타목시펜, 테모졸로마이드, 템시롤리무스, 탈리도마이드, 트라스투주맙, 비노렐빈 또는 졸레드론산을 포함한다.

[0294] **투여 모드 및 용량**

[0295] 개시된 바이러스 입자, 어댑터 모듈, 및 면역 세포는 국소 또는 전신 치료가 바람직한지에 따라 다양한 방식으로 투여될 수 있다.

[0296] 입양 세포 요법의 경우, 입양 세포 요법을 위한 세포 투여 방법이 공지되어 있고 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법은 예를 들어 Gruenberg등의 미국 특허 출원 공보 제2003/0170238호; Rosenberg의 미국 특허 제4,690,915호; 문헌 [Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)]에 기재되어 있다. 예를 들어 문헌 [Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et a!. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338]를 참고한다.

[0297] 일반적으로, 투여는 국소, 비경구 또는 경장(enteral)일 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 전형적으로 비경구 투여에 적합하다. 본원에 사용된 바와 같이, 약제학적 조성물의 "비경구 투여"는 대상체의 조직의 물리적 파열 및 조직의 파열을 통한 약제학적 조성물의 투여를 특징으로 하는 임의의 투여 경로를 포함하며, 이에 따라 일반적으로 혈류 내로, 근육 내로 또는 내부 장기로의 직접 투여를 초래한다. 따라서 비경구 투여는 조성물의 주사에 의한 약제학적 조성물의 투여, 외과적 절개를 통한 조성물의 도포, 조직-관통 비-외과적 상처를 통한 조성물의 도포 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복강내, 근육내, 간내, 정맥내, 동

맥내, 척추강내, 뇌실내, 요도내, 두개내, 종양내, 활막내 주사 또는 주입; 및 신장 투석 주입 기술을 포함하지만 이에 한정되지 않는 것으로 고려된다. 바람직한 구현예에서, 본 개시내용의 조성물의 비경구 투여는 정맥내 투여를 포함한다.

[0298] 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물의 제형은 전형적으로 멸균수 또는 멸균 등장 식염수와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 조합된 활성 성분을 일반적으로 포함한다. 이러한 제형은 일시 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 주사 가능한 제형은 앰플 또는 방부가 포함된 다중-용량 용기와 같은 단위 투여 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클의 에멀젼, 페이스트 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 제형은 현탁제, 안정화제, 또는 분산제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형의 한 구현예에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전에 적합한 비히클 (예를 들어, 멸균 주사용 증류수)로 재구성하기 위해 건조 (즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다. 비경구 제형은 또한 염, 탄수화물 및 완충제 (바람직하게 pH 3 내지 9)와 같은 부형제를 함유할 수 있는 수용액을 포함하지만, 일부 적용의 경우 비경구 제형은 멸균 비수성 용액 또는 멸균 주사용 증류수와 같은 적합한 비히클과 함께 사용되는 건조 형태로 더욱 적합하게 제형화될 수 있다. 예시적인 비경구 투여 형태는 멸균 수용액, 예를 들어 수성 프로필렌 글리콜, 덱스트로스 용액 중의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 이러한 투여 형태는 원하는 경우 적절하게 완충될 수 있다. 유용한 다른 비경구 투여 가능한 제형은 미세결정질 형태 또는 리포솜 제제의 활성 성분을 포함하는 제형을 포함한다. 비경구 투여용 제형은 즉시 및/또는 변형 방출로 제형화될 수 있다. 변형 방출 제제에는 지연 방출, 지속 방출, 펄스 방출, 제어 방출, 표적 방출 및 프로그램화 방출이 포함된다.

[0299] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물에서 통상적으로 발견되는 다른 부가 성분을 추가로 함유할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 예를 들어 소양제, 수렴제, 국소 마취제 또는 항염증제와 같은 추가적인 상용성 약제학적 활성 물질을 함유할 수 있거나, 염료, 향미제, 방부제, 항산화제, 불투명화제, 증점제 및 안정화제와 같은 본 발명의 조성물의 다양한 투여 형태를 물리적으로 제형화하는데 유용한 추가 물질을 함유할 수 있다. 그러나, 이러한 물질은 첨가될 때 본 발명의 조성물의 성분의 생물학적 활성을 과도하게 방해해서는 안된다. 제형은 멸균될 수 있고, 원하는 경우 제형의 핵산(들)과 유해하게 상호작용하지 않는 보조제, 예를 들어 윤활제, 방부제, 안정제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치는 염, 완충제, 착색제, 향미제 및/또는 방향족 물질 등과 혼합될 수 있다.

[0300] 바이러스 입자, 어댑터 입자, 및/또는 면역 세포의 본 발명의 조성물은 치료학적 유효량 또는 예방적 유효량과 같은 질환 또는 병태를 치료하거나 예방하는데 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서 치료 또는 예방 효능은 치료 대상체에 대한 주기적 평가를 통해 모니터링된다. 수일 이상 반복 투여되는 경우, 병태에 따라, 원하는 질환 증상의 억제가 나타날 때까지 치료를 반복한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있으며 결정될 수 있다. 원하는 투여량은 조성물의 단일 일시 투여, 조성물의 다중 일시 투여, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0301] 특정 구현예에서, 본 개시내용에 따른 면역 세포 또는 형질전환 면역 세포를 주입하는 맥락에서, 대상체는 약 100만 내지 약 1000억 세포의 범위, 예컨데, 100만 내지 약 500억 세포 (예를 들어, 약 500만 세포, 약 2500만 세포, 약 50000만 세포, 약 10억 세포, 약 50억 세포, 약 200억 세포, 약 300억 세포, 약 400억 세포, 또는 전술한 값 중 임의의 2개 값에 의해 정의된 범위), 예컨데 약 10 약 내지 약 1000억 세포 (예를 들어, 약 2000만 세포, 약 3000만 세포, 약 4000만 세포, 약 6000만 세포, 약 7000만 세포, 약 8000만 세포, 약 9000만 세포, 약 100억 세포, 약 250억 세포, 약 500억 세포, 약 750억 세포, 약 900억 세포, 또는 전술한 값 중 임의의 2개 값에 의해 정의된 범위), 및 일부 경우에는 약 10000만 세포 내지 약 500억 세포 (예를 들어, 약 12000만 세포, 약 25000만 세포, 약 35000만 세포, 약 45000만 세포, 약 65000만 세포, 약 80000만 세포, 약 90000만 세포, 약 30억 세포, 약 300억 세포, 약 450억 세포) 또는 이들 범위 사이의 임의의 값, 및/또는 대상체의 체중 킬로그램 당 세포의 수를 투여 받는다. 예를 들어, 일부 구현예에서 세포 또는 세포 집단의 투여는 체중 1 kg 당 약 10^3 내지 약 10^9개의 세포의 투여를 포함할 수 있으며, 이들 범위 내의 모든 정수 값을 포함한다.

[0302] 바이러스 입자를 투여하는 맥락에서, 바리어스 입자의 양 및 이러한 입자의 투여 시간은 본 교시의 이점을 갖는 당업자의 이해 범위 내에 있을 것이다. 일부 구현예에서, 개시된 조성물의 치료학적 유효량의 투여는 단일 투여, 예를 들어 이러한 치료를 받는 환자에게 치료 이점을 제공하기에 충분한 수의 바이러스 입자의 단일 주사에 의해 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 이러한 조성물의 투여를 감독하는 의사가 결정할 수 있는 바와 같이 비교적 단기간 또는 비교적 장기간에 걸쳐 렌티바이러스 벡터 조성물의 다중 또는 연속 투여를 제공

받는다. 예를 들어, 포유류에게 투여되는 감염성 입자의 수는 단일 용량으로 제공되거나 2회 이상 투여로 나누어지는 약 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 또는 그 이상의 바이러스 입자/ml일 수 있으며, 이는 치료되는 특정 질환 또는 장애의 치료를 달성하는데 필요할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 특정 치료 요법의 원하는 결과를 달성하기 위해 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료 약물과 조합하여 둘 이상의 상이한 바이러스 벡터 조성물을 투여받을 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 형질전환 면역 세포와 조합하여 투여된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아직 형질도입 되지 않은 면역 세포와 함께 투여된다. 문구 "조합하여"는 짧은 기간 내에, 예를 들어 1주일, 1일, 12시간, 6시간, 1시간, 30분, 10분, 5분, 또는 1분 내에 동시에 또는 다른 시간에 포함될 수 있다.

