(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0143150
(43) 공개일자 2023년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 39/4631 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7028818
(22) 출원일자(국제) 2022년01월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년08월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/013947
(87) 국제공개번호 WO 2022/164935
국제공개일자 2022년08월04일
(30) 우선권주장
63/142,347 2021년01월27일 미국(US)
63/185,765 2021년05월07일 미국(US)

(71) 출원인
우모자 바이오파마 인코포레이티드
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616
(72) 발명자
샤렌버그 앤드류
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
니콜라이 크리스토퍼
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

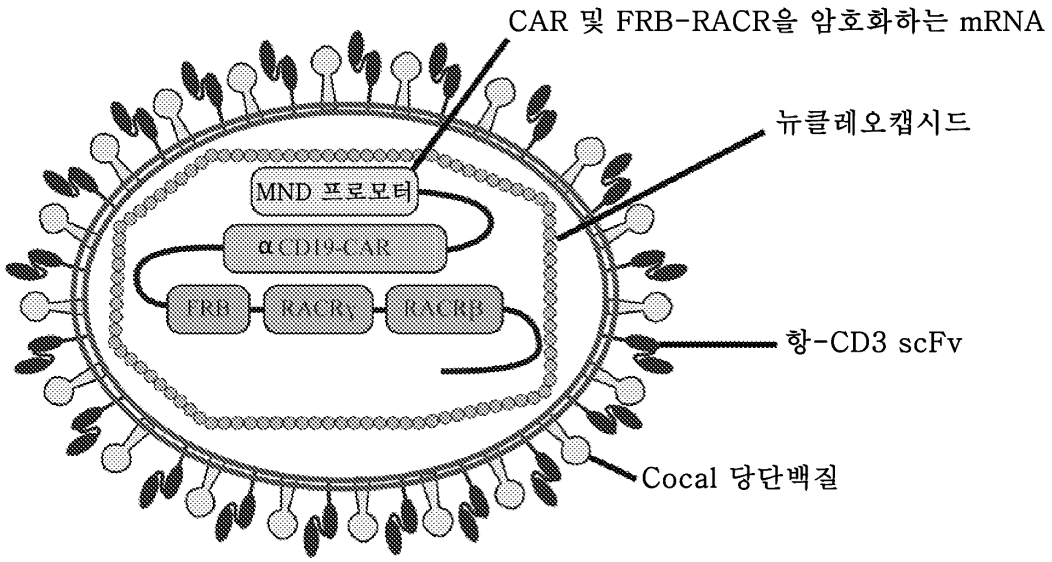
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 **항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포를 생성하기 위한 렌티바이러스**

(57) 요 약

키메라 항원 수용체 및 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 입자가 대상체에게 투여되는, 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키기 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도22b



(52) CPC특허분류
A61K 39/464412 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2740/16043 (2013.01)
C12N 2740/16045 (2013.01)
C12N 2760/20222 (2013.01)
(72) 발명자
크리스만 라이언
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
설리반 알레산드라
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
마이클스 캐트린
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
류 병
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
그린 숀
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
베이츠 로리
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
헤르난데즈 로페즈 수사나
미국 98102 워싱턴 시애틀 스위트 550 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 입자로서, 상기 바이러스 입자는 면역 세포를 생체내에서 형질도입시키는, 바이러스 입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 렌티바이러스 입자인, 입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 면역 세포가 T 세포인, 입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 입자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 다분할 세포-표면 수용체가 화학적으로 유도가능한 세포-표면 수용체인, 입자.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인(FRB 도메인) 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 상기 폴리뉴클레오타이드는 FK506 결합 단백질 도메인(FKBP) 또는 이의 기능적 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 입자.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 다분할 세포-표면 수용체가 라파마이신-활성화된 세포-표면 수용체인, 입자.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 입자.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 상기 벡터 게놈 서열이 라파마이신에 결합하는 폴리펩타이드를 암호화하고, 여기서 선택적으로, 상기 폴리펩타이드가 FRB인, 입자.

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 폴리시스트론성 전사체 상에서 5'에서 3' 순서로: 상기 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 상기 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 입자.

청구항 11

제4항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 폴리시스트론성 전사체 상에서 5'에서 3' 순서로: 상기 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 상기 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 및/또는 상기 항-CD19 키메라 항원 수용체는 서열번호 51, 79, 89, 121 또는 122와 적어

도 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일성을 공유하는, 입자.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상기 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 하나 이상의 프로모터에 작동가능하게 연결된, 입자.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 하나 이상의 프로모터 중 적어도 하나가 유도성 프로모터인, 입자.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 상기 표면 상에 접합된 하나 이상의 면역 세포-활성화 단백질을 포함하는 바이러스 외피를 포함하는, 입자.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 바이러스 외피가 상기 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 상기 표면에 접합된 항-CD3 단일 사슬 가변 단편을 포함하는, 입자.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 상기 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 상기 표면에 접합된 Cocal 당단백질을 포함하고, 선택적으로 상기 Cocal 당단백질은 서열번호 5에 따른 기준 서열과 비교하여 R354Q 돌연변이를 포함하는, 입자.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 바이러스 외피가 상기 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 상기 표면에 접합된 항-CD3 단일 사슬 가변 단편 및 Cocal 당단백질을 포함하는, 입자.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 서열번호 2 또는 12와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 단일 사슬 가변 단편 서열을 포함하는, 입자.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 바이러스 외피는 서열번호 5, 13, 19, 123, 128, 129 또는 130과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질 서열을 포함하는, 입자.

청구항 20

제13항에 있어서, 상기 프로모터가 MND 프로모터인, 입자.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 서열번호 49와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 입자.

청구항 22

제14항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 서열번호 75와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 입자.

청구항 23

제14항에 있어서, 상기 벡터 게놈이 서열번호 87과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 입자.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키고/시키거나 항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에서 생성하여, 악성 CD19+ 세포와 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 복강내, 피하 또는 결절내 주사에 의해 투여되는 방법.

청구항 26

이를 필요로 하는 대상체에서 악성 CD19+ 세포와 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 바이러스 입자로 형질도입된 면역 세포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 27

이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 치료적 유효량의 바이러스 입자를 복강내, 피하 또는 결절내 주사에 의해 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 바이러스 입자는 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 서혜부(inguinal) 림프절을 통해 결절내 주사에 의해 투여되는, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 복강내 주사에 의해 투여되는, 방법.

청구항 30

키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키는데 사용하기 위한 바이러스 입자.

청구항 31

제1항 내지 제23항 또는 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 우성-음성 TGFβ 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하는, 입자.

청구항 32

제1항 또는 제30항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체의 발현이 FRB-데그론 융합 폴리펩타이드에 의해 조절되고, 상기 FRB-데그론 융합 폴리펩타이드의 억제가 리간드에 의해 화학적으로 유도가능한, 입자.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 리간드가 라파마이신인, 입자.

청구항 34

제1항 또는 제30항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체의 발현이 데그론 융합 폴리펩타이드에 의해 조절되고, 상기 데그론 융합 폴리펩타이드의 억제가 리간드에 의해 화학적으로 유도가능한, 입자.

청구항 35

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 B 세포 악성종양, 재발성/불응성 CD19-발현 악성종양, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 버킷형 거대 B 세포 림프종(B-LBL), 여포성 림프종(FL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 외투 세포 림프종(MCL), 혈액 악성종양, 결장암, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 난소암, 피부암, 흑색종, 골암, 뇌암, 편평 세포 암종, 백혈병, 골수종, B 세포 림프종, 신장암, 자궁암, 선암종, 췌장암, 만성 골수성 백혈병, 교모세포종, 신경모세포종, 수모세포종, 육종, 및 이들의 임

의의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 36

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)을 포함하는, 방법.