[0303] 어댑터 분자를 투여하는 맥락에서, 용량은 표적 세포의 유형, 어댑터 분자에 포함된 표적화 모이어티, 및 어댑터 분자에 포함된 합텐 분자에 따라 달라질 것이다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 어댑더 분아에 대한 예시적인 투여량은 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg 또는 15 mg/kg를 포함하지만 이에 한정되지 않는 약 1 μg/kg 내지 약 50 mg/kg 또는 약 5 mg/kg 내지 약 15 mg/kg의 범위일 수 있다. 투여 빈도는 질환의 유형 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 병태에 따라, 당업계에 공지된 방법에 의해 측정되는 바와 같이 병태, 예를 들어 암이 치료되거나 원하는 치료 효과가 달성될 때까지 치료를 지속할 수 있다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 한번 투여된다. 일부 구현예에서, 어댑터 분자는 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 또는 1 년마다 1회 투여된다. 어댑터 분자는 본원에 개시된 바이러스 입자 및/또는 형질전환 면역 세포와 조합하여 투여될 수 있다. 문구 "조합하여"는 짧은 시간 내에, 예를 들어 1주, 1일, 12시간, 6시간, 1시간, 30분, 10분, 5분, 또는 1분 내에 동시에 또는 다른 시간에 포함될 수 있다.

[0304] ****

[0305] 본원에 언급된 모든 간행물 및 특허는 각 개별 간행물 또는 특허가 구체적으로 개별적으로 참조로 포함되는 것으로 표시된 것처럼 그 전체가 참조로 포함된다. 상충하는 경우, 본원에서의 임의의 정의를 포함하여 본 출원이 우선한다. 그러나, 본원에 인용된 참조, 기사, 간행물, 특허, 특허 공보, 및 특허 출원에 대한 언급은 이들이 유효한 선행기술을 구성하거나 세계 어느 국가에서나 공통적인 일반 지식의 일부를 형성하는 것을 인정하거나 암시하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0306] 본 설명에서, 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위, 또는 정수 범위는 달리 표시되지 않는 한 인용된 범위 내의 임의의 정수 값 및 적절한 경우 이의 분수 (예컨데 정수의 10분의 1 및 100분의 1)를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 용어 "약"은, 숫자 또는 숫자 바로 앞에 올 때, 숫자 또는 숫자의 범위가 플러스 또는 마이너스 10%임을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 단수용어 ("a" 및 "an")는 달리 명시되지 않는 한 열거된 구성요소 중 "하나 이상"을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 대안 (예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 하나, 둘 다, 또는 이들의 임의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 용어 "및/또는"은 대안 중 하나 또는 둘 다를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다 (include)" 및 "포함한다 (comprise)"는 동의어로 사용된다.

[0307] 본원에 사용된 섹션 제목은 구성적 목적만을 위한 것이며 설명된 대상을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0308] 예시적인 구현예가 제시되고 설명되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 그 안에서 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0309] **실시예**

[0310] 하기 실시예는 본원에 기재된 조성물 및 방법이 어떻게 사용하고 제조하고 평가될 수 있는지에 대한 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되며, 순전히 본 발명의 예시적인 것으로 의도되고 본 발명으로서 고려되는 범위를 제한하도록 의도되지 않는다.

[0311] **실시예 1: FITC CAR 형질도입, 농축, 및 활성화**

[0312] 이 실시예는 항원 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)의 존재 하에 CAR-발현 T 세포의 증진된 확장 및 활성화를 입증한다.

[0313] *해동 및 휴식 PBMC*

[0314] 프로토콜의 0일째에, 동결된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 37℃ 수조에서 신속하게 해동하고 9 mL의 따뜻한 RPMI-C (RPMI 1640 + P/S + 10% FBS) 배지에 천천히 첨가하였다. 그런 다음, 해동된 PBMC를 10분 동안 200 x g에서 회전시켰다. 회전 후, 배지를 흡인하고, 세포를 계수하고 250 mL 플라스크에서 약 $1x10^6$ 세포/mL의 세포 밀도로 RPMI-C 배지에 플레이팅하였다. 또한, 50 U/mL IL-2도 플라스크에 첨가하였다. 플레이팅 후, 총 살아있는 세포 수는 RPMI-C 배지를 함유하는 20 mL의 IL-2에서 2.32×10^7 세포였다.

[0315] *FITC CAR 벡터를 사용한 형질도입*

[0316] 프로토콜의 1일째에, 1×10^7 PBMC 세포를 50 mL 원뿔형 튜브에 수집하고 400 x g에서 5분 동안 회전시켰다. 그런 다음, 세포를 6-웰 플레이트에서 50 U/mL IL-2를 갖는 총 2.5 mL의 RPMI-C 배지에 2.5×10^6 세포/웰의 농도로 플레이팅 하였다. CD3-코칼 외피로 조작되고 FITC CAR-Frb-RACR 멀티시스트론 벡터를 갖는 렌티바이러스 입자를 사용하여 10의 감염 다중도 (MOI)에서 PBMC를 형질도입하였다. 형질도입을 위해 사용된 렌티바이러스 역가는 1.61×10^8 TU/mL이었고, 목표 역가는 2.5×10^7 TU/웰이었다. 각 웰에 첨가된 입자의 부피는 155 μL이었다. 형질도입된 세포를 인큐베이터에 6일 동안 유지하고 50 U/mL IL-2를 3일 마다 세포에 첨가하였다. 형질도입된 세포를 매일 모니터링하고, 세포 배지에서 주황색-황색 착색을 발달시키는 것으로 관찰되는 경우 RPMI-C 배지를 함유하는 50 U/mL IL-2를 웰에 첨가하였다.

[0317] *세포를 라파마이신으로 분할*

[0318] 프로토콜의 7일째에, 1×10^7 PBMC 세포를 15 mL 원뿔형 튜브에 수집하고 RPMI-C 배지로 세척하고 400 x g에서 5분 동안 회전시켰다. 세포를 50 U/mL IL-2를 갖는 2 mL RPMI-C 배지에서 2×10^6 세포/웰의 세포 밀도로 6-웰 플레이트 중 2개의 웰로 분할하였다. 10 nM 라파마이신을 웰 중 하나에 첨가하고 0 nM를 두 번째 웰에 첨가하였다. 라파마이신 처리 및 미처리 세포를 인큐베이터에서 4일 동안 유지시키고 50 U/mL IL-2를 3일 마다 세포에 첨가하였다. 세포를 매일 모니터링 하고, 세포 배지가 주황색-황색 착색을 발달시키는 것으로 관찰되는 경우 RPMI-C 배지 +/- 10 nM 라파마이신을 함유하는 50 U/mL IL-2를 웰에 첨가하였다.

[0319] *FITC-OVA에 의한 코팅 플레이트*

[0320] 프로토콜의 10일째에, PBS 중에, 5 μg/mL의 형광 표지된 오브알부민 (FITC-OVA) 용액을 제조하였다. 48-웰 플레이트의 웰당 125 μL의 FITC-OVA 용액을 첨가하였다. 플레이트를 알루미늄 호일에 싸서 4℃에서 밤새 용액과 함께 배양하였다.

[0321] *FITC-비오틴 비드 접합*

[0322] 프로토콜의 10일째에, 항-비오틴 MACSiBead 입자를 와동시키고 30 μg의 FITC-비오틴 1차 항체를 10×10^8 MACSiBead 입자에 첨가하였다. 0.5% BSA 및 2 nM EDTA를 갖는 PBS를 함유하는 완충액을 사용하여 총 부피를 1 mL로 만들었다.

[0323] *항원 (FITC) 자극 조건으로 세포 분할*

[0324] 프로토콜의 11일째에, 0 nM에서 배양된 4.8×10^6의 총 살아있는 세포와 10 nM 라파마이신에서 배양된 1.9×10^6의 총 살아있는 세포를 15 mL 원뿔형 튜브에 수집하고, RPMI-C 배지로 세척하고, 400 x g에서 5분 동안 회전시켰다. 세척된 세포를 IL-2가 없는 RPMI-C 배지에서 mL 당 2.5×10^6 세포의 세포 밀도로 재현탁시켰다.

[0325] FITC-OVA 용액을 처리된 플레이트로부터 흡인하고 차가운 PBS로 3회 세척하였다. 세포를 500 μL RPMI-C 배지 +/- 10 nM 라파마이신에서 48-웰 플레이트, 2.5×10^5 세포/웰로 분할하였다. 표 1은 샘플의 자극 조건을 나타낸다. FITC-비오틴 비드 조건 하에 처리된 세포의 경우, 비드: 세포의 1:1 비율이 사용되었다. 세포는 인큐베이터에서 5일 동안 유지되었다. 세포를 매일 모니터링 하고, 세포 배지가 주황색-황색 착색을 발달시키는 것으로 관찰되는 경우 RPMI-C 배지 +/- 10 nM 라파마이신을 웰에 첨가하였다.

표 1

[0326]

비자극		FITC-비오틴 비드		플레이트 결합 FITC-OVA	
0 nM 라파마이신	10 nM 라파마이신	0 nM 라파마이신	10 nM 라파마이신	0 nM 라파마이신	10 nM 라파마이신

[0327] *유세포 분석에 의한 CAR 발현 및 활성화 평가*

[0328] 프로토콜의 16일째에, 각각의 자극 조건에서 세포를 계수하고 세포 계수의 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0329]

조건	비자극	FITC-비오틴 비드	플레이트 결합 FITC-OVA
PBMC FITC CAR-Frb-RACR 0 nM 라파마이신	1 x 10^5 세포	1 x 10^5 세포	2.6 x 10^5 세포
PBMC FITC CAR-Frb-RACR 10 nM 라파마이신	2.4 x 10^5 세포	2.6 x 10^5 세포	5.2 x 10^5 세포

[0330] 세포를 96-웰 V 바닥 플레이트의 개별 웰로 옮기고, 플레이트를 400 x g 에서 5분 동안 회전시키고, 세포를 200 μL PBS로 세척하고 400 x g 에서 5분 동안 다시 회전시켰다. 세포를 50 μL/웰 Zombie NIR 고정 가능한 생존력 염료 (Fixable Viability Dye) (PBS에서 1:3000 희석)에서 실온에서 10분 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 150 μL FACS 완충액 (1X PBS + 2% FBS)으로 세척하고 플레이트를 400 x g에서 5분 동안 회전시켰다. 다음으로, FACS 완충액에서 50 μL/웰의 표면 염색물을 세포에 첨가하고 4℃에서 45분 동안 배양하였다.

[0331] 세포를 150 μL FACS 완충액으로 세척하고 플레이트를 400 x g에서 5분 동안 회전시켰다. 그런 다음 세포를 4℃에서 20분 동안 100 μL/웰의 BD Cytofix/Cytoperm 완충액으로 고정시켰다. 그런 다음 세포를 물에 10배 희석한 100 μL BD Perm/Wash로 세척하고 플레이트를 400 x g 에서 5분 동안 회전시켰다. 세포를 물에 10배 희석한 200 μL BD Perm/Wash 로 다시 세척하고 플레이트를 400 x g 에서 5분 동안 다시 회전시켰다. 1X BD Perm/Wash에서 50 μL/웰의 세포내 염색물을 세포에 첨가하고 4℃에서 30분 동안 배양하였다. 세포를 150 μL FACS 완충액으로 세척하고, 플레이트를 400 x g에서 5분 동안 회전시키고, 세포를 Beckman Coulter CytoFLEX S 세포측정기를 사용하여 분석용 200 μL FACS 완충액에 재현탁시켰다. 도 2a 내지 2f에 도시된 바와 같이, CAR-발현 T 세포는 항원 FITC의 존재 하에 확장되고 이 확장은 라파마이신으로 증진되었다.

[0332] 유세포 분석을 위한 항체 및 형광 표지된 분자를 하기 희석액으로 사용하였다:

[0333] FITC 덱스트란 (1:10)

[0334] CD3-AF700 (1:100)

[0335] CD25-BV421 (1:100)

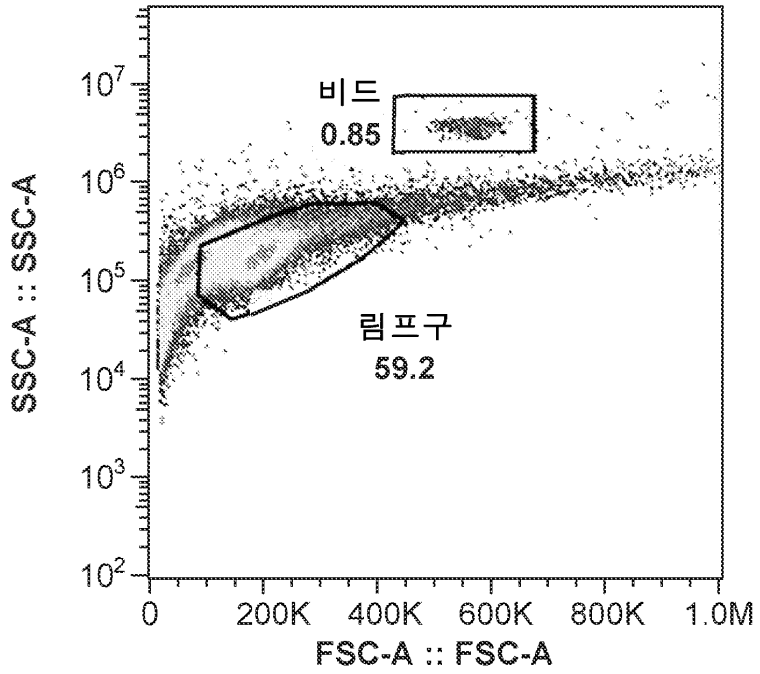
[0336] PD1-BV650 (1:100)

[0337] Lag3-PECy7 (1:100)