청구항 37

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 버킷형 거대 B 세포 림프종(B-LBL)을 포함하는, 방법.

청구항 38

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 여포성 림프종(FL)을 포함하는, 방법.

청구항 39

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는, 방법.

청구항 40

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 급성 림프구성 백혈병(ALL)을 포함하는, 방법.

청구항 41

제24항 또는 제27항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 외투 세포 림프종(MCL)을 포함하는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 바이러스 입자를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 43

제42항의 약제학적 조성물 및 선택적으로 리간드, 선택적으로 라파마이신을 포함하는 조성물을 포함하는 키트.

청구항 44

제24항 내지 제29항 또는 제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용하기 위한 바이러스 입자.

청구항 45

제24항 내지 제29항 또는 제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용되는 바이러스 입자의 용도.

청구항 46

제24항에 있어서, 상기 대상체에서 CD19+ B 세포는 바이러스 입자가 없는 대상체와 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 고갈되는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 CD19+ B 세포가 상기 대상체의 말초 혈액에서 고갈되는, 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, B 세포 고갈이 상기 바이러스 입자를 투여한 후 적어도 7일, 적어도 10일, 적어도 20일, 적어도 30일, 적어도 40일, 적어도 50일, 적어도 60일, 적어도 70일 또는 적어도 80일 동안 상기 대상체에서 지속되는, 방법.

청구항 49

제24항에 있어서, 적어도 200만, 적어도 400만, 적어도 600만, 적어도 800만, 또는 적어도 1000만 형질도입 단위의 바이러스 입자가 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 50

제32항에 있어서, 상기 면역 세포를 상기 리간드와 접촉시키는 것이 상기 대상체에서 항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포의 수를 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 500배, 적어도 1000배 증가시키키는, 방법.

청구항 51

CD3(항-CD3 scFv)에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편 및 글리코포린 A 막관통 단편을 포함하는, 폴리펩타이드.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 글리코포린 A 막관통 단편이 HFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLPSPDTDVPLSSVEIENPETSDQ(서열번호 105)와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리펩타이드.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 항-CD3 scFv가 서열번호 2 또는 12와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리펩타이드.

청구항 54

제51항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 서열번호 119와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리펩타이드.

청구항 55

제51항에 있어서, 상기 막관통 단편이 서열번호 13, 19, 25, 31, 37, 43, 또는 105와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리펩타이드.

청구항 56

렌티바이러스 입자의 표면에 전시되는 제51항 내지 제54항 중 어느 한 항의 폴리펩타이드를 포함하는 표면-조작된 렌티바이러스 입자.

청구항 57

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 바이러스 입자를 면역 세포와 생체내에서 접촉시키는 것을 포함하는, 세포를 형질도입시키는 방법.

청구항 58

항-CD3 scFv 및 글리코포린 A 막관통 단편을 포함하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 글리코포린 A 막관통 단편이 서열번호 106과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 60

제58항에 있어서, 상기 항-CD3 scFv가 서열번호 7 또는 15와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 61

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 서열번호 120과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 62

제58항에 있어서, 상기 막관통 단편이 서열번호 16, 22, 25, 28, 34, 40, 47 또는 106과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 63

바이러스 입자를 제조하는 방법으로서,

a) 배양 배지에 세포를 제공하는 단계; 및

b) 상기 세포를 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항의 벡터 게놈, 전달 플라스미드 및 패키징 플라스미드로 동시에 또는 순차적으로 형질감염시킴으로써; 상기 세포가 표면 조작된 바이러스 입자를 발현하는, 단계를 포함하는, 방법.

청구항 64

면역 세포를 생체내에서 형질도입시키는 단계, 및/또는 서열번호 2 또는 12와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 표면에 접합된 항-CD3 단일 사슬 가변 단편을 발현하는 바이러스 입자를 생성하는 단계, 및 상기 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 악성 CD19+ 세포와 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 바이러스 입자가 복강내, 피하, 또는 결절내 주사에 의해 투여되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2021년 1월 27일자로 출원된 미국 가출원 제63/142,347호 및 2021년 5월 7일자로 출원된 미국 가출원 제63/185,765호의 우선권 및 이익을 주장한다. 전술한 특허 출원의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 ASCII 형식으로 제출된 서열 목록을 함유하며 본원에 그 전체가 참고로 포함된다. 2022년 1월 26일자로 생성된 상기 ASCII 사본의 이름은 "UMOJ-024-02WO_SeqList_ST25.txt"이며 크기가 246KB이다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 암 및/또는 B-세포 악성종양을 치료하기 위한 면역 세포의 생체내 형질도입에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 세포 요법은 일반적으로 환자에게 도입될 치료 세포의 집단을 생성하기 위해 생체외에서 면역 세포의 형질도입을 이용한다. 예를 들어, 자가 유래 또는 동종이계 공급원 유래의 T 세포는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 벡터에 의해 생체외에서 형질도입될 수 있다. 생성된 CAR T 세포는 그 다음 환자에게 주입된다.

[0008] 벡터를 환자에게 전달함으로써 생체내에서 치료 세포를 대신 생성하는 것이 바람직할 것이다. 면역 세포의 생체내 형질도입을 위한 현재 방법론은 기술적, 실행계획적, 일관성, 비용 및 효능 문제를 겪고 있다. 생체내 접근법은 이와 연관된 기술적 문제로 인해 현재까지 널리 추구되지 않았으며, 주요 장애는 즉 T 세포를 효과적으로 조작하기 위해 체내에서 T 세포를 활성화해야 할 필요성, 뿐만 아니라 일단 형질도입된 이들 조작된 세포의 확장을 "제어"할 필요성이다.

[0009] 현재, 화학 요법 및 종종 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)을 포함하는 표준 요법에 실패한 공격적인 B-세포 악성종양 환자는 생체외 제조 공정을 이용하여 항원 C19에 대항하여 자신의 T 세포를 전향(redirect)시키는 자가 CAR-T 세포 산물을 투여받기 위한 옵션을 갖는다. 그러나 이러한 산물의 제조는 백혈구 성분채집술 절차를 통한 환자의 말초 혈액 단핵 세포의 수집부터 시작하여, 그 다음 환자 치료에 지연, 위험 및 복잡한 실행계획을 도입시키

는 cGMP 시설에서 환자 T 세포의 유전자 변형이 후속되는 복잡한 일련의 단계를 필요로 한다. 그런 다음 최종 의약품의 주입 전에 림프구고갈 화학 요법이 투여된다. 재발성/불응성 B-세포 악성종양 환자에게는 치료되지 않은 질환, 뿐만 아니라 더 새로운 세포 산물의 실행계획을 만들거나 시기를 견디는 것에 대한 무능력 면에서 미충족 의학적 요구가 있다.

[0010] 본 개시내용은 암 및/또는 B-세포 악성종양을 치료하기 위한 면역 세포의 생체내 형질도입과 관련된 조성물 및 방법을 제공한다.

발명의 내용

[0011] 한 측면에서, 본 개시내용은 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 입자를 제공하며, 여기서 바이러스 입자는 면역 세포를 생체내에서 형질도입시킨다.

[0012] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다.

[0013] 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다.

[0014] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 다분할(multipartite) 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 화학적으로 유도가능한 세포-표면 수용체이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인(FRB 도메인) 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하며; 폴리뉴클레오타이드는 FK506 결합 단백질 도메인(FKBP) 또는 이의 기능적 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 라파마이신-활성화된 세포-표면 수용체이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 서열을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 라파마이신에 결합하는 폴리펩타이드를 암호화하는 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 서열을 포함하며, 선택적으로 폴리펩타이드는 FRB이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 폴리시스트론 전사체 상에 5'에서 3' 순서로 서열, 즉 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 폴리시스트론 전사체 상에 5'에서 3' 순서로 서열, 즉 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하고/하거나, 항-CD19 키메라 항원 수용체는 서열번호 51, 79, 89, 121 또는 122와 적어도 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0023] 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다.