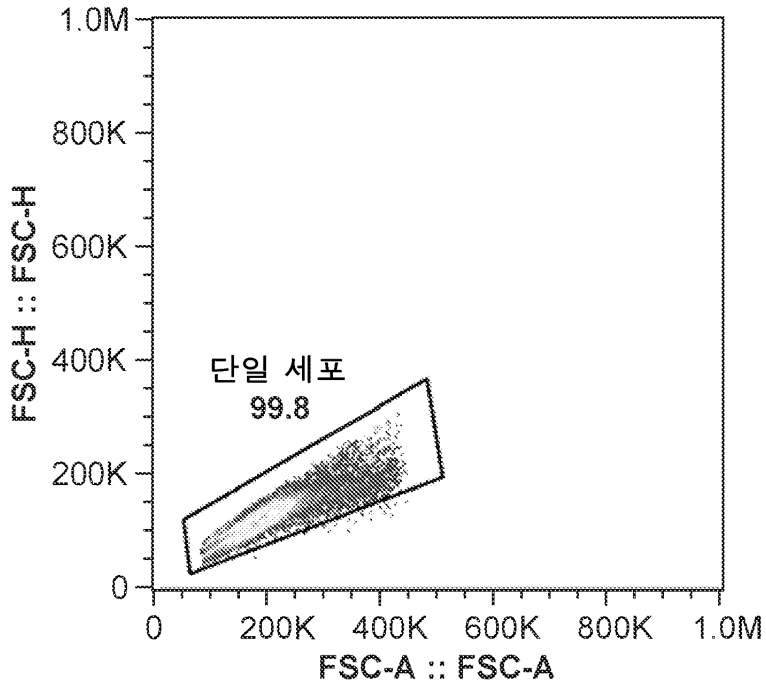
[0338] 2A-AF647 (1:100)

도면

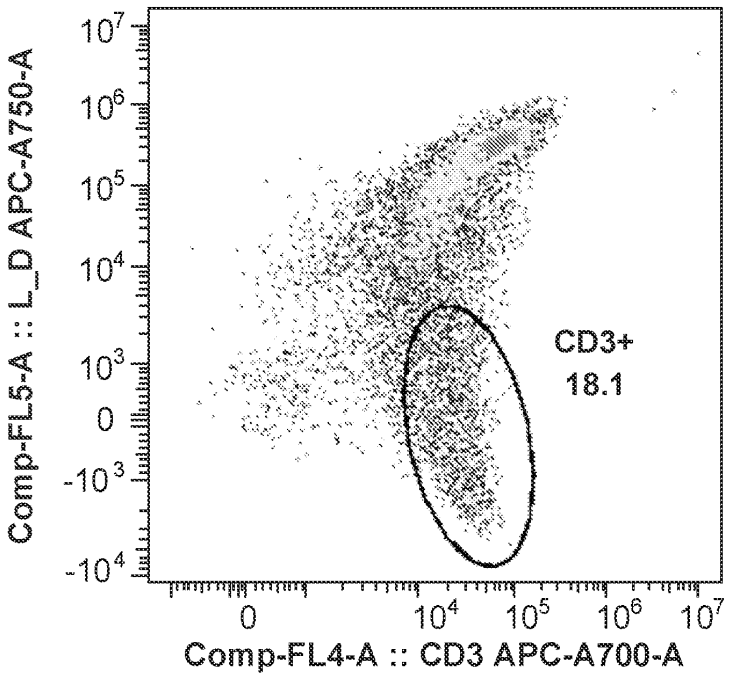
도면1a


비드
0.85
림프구
59.2
SSC-A :: SSC-A
FSC-A :: FSC-A
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
200K
400K
600K
800K
1.0M

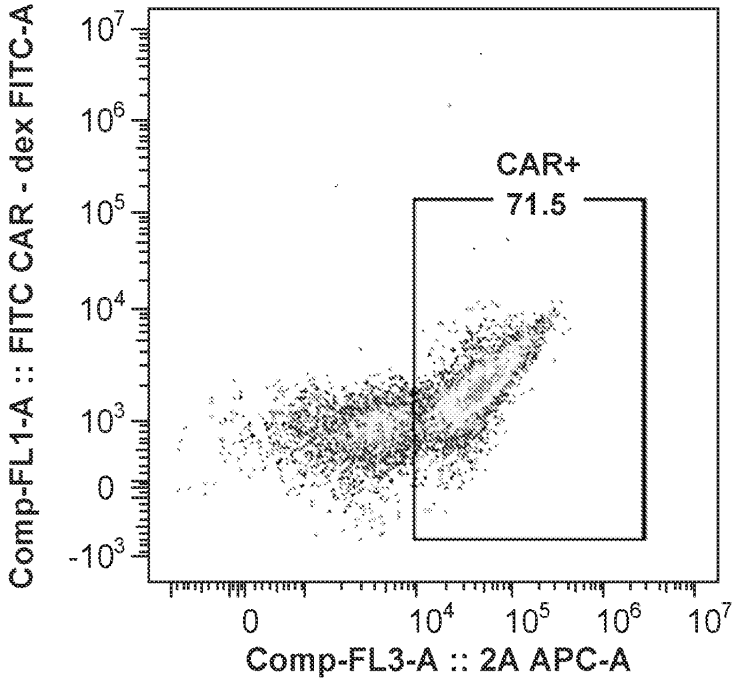
도면1b


단일 세포
99.8
FSC-H :: FSC-H
FSC-A :: FSC-A
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
200K
400K
600K
800K
1.0M

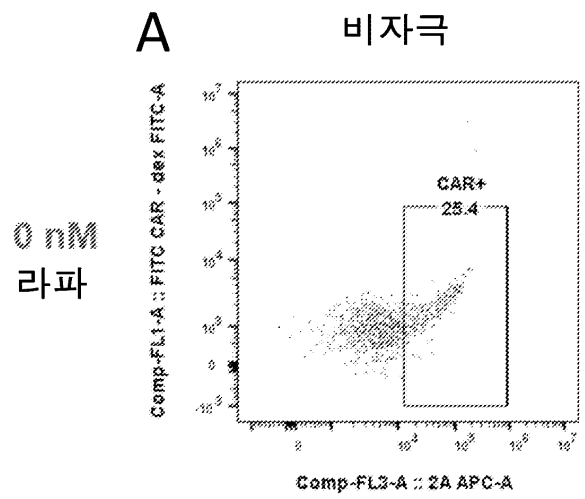
도면1c


Comp-FL5-A :: L_D APC-A750-A
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
-10^3
-10^4
CD3+
18.1
0
10^4
10^5
10^6
10^7
Comp-FL4-A :: CD3 APC-A700-A

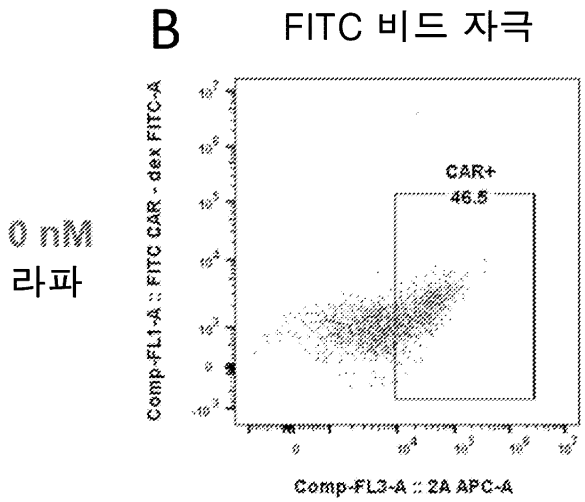
도면1d


Comp-FL1-A :: FITC CAR - dex FITC-A
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
0
-10^3
CAR+
71.5
0
10^4
10^5
10^6
10^7
Comp-FL3-A :: 2A APC-A