[0024] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 표면에 접합된 하나 이상의 면역세포-활성화 단백질을 포함하는 바이러스 외피를 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 표면에 접합된 항-CD3 단일 사슬 가변 단편을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 표면에 접합된 Cocal 당단백질을 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 표면에 접합된 Cocal 당단백질을 포함하고, 선택적으로 Cocal 당단백질은 서열번호 5에 따른 기준 서열와 비교하여 R354Q 돌연변이를 포함한다.

[0028] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 바이러스 외피의 표면에 노출되고/되거나 접합된 항-CD3 단일 사슬 가변

단편 및 Cocal 당단백질을 포함한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 서열번호 2 또는 12와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 단일 사슬 가변 단편 서열을 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 서열번호 5, 13, 19, 123, 128, 129, 또는 130과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질 서열을 포함한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 프로모터는 MND 프로모터이다.

[0032] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 49와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 서열을 포함한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 75와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 87과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 서열을 포함한다.

[0035] 본 개시내용은 질환 또는 장애를 치료하고, 생체내에서 면역 세포를 형질도입하고/하거나 항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에서 생성하는 방법으로서, 본 개시내용의 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0036] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 복강내, 피하 또는 결절내 주사에 의해 투여된다.

[0037] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질도입된 면역 세포는 대상체에게 투여된다.

[0038] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 치료적 유효량의 바이러스 입자를 복강내, 피하 또는 결절내 주사에 의해 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 바이러스 입자는 생체내에서 면역 세포를 형질도입시킨다.

[0039] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 선택적으로 서혜부 림프절을 통해 결절내 주사에 의해 투여된다.

[0040] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 복강내 주사에 의해 투여된다.

[0041] 본 개시내용은 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키는데 사용하기 위한 바이러스 입자를 제공한다.

[0042] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 우성-음성 TGFβ 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 발현은 FRB-데그론(degron) 융합 폴리펩타이드에 의해 조절되며, FRB-데그론 융합 폴리펩타이드의 억제는 리간드에 의해 화학적으로 유도될 수 있다.

[0044] 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신이다.

[0045] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 발현은 데그론 융합 폴리펩타이드에 의해 조절되며, 데그론 융합 폴리펩타이드의 억제는 리간드에 의해 화학적으로 유도될 수 있다.

[0046] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 B 세포 악성종양, 재발성/불응성 CD19-발현 악성종양, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 버킷형 거대 B 세포 림프종(B-LBL), 여포성 림프종(FL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 외투 세포 림프종(MCL), 혈액 악성종양, 결장암, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 난소암, 피부암, 흑색종, 뼈암, 뇌암, 편평 세포 암종, 백혈병, 골수종, B 세포 림프종, 신장암, 자궁암, 선암종, 췌장암, 만성 골수성 백혈병, 교모세포종, 신경모세포종, 수모세포종, 육종, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)을 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 버킷형 거대 B 세포 림프종(B-LBL)을 포함한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 여포성 림프종(FL)을 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한다.

[0051] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 급성 림프구성 백혈병(ALL)을 포함한다.

[0052] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 외투 세포 림프종(MCL)을 포함한다.

[0053] 본 개시내용은 본 개시내용의 바이러스 입자를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0054] 본 개시내용은 본 개시내용의 약제학적 조성물 및 선택적으로 리간드, 선택적으로 라파마이신을 포함하는 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0055] 본 개시내용은 본 개시내용의 임의의 바이러스 입자에 따른 방법에 사용하기 위한 바이러스 입자를 제공한다.

[0056] 본 개시내용은 본 개시내용의 임의의 방법에 따른 방법에 사용되는 바이러스 입자의 용도를 제공한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 대상체에서 악성 CD19+ 세포와 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 본 개시내용의 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 바이러스 입자의 투여 후에 대상체에서 CD19+ B 세포는 바이러스 입자를 투여받지 않은 대상체와 비교하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 고갈된다.

[0058] 일부 실시양태에서, CD19+ B 세포는 대상체의 말초 혈액에서 고갈된다.

[0059] 일부 실시양태에서, B 세포 고갈은 바이러스 입자의 투여 후 적어도 7일, 적어도 10일, 적어도 20일, 적어도 30일, 적어도 40일, 적어도 50일, 적어도 60일, 적어도 70일 또는 적어도 80일 동안 대상체에서 지속된다.

[0060] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 적어도 200만, 적어도 400만, 적어도 600만, 적어도 800만 또는 적어도 1000만개의 형질도입 단위가 대상체에게 투여된다.

[0061] 일부 실시양태에서, 면역 세포를 본 개시내용의 리간드와 접촉시키는 것은 대상체에서 항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포의 수를 적어도 10배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 500배 또는 적어도 1000배 증가시킨다.

[0062] 본 개시내용은 CD3에 특이적으로 결합하는 단일 사슬 가변 단편(항-CD3 scFv) 및 글리코포린 A 막관통(transmembrane) 단편을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0063] 일부 실시양태에서, 글리코포린 A 막관통 단편은 HFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLPSPDTDVPLSSVEIENPETSDQ (서열번호 105)와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0064] 일부 실시양태에서, 항-CD3 scFv는 서열번호 2 또는 12와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 폴리펩타이드는 서열번호 119와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 막관통 단편은 서열번호 13, 19, 25, 31, 37, 43, 또는 105와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0067] 본 개시내용은 렌티바이러스 입자의 표면 상에 전시(display)되는 본 개시내용에 따른 폴리펩타이드를 포함하는 표면-조작된 렌티바이러스 입자를 제공한다.

[0068] 본 개시내용은 본 개시내용에 따른 바이러스 입자를 생체내에서 면역 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포를 형질도입시키는 방법을 제공한다.

[0069] 본 개시내용은 항-CD3 scFv 및 글리코포린 A 막관통 단편을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0070] 일부 실시양태에서, 글리코포린 A 막관통 단편은 서열번호 106과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 항-CD3 scFv는 서열번호 7 또는 15와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 폴리펩타이드는 서열번호 120과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도

99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 막관통 단편은 서열번호 16, 22, 25, 28, 34, 40, 47 또는 106과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0074] 본 개시내용은 하기를 포함하는 바이러스 입자의 제조 방법을 제공한다:

[0075] a) 배양 배지에 세포를 제공하는 단계; 및

[0076] b) 세포를 본 개시내용에 따른 벡터 게놈, 전달 플라스미드 및 패키징 플라스미드로 동시에 또는 순차적으로 형질감염시키는 단계; 이로써 세포는 표면-조작된 바이러스 입자를 발현함.

[0077] 본 개시내용은 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키는 단계, 및/또는 서열번호 2 또는 12와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 바이러스 외피의 표면에 접합되고/거나 표면에 노출된 항-CD3 단일-사슬 가변 단편을 발현하는 바이러스 입자를 생성하는 단계, 및 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 악성 CD19+ 세포와 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0078] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 복강내, 피하 또는 결절내 주사에 의해 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 렌티바이러스 벡터의 293T 역가의 그래프이다. 12웰 플레이트에 사전에 파종된 293T 세포에 대해 아미콘-농축된 렌티바이러스 벡터 제조물을 적정했다. 3일 후, 형질도입된 세포를 mCherry 발현에 대해 평가했다. 계산된 바이러스 역가가 표시된다.

도 2a는 자극되거나 자극되지 않고 벡터 없이 형질도입된 PBMC에서 CD25 발현 및 mCherry 양성 발현 T 세포를 측정하기 위한 유세포분석을 보여준다. 형질도입 4일 후 PBMC를 수확하고 염색했다.

도 2b는 자극되거나 자극되지 않고 5 ul 또는 25 ul Cocal 벡터로 형질도입된 PBMC에서 CD25 발현 및 mCherry 양성 발현 T 세포를 측정하기 위한 유세포분석을 보여준다. 형질도입 4일 후 PBMC를 수확하고 염색했다.

도 2c는 자극되거나 자극되지 않고 5 ul 또는 25 ul αCD3+Cocal 벡터로 형질도입된 PBMC에서 CD25 발현 및 mCherry 양성 발현 T 세포를 측정하기 위한 유세포분석을 보여준다. 형질도입 4일 후 PBMC를 수확하고 염색했다.

도 2d는 자극되거나 자극되지 않고 5 ul 또는 25 ul αCD3-Blind-Cocal 벡터로 형질도입된 PBMC에서 CD25 발현 및 mCherry 양성 발현 T 세포를 측정하기 위한 유세포 분석을 보여준다. 형질도입 4일 후 PBMC를 수확하고 염색했다.

도 3은 αCD19 CAR 및 2A 펩타이드 발현의 유세포분석 플롯을 보여준다. 자극되지 않은 PBMC 세포를 라파마이신에서 배양 후 RACR-αCD19 CAR 및 2A에 대해 염색했다. 자극되지 않은 PBMC를 표시된 벡터(VT103, RACR-αCD19 CAR MND-Cocal, RACR-αCD19 CAR CMV-Cocal, RACR-αCD19 CAR CMV-αCD3-Cocal, RACR-αCD19 CAR CMV-αCD3-(B)Cocal) 각각 100ul로 형질도입시켰다. 형질도입 4일 후, 라파마이신을 첨가했고, 세포를 11일 동안 배양했다. 그런 다음 PBMC를 수확하고 αCD19 CAR 및 2A 펩타이드에 대해 염색했다.

도 4는 αCD19 CAR 및 2A 펩타이드 발현의 유세포분석 플롯을 보여준다. 블리나투모맙-자극된 PBMC 세포를 라파마이신에서 배양 후 RACR-αCD19 CAR 및 2A에 대해 염색했다. 블리나투모맙-자극된 PBMC는 표시된 벡터(RACR-αCD19 CAR MND-Cocal, RACR-αCD19 CAR CMV-Cocal, RACR-αCD19 CAR CMV-αCD3-Cocal, RACR-αCD19 CAR CMV-αCD3-(B)Cocal) 각각 100ul로 형질도입시켰다. 형질도입 4일 후, 라파마이신을 첨가하고 세포를 11일 동안 배양했다. 그런 다음 PBMC를 수확하고 αCD19 CAR 및 2A 펩타이드에 대해 염색했다.

도 5는 αCD19 CAR+ CD8 T 세포의 유세포분석 플롯을 보여준다. 자극되지 않은 PBMC를 실시예 2에 기재된 바와 같이 RACR-αCD19 CAR/αCD3-Cocal 벡터로 형질도입시켰다. 형질도입 4일 후, 라파마이신을 배양물에 첨가했다. 13일 후 세포를 Raji 세포로 자극하고 실시예 2에 기술된 바와 같이 세포내 사이토카인 생성을 측정했다. 생존성, CD3+, CD8+, 2A+ 세포를 보여준다.

도 6은 αCD19 CAR+ CD4 T 세포의 유세포분석 플롯을 보여준다. 자극되지 않은 PBMC를 실시예 2에 기재된 바와 같이 RACR-αCD19 CAR/αCD3-Cocal 벡터로 형질도입시켰다. 형질도입 4일 후, 라파마이신을 배양물에 첨가했다. 13일 후 세포를 Raji 세포로 자극하고 실시예 2에 기술된 바와 같이 세포내 사이토카인 생성을 측정했다. 생존

성, CD3+, CD8+, 2A+ 세포를 보여준다.

도 7a는 CD25를 발현하는 CD8+ T 세포의 유세포분석 플롯을 보여준다. MOI=2에서 CD8+ T 세포에 대해 분석된 αCD19 CAR-TGFβDN 및 Cocal 또는 αCD3-Cocal-위형 바이러스 외피 단백질로 형질도입된 PBMC의 대표적인 유세포분석 플롯.

도 7b는 0.5 MOI, 1.0 MOI 또는 2.0 MOI에서 αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 바이러스 입자로 형질도입되고 자극되지 않은 PBMC에 3일 동안 첨가된 %CD25 T 세포의 그래프를 보여준다.

도 8a는 2A 펩타이드를 발현하는 CD8+ T 세포의 유세포분석 플롯을 보여준다. MOI=2에서 CD8+ T 세포에 대해 분석된 αCD19 CAR-TGFβDN 및 Cocal 또는 αCD3-Cocal-위형 바이러스 외피 단백질로 형질도입된 PBMC의 대표적인 유세포분석 플롯.

도 8b는 0.5 MOI, 1.0 MOI 또는 2.0 MOI에서 αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 바이러스 입자로 형질도입되고 자극되지 않은 PBMC에 6일 동안 첨가된 %αCD19 CAR+ T 세포의 그래프를 보여준다.

도 9a는 0.5 MOI, 1.0 MOI 또는 2.0 MOI에서 αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 바이러스 입자로 형질도입되고 3, 6 또는 12일 동안 자극되지 않은 PBMC에 첨가된 %αCD19 CAR+ CD4 T 세포의 그래프를 보여준다.

도 9b는 0.5 MOI, 1.0 MOI 또는 2.0 MOI에서 αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 바이러스 입자로 형질도입되고 자극되지 않은 PBMC에 3, 6 또는 12일 동안 첨가된 %αCD19 CAR+ CD8 T 세포의 그래프를 보여준다.

도 10a는 Cocal 외피 단백질을 갖는 αCD19 CAR-TGFβDN, αCD19 CAR-RACR, 또는 RACR-αCD19 CAR 벡터로 형질도입된 %αCD19 CAR+ 293T 세포의 그래프를 보여준다. 바이러스 입자 제조물의 293T 역가(TU/ml)도 표시된다.

도 10b는 αCD3-Cocal 외피 단백질을 갖는 αCD19 CAR-TGFβDN, αCD19 CAR-RACR 또는 RACR-αCD19 CAR 벡터로 형질도입된 %αCD19 CAR+ 293T 세포의 그래프를 보여준다. 바이러스 입자 제조물의 293T 역가(TU/ml)도 표시된다.

도 11a는 MOI=1.5 αCD19 CAR-TGFβDN 벡터로 형질도입된 자극되지 않은 PBMC에서 αCD19 CAR 및 2A 펩타이드를 발현하는 CD8 T 세포를 측정하는 유세포분석을 보여주며, PBMC 형질도입 8일 후 Cocal 또는 αCD3-Cocal-위형 바이러스 외피 단백질을 수확하고 염색했다. 생존성, CD3+, CD8+ 세포에 게이팅됨.

도 11b는 MOI=1.5 RACR-αCD19 CAR 벡터로 형질도입된 자극되지 않은 PBMC에서 αCD19-CAR 및 2A 펩타이드를 발현하는 CD8 T 세포를 측정하는 유세포분석을 보여주며, PBMC 형질도입 8일 후 Cocal 또는 αCD3-Cocal-위형 바이러스 외피 단백질을 수확하고 염색했다. 생존성, CD3+, CD8+ 세포에 게이팅됨.

도 11c는 MOI=1.5 αCD19 CAR-RACR 벡터로 형질도입된 자극되지 않은 PBMC에서 αCD19-CAR 및 2A 펩타이드를 발현하는 CD8 T 세포를 측정하는 유세포분석을 보여주며, PBMC 형질도입 8일 후 Cocal 또는 αCD3-Cocal-위형 바이러스 외피 단백질을 수확하고 염색했다. 생존성, CD3+, CD8+ 세포에 게이팅됨.