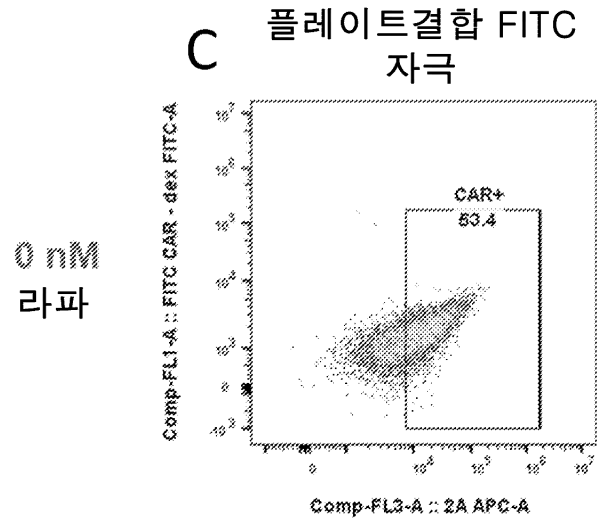
도면2a



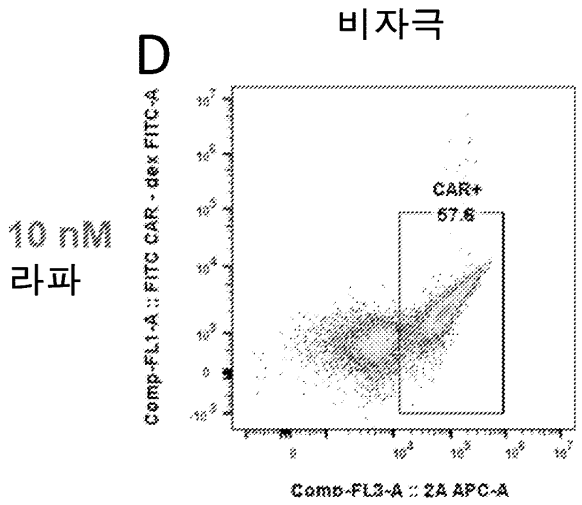
도면2b



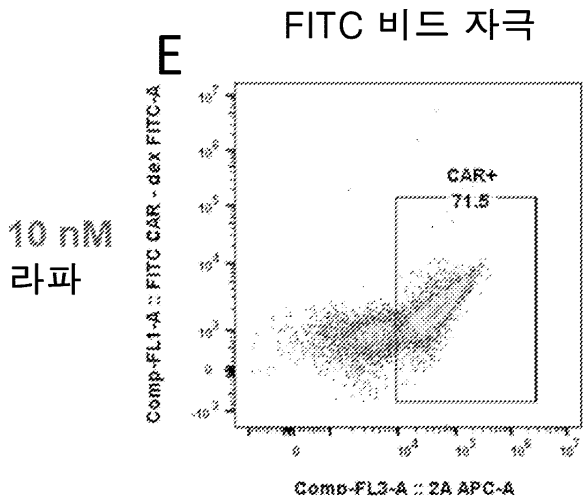
도면2c



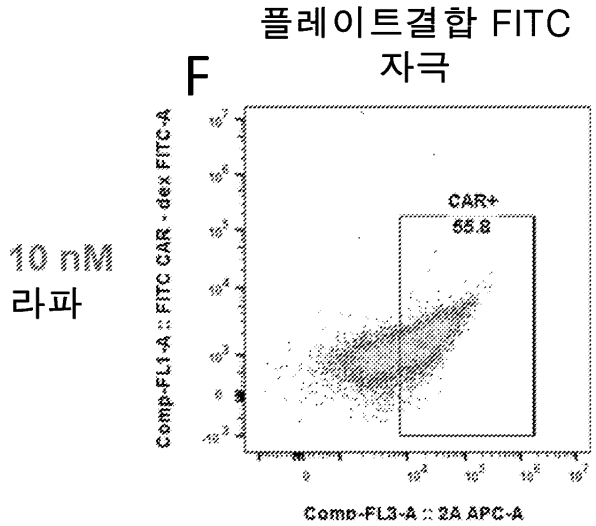
도면2d



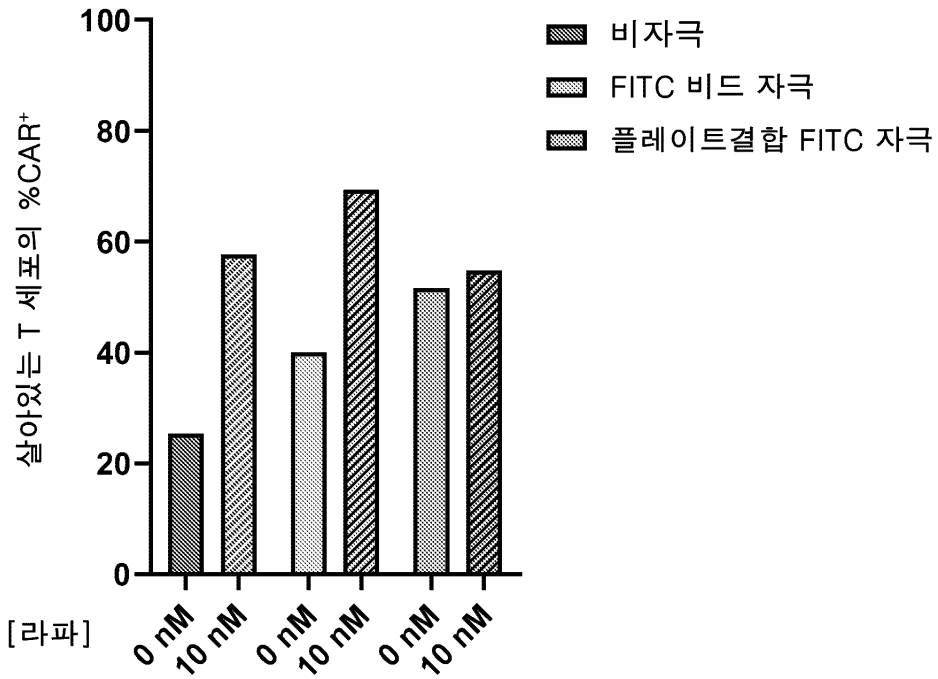
도면2e



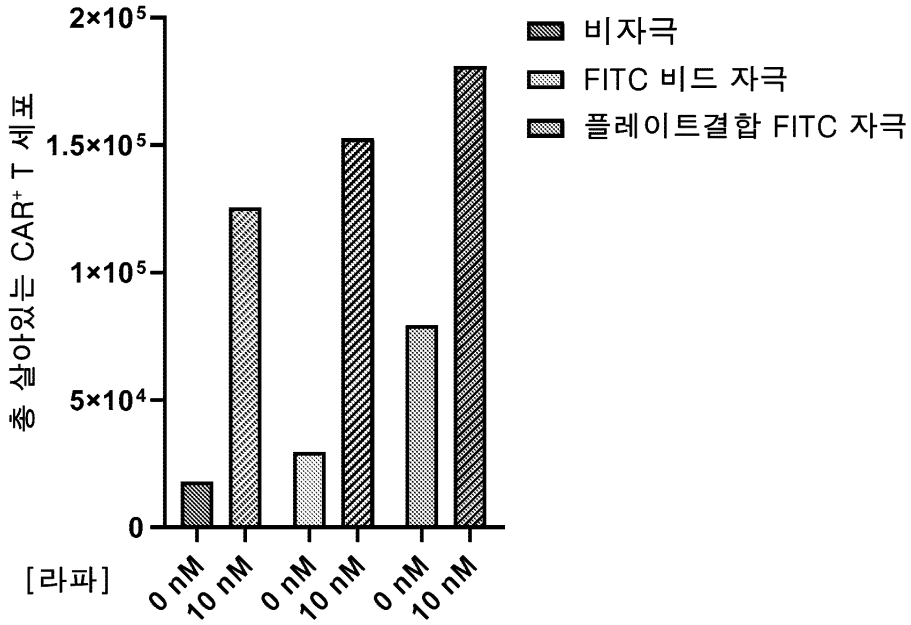
도면2f