도 12는 실시예 5에 기술된 연구 프로토콜의 개략도를 보여준다.

도 13a는 MOI=0 세포인 대조군의 형질도입 후 d8(라파마이신 및/또는 Raji 처리의 시작), d15, d22에서 단일/생/CD3+/CD8+ 세포 중 P2A(CAR) 및 세포 활성(CD71)에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다.

도 13b는 RACR-αCD19 CAR 지향성 벡터에 의해 형질도입된 세포의 형질도입후 d8(라파마이신 및/또는 Raji 처리 시작), d15, d22에서 단일/생/CD3+/CD8+ 세포 중 P2A(CAR) 및 세포 활성(CD71)에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다. 빨간색 화살표는 RACR-αCD19 CAR 2A+ 집단을 나타낸다.

도 13c는 αCD19 CAR-RACR 지향성 벡터에 의해 형질도입된 세포의 형질도입 후 d8(라파마이신 및/또는 Raji 처리 시작), d15, d22에서 단일/생/CD3+/CD8+ 세포 중 P2A(CAR) 및 세포 활성(CD71)에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다. 검은색 화살표는 αCD19 CAR-RACR 2A+ 집단을 나타낸다.

도 14는 CD8+ CAR-T 세포, 및 세포가 라파마이신으로 처리된 경우에만 검출가능한 "스니키(sneaky)" RACR-αCD19 CAR-T 집단(빨간색 화살표)의 라파마이신 농축에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다.

도 15는 연구 8일부터 22일까지 확장된 경우 전체 CD8+ CAR-T 세포의 그래프를 보여준다. 세포 확장은 라파마이신 부재에 비해 라파마이신 존재 시에 22일까지 증가했다. 가장 큰 확장은 라파마이신 및 Raji 세포 첨가 시에 일어났다.

도 16a는 라파마이신의 존재 및 부재 하에 CD3+(T 세포) 및 GFP(Raji 세포)에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다. Raji 세포는 대조군 MOI=0 세포에서 라파마이신으로 처리된 공동배양 웰에서 감소되었다.

도 16b는 라파마이신의 존재 및 부재 하에 CD3+(T 세포) 및 GFP(Raji 세포)에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다. Raji 세포는 RACR-αCD19 CAR 지향성 벡터로 형질도입된 공동배양 웰에서 감소되었다.

도 16c는 라파마이신의 존재 및 부재 하에 CD3+(T 세포) 및 GFP(Raji 세포)에 대한 유세포분석 플롯을 보여준다. Raji 세포는 αCD19 CAR-RACR 지향성 벡터에 의해 형질도입된 공동배양 웰에서 감소되었다.

도 17a는 CD3+ 세포에서 CAR+ T 세포/ul 혈액의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다.

도 17b는 비-CD3+ 세포에서 CAR+ T 세포/ul 혈액의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다.

도 18A는 연구 종료 시 %CD20+ 대 CD45+ T 세포 비율의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다.

도 18B는 연구 종료 시 %CD3+ 대 CD45+ T 세포 비율의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다.

도 19A는 연구 전반에 걸쳐(0일 - 30일) B 세포/ul 전체 혈액의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다. 막대는 평균의 +/- 표준 오차를 나타낸다.

도 19B는 비장에서 B 세포(총 CD45+의 빈도)의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다. 막대는 각 그룹의 중앙값을 나타낸다.

도 19C는 골수에서 B 세포(총 CD45+의 빈도)의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다. 막대는 각 그룹의 중앙값을 나타낸다.

도 20a는 29일에 연구 종료 시, 혈액, 비장 및 골수에서 αCD4 CAR T 세포의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다. 개별 값은 배경 공제 후 표시된 T 세포 집단 내 CAR+ 세포의 빈도를 나타낸다. 막대는 각 그룹의 중앙값을 나타낸다.

도 20b는 29일에 연구 종료 시, 혈액, 비장 및 골수에서 αCD8 CAR T 세포의 유세포분석 정량화 그래프를 보여준다. 개별 값은 배경 공제 후 표시된 T 세포 집단 내 CAR+ 세포의 빈도를 나타낸다. 막대는 각 그룹의 중앙값을 나타낸다.

도 21a는 3일, 10일, 14일 및 21일에 혈액에서 CAR 페이로드 통합 그래프를 보여준다. 벡터 카피 수는 기준 게놈으로서 인간을 사용하여 디지털 액적 PCR(ddPCR)로 결정했다. 막대는 각 그룹의 중앙값을 나타낸다.

도 21b는 10일 및 29일에 골수에서 CAR 페이로드 통합 그래프를 보여준다. 벡터 카피 수는 기준 게놈으로서 인간을 사용하여 디지털 액적 PCR로 결정했다. 막대는 각 그룹의 중앙값을 나타낸다.

도 22a는 본 개시내용의 바이러스 입자의 실시양태의 다이어그램을 보여준다.

도 22b는 본 개시내용의 바이러스 입자의 실시양태의 다이어그램을 보여준다.

도 23A 및 23B는 의약품 전이유전자의 개략도를 보여준다. 전이유전자는 FMC63 scFv, 짧은 IgG4 힌지 및 4-1BB/CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 항-CD19-CAR을 암호화한다. 항-CD19-CAR 다음에는 P2A 리보솜 스키핑 서열 및 라파마이신 활성화된 사이토카인 수용체 카세트(FRB-RACR)가 후속된다.

도 24는 의약품의 작용 메카니즘의 개략도를 보여준다. 렌티바이러스 입자는 항-CD3 scFv를 통해 생체내에서 T 세포에 결합하고, 이는 동시에 T 세포를 활성화하고 렌티바이러스 내재화를 용이하게 한다. αCD19 CAR-RACR 작제물-함유 캡시드는 t시토졸로 방출되어 DNA로 역전사되고 게놈 내로 통합된다. 형질도입된 T 세포는 항-CD19 CAR을 발현하고 CD19-발현 종양 세포를 표적화한다.

도 25는 RACR 시스템의 개략도를 보여준다.

도 26a는 단일 공여자로부터의 CD8 T 세포에 대한 CD25 발현의 대표적인 유동 플롯을 보여준다. 모든 샘플은 생존성, CD3+ 및 CD4+/CD8+ 세포에 대해 게이팅되었다.

도 26b는 두 CD8+ T 세포에 대한 다수의 MOI에 따라 3 공여자 모두로부터의 CD25 발현%를 보여준다. 모든 샘플은 생존성, CD3+ 및 CD4+/CD8+ 세포에 대해 게이팅되었다.

도 26c는 두 CD4+ T 세포에 대한 다수의 MOI에 걸친 3 공여자 모두로부터의 CD25 발현%를 보여준다. 모든 샘플은 생존성, CD3+ 및 CD4+/CD8+ 세포에 대해 게이팅되었다.

도 27a는 17일에 +/- 라파마이신 하에, 단일 공여자로부터의 αCD19 CAR+ CD8+ T 세포의 대표적인 유동 플롯을 보여준다. CAR+ 세포는 생존성, CD3+ 및 CD8+ 세포에 대해 게이팅된다.

도 27b는 총 CD8+ T 세포의 CAR+ 세포 %를 보여준다. CAR+ 세포는 생존성, CD3+ 및 CD8+ 세포에 대해 게이팅된다.

도 27c는 CAR+ CD8+ T 세포의 웰당 총 카운트의 CAR+ 세포 %를 보여준다. CAR+ 세포는 생존성, CD3+ 및 CD8+ 세포에 대해 게이팅된다. 웰당 총 CAR+ 세포를 계산하기 위해, 총 CAR 카운트는 카운팅 비드에 대해 정규화했다. 유사한 데이터가 CAR+CD4+ T 세포에서 수득되었다(도시되지 않음).

도 28은 형질도입되지 않은 T 세포 또는 의약품 바이러스 입자-형질도입된 T 세포와 대략 1:1의 E:T 비율로 1주 동안 공동배양된 GFP+ Raji 세포의 대표적인 유세포분석 플롯을 보여준다. 원형 게이트는 Raji 세포 집단을 나타내며, 이는 의약품 바이러스 입자-형질도입된 T 세포와의 공동배양물에 존재하지 않으며 라파마이신 처리 단독에 대한 반응으로도 감소된다. UB-VV100은 의약품을 나타낸다.

도 29a는 0일에서 딩글(dingle) 공여자로부터의 비-자극된 PBMC에 첨가된 의약품의 대표적인 유세포분석 플롯을 보여준다. 3일 후(3일) 세포를 세척하여 바이러스 입자를 제거하고 신선한 배지를 첨가했다. 그런 다음 세포를 반으로 나누고 한 그룹에 라파마이신(10nM)을 투여했다. 20일째에, 기능적 반응은 골지 저해제 브레펠딘 A 및 모넨신의 존재하에 Raji 종양 세포로 5시간 동안 자극함으로써 평가했다. 세포를 수집하고 Live/Dead™, 표면 마커 및 세포내 IFN-γ에 대해 염색했다. 샘플링된 모든 세포는 생존 가능한 Raji-, CD3+ 및 CAR+ 세포에 대해 게이팅했다.

도 29b는 0일에 딩글 공여자로부터 비-자극된 PBMC에 첨가된 의약품의 대표적인 유세포분석 플롯을 보여준다. 3일 후(3일째) 세포를 세척하여 바이러스 입자를 제거하고 신선한 배지를 첨가했다. 그런 다음 세포를 반으로 나누고 한 그룹에 라파마이신(10nM)을 투여했다. 20일째에, 기능적 반응은 골지 저해제 브레펠딘 A 및 모넨신의 존재하에 Raji 종양 세포로 5시간 동안 자극함으로써 평가했다. 세포를 수집하고 Live/Dead™, 표면 마커 및 TNF-α에 대해 염색했다. 샘플링된 모든 세포는 생존 가능한 Raji-, CD3+ 및 CAR+ 세포에 대해 게이팅했다.

도 30a는 혈액, 비장 및 골수에서 유세포분석(생/단세포/인간 CD45+/CD3-CD20+에 의해 정의됨)에 의해 평가된 B 세포 집단의 그래프를 보여준다. 오차 막대는 평균의 +/- 표준 오차를 나타낸다. ****는 p<0.0001, 이원 ANOVA 다중 비교를 나타낸다. 막대는 그룹당 중앙값을 나타낸다. * 및 ***는 각각 p<0.05 및 <0.001, 양측 T-테스트를 나타낸다. UB-VV100은 의약품을 나타낸다.

도 30b는 ddPCR을 사용하여 말초 백혈구 페이로드 통합에 의해 검출된 CAR T 세포의 그래프를 보여준다. UB-VV100은 의약품을 나타낸다.

도 30c는 유세포분석을 사용하여 말초 백혈구 페이로드 통합에 의해 검출된 CAR T 세포의 그래프를 보여준다. UB-VV100은 의약품을 나타낸다.

도 31a는 예시적인 렌티바이러스 벡터 용량 탐색 연구를 위한 연구 시간표를 보여준다.

도 31b는 혈액의 B 세포/ul을 보여준다. 용량 의존적 항원 특이적 VV100 활성이 관찰되었고, FITC RACR 그룹에서 B 세포 고갈은 존재하지 않았다. 25일째 B 세포 고갈은 정체되었고, 26일째 비히클 그룹을 제외한 모든 그룹에 대해 라파마이신 처리를 시작했다. Raji 세포는 40일째 SC로 이식했다.

도 31c는 혈액의 CAR T 세포/ul를 보여준다. CAR T 세포/ul의 증가는 10E6 VV100 처리군에서 관찰되었고 CAR T 세포는 라파마이신 처리 후 2E06 VV100 처리군에서 검출 가능하게 되었다.

도 32a 및 32b는 공식 (W^2 × L)/2를 사용하여 캘리퍼스로 측정한 종양 성장(A) 및 유세포분석에 의해 분석된 종양 CAR T 세포(B)를 보여준다. 종양 성장의 저해는 용량 의존적인 것으로 나타난다; FITC RACR 처리된 마우스에서 RAJI 종양 성장 저해는 관찰되지 않았다. $10E^6$ VV100 처리된 마우스의 종양에서 더 높은 CAR T 세포 빈도.

도 33a는 81일째 골수(왼쪽) 및 비장(오른쪽)에서 CAR T 세포의 세포측정 분석을 보여준다. 고용량의 UB-VV100은 투약 후 81일째에 골수 및 비장에서 부분적인 B 세포 고갈을 지속한다.

도 33b는 81일째 골수(왼쪽) 및 비장(오른쪽)에서 B 세포의 세포측정 분석을 보여준다. 고용량의 UB-VV100은 투약 후 81일째 골수 및 비장에서 부분적인 B 세포 고갈을 지속한다.

도 33c는 DNA에 대해 정규화된 혈액, 골수, 간, 난소 및 신장에서의 전이유전자 통합 이벤트의 분석을 보여준다. 오차 막대는 +/- 1 SEM을 나타낸다. 가로 막대는 중앙값을 나타낸다. 점선은 FDA 지침 검출 임계값으로서 50개 벡터 카피/ug DNA를 나타낸다.

도 34a는 Nalm-6 종양 모델을 사용한 예시적인 렌티바이러스 벡터 생체내 효능 연구에 대한 연구 시간표를 보여준다.

도 34b는 Nalm-6 효능 연구의 상이한 그룹에서의 체중 변화를 보여준다.

도 35a는 종양 부하의 지표로서 연구 전반에 걸쳐 Nalm-6 효능 연구의 상이한 그룹의 총 플럭스(p/s)를 보여준다. VV100 처리는 총 플럭스(Total Flux)로 측정된 종양 부하를 유의미하게 감소시켰고 비히클 그룹의 모든 마우스는 연구 20일까지 Nalm-6 종양으로 사망했으며 VV100 처리를 받은 마우스는 연구 41일까지 생존을 연장했다.

도 35b는 연구 전반에 걸친 Nalm-6 효능 연구의 상이한 그룹의 생존 곡선을 보여준다. VV100 처리는 생존율을 상당히 증가시켰고 비히클 그룹의 모든 마우스는 연구 20일까지 Nalm-6 종양으로 사망했으며 VV100 처리를 받은 마우스는 연구 41일까지 생존을 연장했다.

도 36은 연구 전반에 걸친 Nalm-6 그룹의 각각의 개별 마우스에 대한 총 플럭스 데이터를 보여준다. 비히클(왼쪽 위) 및 비히클+라파마이신(오른쪽 위) 그룹의 마우스는 연구 10일부터 질환 부하가 상승되었다. 이 그룹의 마우스는 17일까지 안락사되어야 했다. VV100 그룹(왼쪽 아래)의 마우스는 17일째 시작하는 질환 부하는 감소했지만, 이 그룹에서 VV100의 효과는 일시적이었다. VV100 + 라파마이신 그룹의 모든 마우스(오른쪽 아래)는 17일째 시작하는 질환 부하가 크게 감소했으며 2마리의 마우스에서는 낮은 질환 부하가 남아 있었다. 이 그룹에서 단 한 마리의 마우스만이 초기 회귀 후 종양 부하가 증가했다.