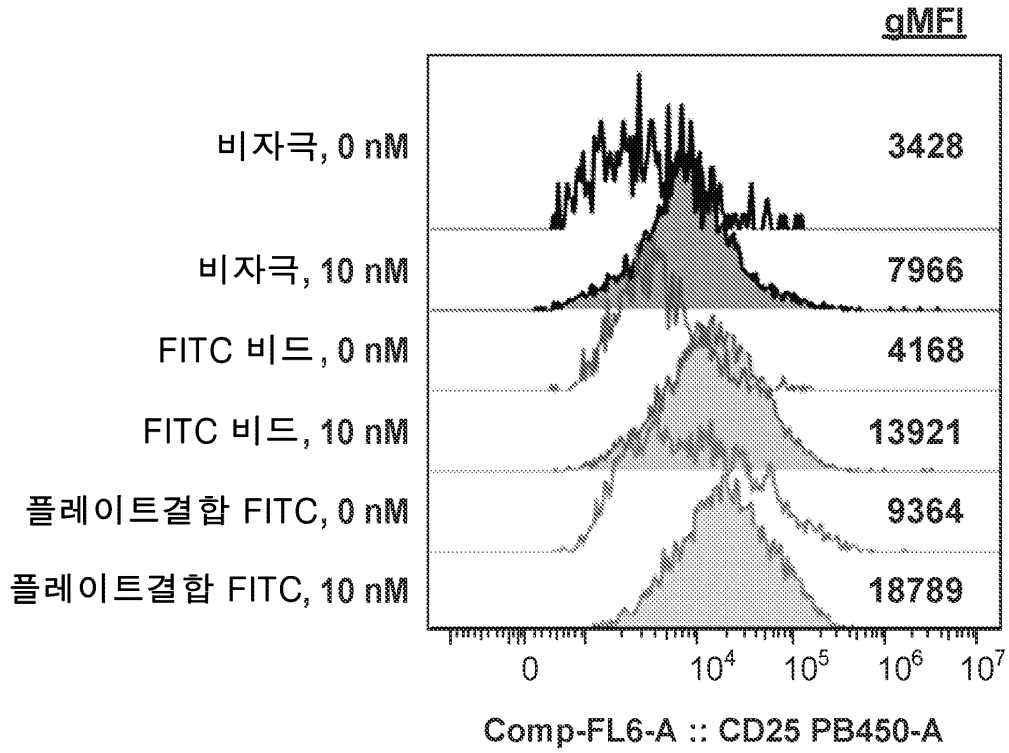
도면3


100
80
60
40
20
0
살아있는 T 세포의 %CAR+
[라파]
0 nM
10 nM
0 nM
10 nM
0 nM
10 nM
비자극
FITC 비드 자극
플레이트결합 FITC 자극

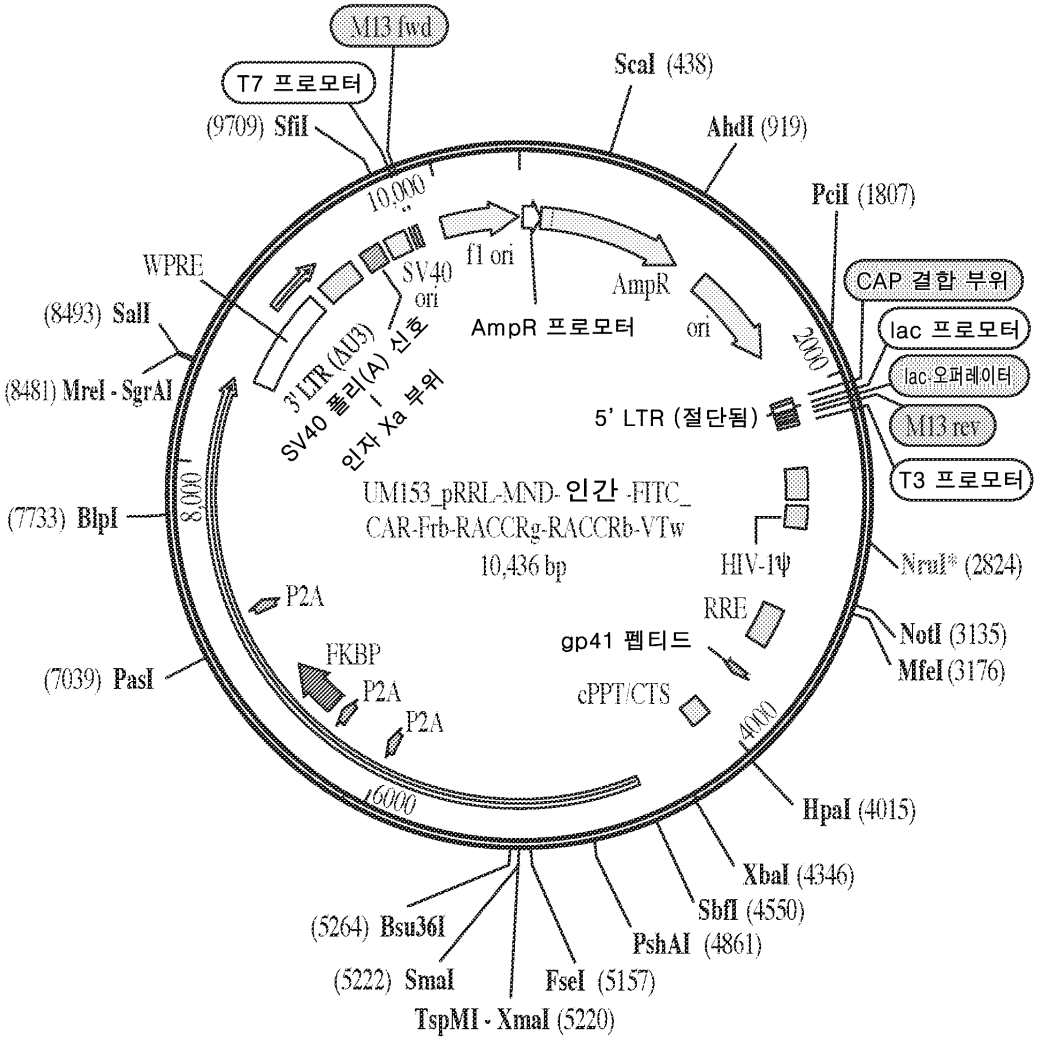
도면4


2×10⁵
1.5×10⁵
1×10⁵
5×10⁴
0
총 살아있는 CAR+ T 세포
[라파]
0 nM
10 nM
0 nM
10 nM
0 nM
10 nM
비자극
FITC 비드 자극
플레이트결합 FITC 자극

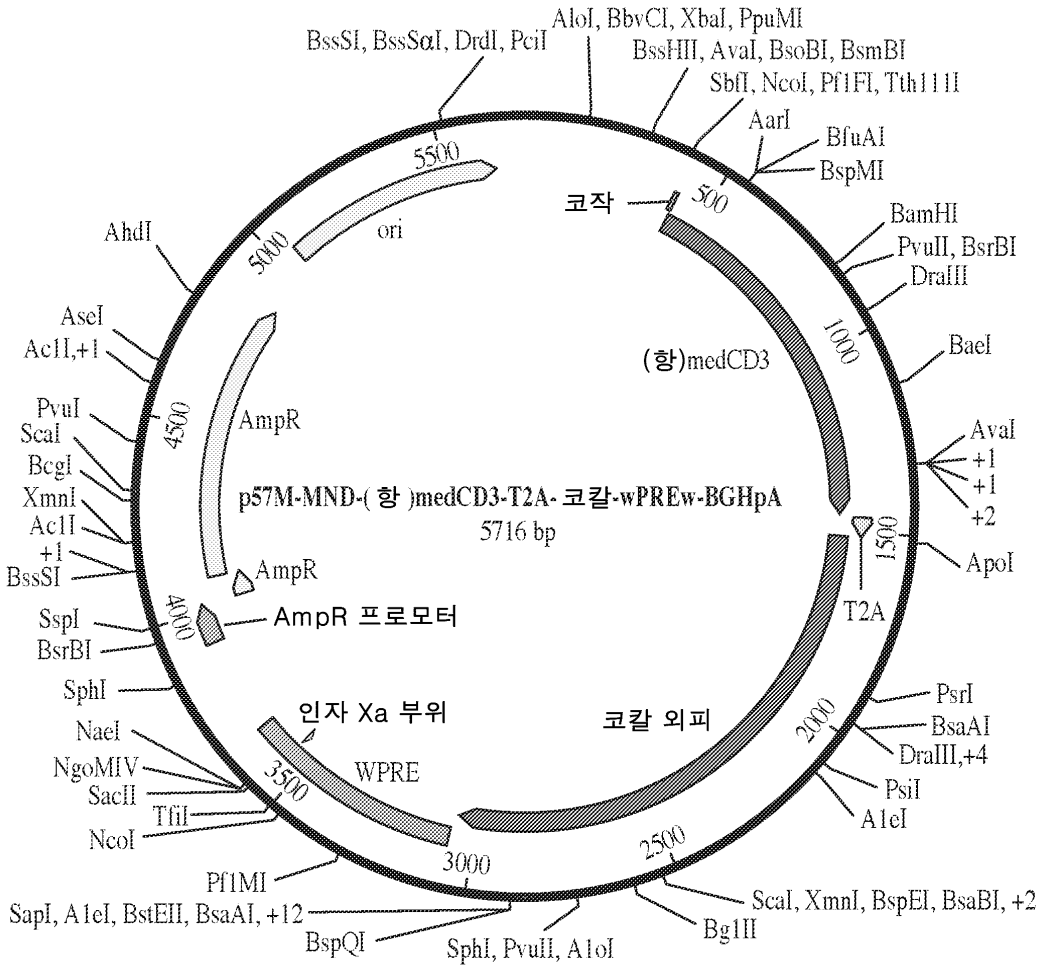
도면5


gMFI
비자극, 0 nM
3428
비자극, 10 nM
7966
FITC 비드, 0 nM
4168
FITC 비드, 10 nM
13921
플레이트결합 FITC, 0 nM
9364
플레이트결합 FITC, 10 nM
18789
0
10^4
10^5
10^6
10^7
Comp-FL6-A :: CD25 PB450-A

도면6


M13 fwd
T7 프로모터
(9709) SfiI
ScaI (438)
AhdI (919)
PciI (1807)
CAP 결합 부위
lac 프로모터
lac 오퍼레이터
M13 rev
T3 프로모터
NruI* (2824)
NotI (3135)
MfeI (3176)
HpaI (4015)
XbaI (4346)
SbfI (4550)
PshAI (4861)
FseI (5157)
(5264) Bsu36I
(5222) SmaI
TspMI - XmaI (5220)
(7039) PasI
(7733) BlpI
(8481) MreI - SgrAI
(8493) SalI
WPRE
SV40 ori
f1 ori
AmpR
AmpR 프로모터
ori
5' LTR (절단됨)
HIV-1ψ
RRE
gp41 펩티드
cPPT/CTS
P2A
FKBP
P2A
P2A
3' LTR (ΔU3)
SV40 폴리(A) 신호
인자 Xa 부위
UM153_pRRL-MND-인간 -FITC_
CAR-Frb-RACCRg-RACCRb-VTw
10,436 bp
2000
4000
6000
8,000
10,000

도면7



서 열 목 록

<110> Umoja Biopharma, Inc.

Scharenberg, Andrew

<120> RETROVIRAL VECTOR FOR UNIVERAL RECEPTOR THERAPY

<130> UMOJ-003/01WO

<150> US 62/916,110

<151> 2019-10-19

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cocal G protein

<400> 1

Asn Phe Leu Leu Leu Thr Phe Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His Ala
1 5 10 15
Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn

20 25 30
Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn Trp
35 40 45
His Asn Asp Leu Leu Gly Ile Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys Thr
50 55 60
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys Trp
65 70 75 80
Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His
85 90 95

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

165 170 175
Val His Asn Ser Thr Val Trp Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly Leu
180 185 190
Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
195 200 205
Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser Asn
210 215 220
Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr Cys
225 230 235 240

Lys His Ala Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe Val

245 250 255

Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val Gly

260 265 270

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

275 280 285

Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp

290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln Pro Val 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 Ile Asp Ile Asp

340 345 350

Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln Thr

355 360 365

Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu Ile

370 375 380

Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro Leu

385 390 395 400

Phe Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Lys Thr Ser

405 410 415

Gln Ala Glu Val Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys Gln

420 425 430

Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Ile Ser Lys

435 440 445

Asn Pro Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Thr

450 455 460

Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr Val

465 470 475 480

Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser Asn

485 490 495

Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys

500 505 510

<210> 2

<400> 2

000

<210> 3

<400> 3

000

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3 CDRH1

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3 CDRH2

<400> 5

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr

1 5

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3 CDRH3

<400> 6

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3 CDRL1

<400> 7

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3 CDRL2

<400> 8

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OKT3 CDRL3

<400> 9

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 antibody - CDRH1

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 antibody - CDRH2

<400> 11

Trp Ala Gly Gly Ser

1 5

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 antibody - CDRH3

<400> 12

Asp Lys Arg Ala Pro Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Tyr Pro Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 Antibody - CDRL1

<400> 13

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 antibody - CDRL2

<400> 14

Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser

1 5

<210> 15

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 antibody - CDRL3

<400> 15

Gln Gln Thr Arg Lys Val Pro Ser Thr

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGN1412 - CDRH1

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGN1412 - CDRH2

<400> 17

Tyr Pro Gly Asn Val Asn

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGN1412 - CDRH3

<400> 18

Ser His Tyr Gly Leu Asp Trp Asn Phe Asp Val

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGN1412 - CDRL1

<400> 19

His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Leu Asn

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGN1412 - CDRL2

<400> 20

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGN1412 - CDRL3

<400> 21

Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 173

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> OX40L sequence

<400> 22

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg

1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln

20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser

35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val

50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln

65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Tyr Leu Ile Ser Leu Lys

85 90 95

Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp

100 105 110

Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu

115 120 125

Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr

130 135 140

Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu

145 150 155 160

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

165 170

<210> 23

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 4-1BBL sequence

<400> 23

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe

35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser

50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp

65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val

85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp

100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125
Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140
Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160
Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175
Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala

180 185 190
Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205
Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220
Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240
Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 24
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> hinge-CH2CH3 of human lgG1
<400> 24
Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Trp Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
180 185 190
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

195 200 205
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Lys Asp
225 230
<210> 25
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> human CD8 stalk
<400> 25
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

35 40 45

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human lgG1 hinge

<400> 26

Ala Glu Pro Lys Ser Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Lys Asp Pro Lys

20

<210> 27

<211> 185

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD2 ectodomain

<400> 27

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp

1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp

20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg

35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys

50 55 60

Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile

65 70 75 80

Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys

85 90 95

Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
100 105 110
Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
115 120 125
Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser

130 135 140
Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
145 150 155 160
Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
165 170 175
Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp
180 185

<210> 28
<211> 259
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CD34 ectodomain
<400> 28
Ser Leu Asp Asn Asn Gly Thr Ala Thr Pro Glu Leu Pro Thr Gln Gly

1 5 10 15
Thr Phe Ser Asn Val Ser Thr Asn Val Ser Tyr Gln Glu Thr Thr Thr
20 25 30
Pro Ser Thr Leu Gly Ser Thr Ser Leu His Pro Val Ser Gln His Gly
35 40 45
Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe Thr Ser
50 55 60
Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser Val Gln
65 70 75 80

Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala Asn Val
85 90 95
Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly Asn Val
100 105 110