도 37은 총 플럭스 히트맵 오버레이를 사용한 Nalm-6 그룹 생물발광 이미징을 보여준다. 왼쪽에서 오른쪽으로: 17일째 Nalm-6 질환으로 사망한 비히클 그룹의 마우스, 20일경에 질환으로 사망한 비히클 + 라파마이신 그룹의 마우스, 질환 부하의 일시적 감소를 나타낸 VV100 처리 그룹의 대부분의 마우스, 마우스 대부분에서 낮거나 검출가능하지 않은 상태에 머무르는 질환 부하의 유의미한 감소를 나타낸 VV100 + 라파마이신 그룹의 마우스, 1마리의 마우스에서는 종양 부하가 부분적으로 감소한 후 증가했음.

도 38a는 혈액의 평균 CAR T 세포/ul를 보여준다. UB-VV100 단독으로 처리된 마우스는 17일째에 검출 가능한 순환 CAR T 세포가 정점에 이르렀고 혈액에서는 전반적으로 낮은 수준을 보였다. UB-VV100 + 라파마이신 그룹에서 순환 CAR T 세포는 시간이 지남에 따라 증가했으며 UB-VV100 단독 그룹보다 유의미하게 높았다. 마우스 10은 D38에 228 CAR T 세포/ul로부터 41일에 3397.69로 증가하는 말초 혈액 내 CAR T 세포의 상당한 확장을 보였다.

도 38b는 각각의 개별 마우스에 대한 혈액의 CAR T 세포/ul를 보여준다. UB-VV100 단독으로 처리된 마우스는 17일째 검출 가능한 순환 CAR T 세포가 정점에 이르렀고 혈액에서는 전반적으로 낮은 수준을 보였다. UB-VV100 + 라파마이신 그룹에서 순환 CAR T 세포는 시간이 지남에 따라 증가했으며 UB-VV100 단독 그룹보다 유의미하게 높았다. 마우스 10은 D38에 228 CAR T 세포/ul로부터 41일에 3397.69로 증가하는 말초 혈액 내 CAR T 세포의 상당한 확장을 보였다.

도 39a는 골수 및 비장에서 전체 면역 세포의 CAR T 세포 빈도를 보여준다. 41일째 총 면역 세포 집단에서 CAR T 세포 빈도는 두 조직 모두의 VV100 + 라파마이신 처리군에서 더 높고 비장에서보다 골수에서 더 높다.

도 39b는 골수 및 비장에서 인간 T 세포의 T 세포 빈도를 보여준다. 41일째에, 골수 및 비장의 T 세포 집단에서 CAR T 세포의 빈도는 VV100 처리에서보다 VV100 + 라파마이신 처리 그룹에서 유의미하게 더 높다.

도 40a는 CD25에 대한 유세포분석에 의한 PBMC의 활성화를 보여준다.

도 40b는 CAR 발현에 대한 유세포분석에 의한 PBMC의 형질도입 효율을 보여준다.

도 41a는 UB-V100으로 형질도입되고 10nM 라파마이신과 함께 또는 없이 배양된 PBMC에서 CAR T 세포의 유세포분석 패널을 보여준다.

도 41b는 UB-V100으로 형질도입되고 10nM 라파마이신과 함께 또는 없이 배양된 PBMC에서의 T 세포 수율 및 백분율의 차트를 보여준다. 요약된 플롯은 3명의 PBMC 공여자의 데이터를 조합하고 오차 막대는 + 1 SEM을 나타낸다. **, *** 및 ***는 p 값 <0.01, 0.001 및 0.0001, 시간 경과에 따른 라파마이신 처리에 대한 이원 ANOVA

다중 비교를 나타낸다.

도 42a는 UB-VV100 형질도입에 의해 생성된 CD8+ CAR T 세포에서 INFγ의 세포내 염색에 의한 유세포 분석 및 통계적 분석을 보여준다.

도 42b는 UB-VV100 형질도입에 의해 생성된 CD8+ CAR T 세포에서의 표면 CD107a 발현의 유세포 분석 및 통계 분석을 보여준다.

도 42c는 UB-VV100으로 형질도입된 PBMC의 존재 하에 Raji 세포 생존성의 통계적 분석을 보여준다.

도 43a는 UB-VV100 형질도입 시점에 B-ALL 환자로부터의 PBMC 샘플의 유세포분석 패널을 보여준다.

도 43b는 UB-VV100 형질도입 7일 후 B-ALL 환자로부터의 PBMC 샘플의 유세포분석 패널을 보여준다.

도 43c는 UB-VV100 형질도입 7일 후 B-ALL 환자로부터의 PBMC 샘플의 유세포분석 패널을 보여준다.

도 44a-44d는 UB-VV100 형질도입 시점에 DLBCL 환자로부터의 PBMC 샘플의 유세포분석 패널을 보여준다.

도 45a 및 45b는 CD34-NSG 마우스에서의 순환 B 세포 수준을 보여준다. 인간 B 세포 수준(단일 세포, 살아있는 세포 및 hCD45+ 세포에 대해 게이팅된 hCD20+ 집단)은 유세포분석 인간 면역 세포 항체 패널을 사용하여 CD34-NSG 마우스(그룹 7-10)의 혈액에서 측정되었다. 데이터는 (A) 인간 B 세포 카운트(카운팅 비드를 사용하여 혈액 부피에 대해 정규화된 hCD20+ 세포의 정량화된 수) 또는 (B) 인간 B 세포 빈도(hCD20+인 hCD45+ 세포 집단의 %)로 표시된다. 데이터는 평균 ± SEM이다. 각 그룹의 동물 수는 안락사 및 예정되지 않은 사망을 설명하는 연구 설계 표의 개요에 따른다(n=2/비히클 그룹/시점; n=4/UB-VV100 그룹/시점). 통계는 Tukey의 조정과 함께 이원 ANOVA 주요 효과 컬럼 테스트를 사용하여 결정했다; ** = p<0.01, *** = p<0.001, **** = p<0.0001. CAR = 키메라 항원 수용체; h = 인간.

도 46a 및 46b는 CD34-NSG 마우스의 혈액 내 CAR-T 세포 수준을 보여준다. CAR-T 세포 수준(단일 세포, 살아있는 세포, hCD45+ 세포 및 hCD3+ 세포에 대해 게이팅된 CAR+ 집단)은 CD34-NSG 마우스(그룹 7-10)의 혈액에서 αCD19 CAR 작제물의 FMC63 영역을 표적으로 하는 항체를 함유하는 유세포분석 인간 면역 세포 항체 패널을 사용하여 CD34-NSG 마우스(그룹 7-10)의 혈액에서 측정했다. 데이터는 (A) CAR-T 세포 빈도(CAR+인 hCD3+ 세포 집단의 %) 또는 (B) 카운팅 비드를 사용하여 혈액 부피에 대해 정규화된 검출된 CAR-T 세포의 절대 수로 표시된다. 데이터는 평균 ± SEM이다. 각 그룹의 동물 수는 안락사 및 예정되지 않은 사망을 설명하는 연구 설계 표의 개요에 따른다(n=2/비히클 그룹/시점; n=4/UB-VV100 그룹/시점). 통계는 Tukey의 조정과 함께 이원 ANOVA 주요 효과 컬럼 테스트를 사용하여 결정했다; ** = p<0.01, *** = p<0.001, **** = p<0.0001. CAR = 키메라 항원 수용체; h = 인간.