Ser Asp Leu Ser Thr Thr Ser Thr Ser Leu Ala Thr Ser Pro Thr Lys
115 120 125
Pro Tyr Thr Ser Ser Ser Pro Ile Leu Ser Asp Ile Lys Ala Glu Ile
130 135 140
Lys Cys Ser Gly Ile Arg Glu Val Lys Leu Thr Gln Gly Ile Cys Leu

145 150 155 160
Glu Gln Asn Lys Thr Ser Ser Cys Ala Glu Phe Lys Lys Asp Arg Gly
165 170 175
Glu Gly Leu Ala Arg Val Leu Cys Gly Glu Glu Gln Ala Asp Ala Asp
180 185 190
Ala Gly Ala Gln Val Cys Ser Leu Leu Leu Ala Gln Ser Glu Val Arg
195 200 205
Pro Gln Cys Leu Leu Leu Val Leu Ala Asn Arg Thr Glu Ile Ser Ser
210 215 220

Lys Leu Gln Leu Met Lys Lys His Gln Ser Asp Leu Lys Lys Leu Gly
225 230 235 240
Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser Tyr Ser
245 250 255
Gln Lys Thr

<210> 29
<211> 153
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2
<400> 29
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

145 150

<210> 30

<

211> 177

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL7

<400> 30

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys

20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu

35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe

50 55 60

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe

65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser

85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110
Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140
Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160
Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175
His

<210> 31
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL15
<400> 31
Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr

1 5 10 15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20 25 30
Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35 40 45
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50 55 60
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65 70 75 80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85 90 95
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
100 105 110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
115 120 125
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130 135 140
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

145 150 155 160
Thr Ser

<210> 32
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> membrane-IL7
<400> 32
Met Ala His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30
Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu

35 40 45
Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60
Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80
Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95
Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125
Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

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

180 185 190
Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
195 200 205
Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
210 215 220
Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
225 230 235 240
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
245 250 255

His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
260 265 270

<210> 33
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> membrane-IL15
<400> 33
Met Gly Leu Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg
1 5 10 15
Gly Trp Thr Ala Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ser Gly Phe Met
20 25 30
Ala Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro

35 40 45
Lys Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
50 55 60
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
65 70 75 80

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
85 90 95
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
100 105 110

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
115 120 125
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
130 135 140
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
145 150 155 160
Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala
165 170 175
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser

180 185 190
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
195 200 205
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
210 215 220
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
225 230 235 240
Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
245 250 255

<210> 34
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2Ry complex
<400> 34
Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15
His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
35 40 45
Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

50 55 60
Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
65 70 75 80
Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
85 90 95
Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
100 105 110
Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
115 120 125

Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
130 135 140
Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
145 150 155 160
Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
165 170 175
Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
180 185 190
Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser

195 200 205
Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
210 215 220
Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
225 230 235 240
Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
245 250
<210> 35
<400> 35
000
<210> 36

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

IL2Ry complex

<400> 36

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
115 120 125

Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala

130 135 140

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
145 150 155 160

Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
165 170 175

Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
180 185 190

Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
195 200 205

Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
210 215 220

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
245 250

<210> 37

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Ry complex

<400> 37

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
115 120 125

Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
130 135 140

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys

145 150 155 160

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

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
225 230 235 240
Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
245 250

<210> 38
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2Ry complex
<400> 38
Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
1 5 10 15
His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

20 25 30
Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
35 40 45
Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
50 55 60
Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
65 70 75 80
Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
100 105 110

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

165 170 175
Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
180 185 190
Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
195 200 205
Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
210 215 220
Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
245 250

<210> 39
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2Rb complex
<400> 39
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 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met

35 40 45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
50 55 60

Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
130 135 140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145 150 155 160
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
165 170 175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser

180 185 190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
210 215 220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225 230 235 240
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
245 250 255

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
260 265 270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
275 280 285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
290 295 300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
305 310 315 320

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser

325 330 335

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro

340 345 350

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu

355 360 365

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg

370 375 380

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe

385 390 395 400

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser

405 410 415

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

420 425

<210> 40

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rb complex

<400> 40

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 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

165 170 175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
180 185 190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
210 215 220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225 230 235 240

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
245 250 255
Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
260 265 270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
275 280 285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
290 295 300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser

305 310 315 320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
325 330 335

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
340 345 350

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
355 360 365

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
370 375 380

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
385 390 395 400

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
405 410 415

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
420 425

<210> 41

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rb complex

<400> 41

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 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
35 40 45

Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
50 55 60

Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80

Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95

Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
130 135 140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr

145 150 155 160
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
165 170 175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
180 185 190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
210 215 220

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

290 295 300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
305 310 315 320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
325 330 335
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
340 345 350
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu

355 360 365

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
370 375 380
Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
385 390 395 400
Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
405 410 415
Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
420 425

<210> 42
<211> 429

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2Rb complex
<400> 42
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
35 40 45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln

50 55 60
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
100 105 110
Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
130 135 140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145 150 155 160
Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
165 170 175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
180 185 190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
210 215 220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225 230 235 240
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
245 250 255
Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
260 265 270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
275 280 285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
290 295 300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
305 310 315 320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
325 330 335
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
340 345 350
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
355 360 365
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
370 375 380

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
385 390 395 400
Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser
405 410 415

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
420 425

<210> 43
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL7Ra complex
<400> 43
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 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met

35 40 45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
50 55 60
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
130 135 140
Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
165 170 175
Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser

180 185 190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205
Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
210 215 220
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225 230 235 240
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
245 250 255

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
260 265 270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
275 280 285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
290 295 300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
305 310 315 320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser

325 330 335
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
340 345 350
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
355 360 365
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
370 375 380
Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
385 390 395 400

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser

405 410 415

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

420 425

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine spacer

<400> 44

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine spacer

<400> 45

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine spacer

<400> 46

Gly Gly Gly

1

<210> 47

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Ry complex

<400> 47

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala

130 135 140

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys

145 150 155 160

Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys

165 170 175

Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp

180 185 190

Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser

195 200 205

Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu

210 215 220

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp

225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

245 250

<210> 48

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rb complex

<400> 48

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 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
35 40 45

Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
50 55 60

Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80

Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95

Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
130 135 140

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
165 170 175

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
180 185 190

Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205

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

260 265 270
Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
275 280 285
Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp
290 295 300
Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
305 310 315 320
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
325 330 335

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

405 410 415
Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
420 425

<210> 49
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Ra complex

<400> 49

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 Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
35 40 45

Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
50 55 60

Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80

Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
130 135 140

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
165 170 175

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
180 185 190

Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
195 200 205

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
210 215 220

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
225 230 235 240

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys

245 250 255

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu

260 265 270

Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro

275 280 285

Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp

290 295 300

Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser

305 310 315 320

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser

325 330 335

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro

340 345 350

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu

355 360 365

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg

370 375 380

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe

385 390 395 400

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser

405 410 415

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

420 425

<210> 50

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL7Ra complex

<400> 50

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

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

85 90 95
Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
100 105 110
Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
115 120 125
Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
130 135 140
Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
145 150 155 160

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

225 230 235 240
Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
245 250

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2a-like self-cleaving peptide

<400> 51

Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2a-like self-cleaving peptide

<400> 52

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 53

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FITC-CAR

<400> 53

Ser Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys
1 5 10 15

Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr

20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile
35 40 45

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

50 55 60

Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser

85 90 95

Glu Phe Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Thr

100 105 110

Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln

115 120 125

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser

130 135 140

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Phe Ser

145 150 155 160

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Val Ala

165 170 175

Gly Leu Ser Ala Arg Ser Ser Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

180 185 190

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu

195 200 205

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

210 215 220

Arg Arg Ser Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Trp Gly His Phe Tyr Ser Tyr

225 230 235 240

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Ser

245 250 255

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val

260 265 270

Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala

275 280 285

Phe Ile Ile Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile

290 295 300

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

405 410 415

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

420 425 430

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

435 440 445