도 46c는 CD34-NSG 마우스의 비장에서 마우스 면역 세포의 형질도입을 보여준다. CAR+ 마우스 면역 세포 수준(단일 세포, 살아있는 세포 및 mCD45+ 세포에 대해 게이팅된 CAR+ 집단)은 4주차 예정된 부검 후 비장에서 측정했다(그룹 7, 8, 10). CAR+ 세포 검출은 αCD19 CAR 작제물의 FMC63 영역을 표적으로 하는 항체를 함유하는 유세포 분석 인간 면역 세포 항체 패널을 사용하여 달성했다. 막대는 평균 ± SEM이며 점은 개별 마우스를 나타낸다. 비히클 + 라파마이신 그룹의 경우 n = 2, 저용량 + 라파마이신 및 고용량 + 라파마이신 그룹의 경우 n = 4. 통계는 다중 비교를 위한 Tukey의 조정과 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정했다; ** = p<0.01, *** = p<0.001, **** = p<0.0001. CAR = 키메라 항원 수용체, m = 마우스.

도 46d는 CD34-NSG 마우스에서 UB-VV100 생체분포를 보여준다. UB-VV100 통합 벡터 게놈의 카피는 처리 1주 또는 4주 후 예정된 부검에서 CD34-NSG 마우스의 골수, 비장, 간, 심장, 폐, 신장, 뇌 및 생식선으로부터 추출한 게놈 DNA에서 수행된 ddPCR을 사용하여 측정했다(그룹 7-10). 데이터는 게놈 DNA 1ug당 증폭된 영역(ssCD19)의 카피로 표시된다. 데이터 막대는 평균 ± SEM이며 각 점은 개별 마우스를 나타낸다. 비히클 + 라파마이신(그룹 7)의 경우 n = 2, 저용량 + 라파마이신(그룹 8) 및 고용량 + 라파마이신(그룹 10)의 경우 n=4, 저용량 - 라파마이신(그룹 9)의 경우 n=3. 1주 및 4주차의 생식선에 대한 데이터는 수집되지 않았다.

도 47은 간 및 비장에서의 다중 RNA ISH 염색을 보여준다. 고용량 UB-VV100 및 라파마이신(TOX001_48)으로 처리된 CD34-NSG 마우스로부터의 간 및 비장의 대표적인 이미지. DAPI는 흰색, UB-VV100의 RACR 서열을 인식하는 맞춤형 프로브는 노란색, 인간 CD3 RNA ISH 프로브 풀(pool)은 녹색, 마우스 CD68 RNA ISH 프로브는 빨간색, 마우스 Pecam RNA ISH 프로브는 파란색으로 표시된다. 인간 CAR-T 세포는 흰색 화살표로 표시된다.

도 48은 CAR+ Nalm6 세포가 감소된 표면 CD19 검출을 갖지만, 세포내 CD19 단백질 수준은 형질도입되지 않은 Nalm6 세포와 동일함을 보여준다. Nalm6 세포는 MOI 1, 10 및 20에서 VV100에 의해 형질도입되었다. 10일에 CAR+ Nalm6 세포는 (A) 표면 CD19 수준을 평가하기 위해 항-CD19 항체(클론 HIB19)로 염색했고 (B) 전체 CD19 단백질 수준을 결정하기 위해 세포내 CD19 에피토프에 결합하는 항-CD19 항체(클론 EPR5906)로 염색했다. 주황색 곡선은 CAR 및 P2A 양성 세포로 게이팅된 CAR+ Nalm6 세포로부터의 데이터를 나타낸다. 회색 곡선은 형질도입되지 않은 CD19+ Nalm6 부모 세포 또는 CD19 녹아웃 Nalm6 세포를 나타낸다.

도 49는 항-CD19 CAR-T 세포가 시험관내에서 CAR+ Nalm6 세포를 사멸시킬 수 있음을 보여준다. 형질도입된 Nalm6 GFP 세포(VV100, MOI 10)는 상이한 CAR-T 대 Nalm6 비율에서 3명의 건강한 공여자로부터의 형질도입된 PBMC(VV100, MOI 5)와 공동배양했다. 배경 비특이적 사멸에 대해 정규화하기 위해, 형질도입된 Nalm6 세포도 모의 형질도입된 PBMC와 함께 공동배양했다. 모의 형질도입된 PBMC는 표면에 항-CD3-scFv를 전시하지만 전이유전자 페이로드를 운반하지 않는 "빈(empty)" 바이러스 입자로 처리했다. 24시간 후, 형질도입된 Nalm6 세포는 유세포분석에 의한 세포내 전이유전자 발현에 기초하여 CAR+ Nalm6 세포로서 게이팅되었다. 모의 형질도입된 PBMC 공동배양 웰에 대해 정규화된 죽은 CAR+ Nalm6 세포의 빈도를 기준으로 용해 백분율을 계산했다.

도 50은 높은 종양 부하 모델에서 VV100 형질도입의 개략도를 보여준다. 이 높은 종양 부하 모델에서, 5e5 Nalm6 GFP 및 5e5 PBMC를 혼합하고 MOI 5에서 VV100으로 형질도입했다.

도 51은 Nalm6 세포 및 PBMC의 혼합된 집단을 VV100으로 형질도입시키면 CAR+ Nalm6 세포를 생성하며, 이는 항-CD19 CAR-T 세포에 의해 제거되었음을 보여준다. 0일에, 5e5 Nalm6 GFP 세포 및 건강한 공여자로부터의 5e5 PBMC를 혼합하고 MOI 5에서 VV100 또는 항-FITC CAR로 형질도입하거나 형질도입하지 않은 채로 두었다. 총 8명의 건강한 공여자를 평가했다. 형질도입 후, (A) CAR 전이유전자를 발현한 Nalm6 세포의 빈도, (B) CAR+ Nalm6 세포의 총 수, (C) 배양물 중 Nalm6 GFP 세포의 빈도 및 (D) 살아있는 Nalm6 GFP 세포의 총 수는 유세포분석으로 결정했다. 각 라인은 개별적인 건강한 공여자의 데이터를 나타낸다.

도 52는 Nalm6 세포 및 PBMC의 혼합된 집단을 VV100으로 형질도입시키면 CAR+ Nalm6 세포를 제거할 수 있는 항-CD19 CAR-T 세포를 생성함을 보여준다. 0일에, 5e5 Nalm6 GFP 세포 및 건강한 공여자로부터의 5e5 PBMC를 혼합하고 MOI 5에서 VV100 또는 항-FITC CAR로 형질도입하거나 형질도입하지 않은 채로 두었다. 총 8명의 건강한 공여자가 평가되었다. 형질도입 후, (A) CAR 전이유전자를 발현하는 CD3+ T 세포의 빈도 및 (B) αCD3 CAR-T 세포의 총 수를 유세포분석으로 측정했다. 각 라인은 개별적인 건강한 공여자의 데이터를 나타낸다.

도 53은 예시적인 렌티바이러스 벡터 생체내 효능 연구에 대한 연구 시간표를 보여준다.

도 54는 UB-VV100으로 처리된 동물의 생존성 연구를 보여준다. 비히클(N=5), 142(서열번호 121) 부착성 20E6(N=5), 201(서열번호 122) 부착성 2E6(N=6), VPN38 20E6(N=6), VPN38 100E6(N=6), VPN68 20E6(N=6), VPN68 100E6(N=6).

도 55는 UB-VV100 투여 3일 후 T 세포 표현형을 나타낸다. 마우스로부터 말초 혈액을 수집하고 유세포분석으로 분석하여 CD71 발현을 결정했다. 막대는 중앙값을 나타낸다. *, *, ** 및 ****는 p 값 <0.05, <0.01 및 <0.0001, 일원 ANOVA Tukey의 사후 비교 테스트를 나타낸다.

도 56a 및 56b는 UB-VV100으로 처리된 마우스에서 순환 CAR T 세포를 보여준다. 연속 주간 채혈 동안 동물로부터 혈액을 수집했다. CAR T 세포는 유세포분석으로 계수했다. 오차 막대는 +/-1 SD와 같다. 비히클(N=5), 142(서열번호 121) 부착성 20E6(N=5), 201(서열번호 122) 부착성 2E6(N=6), VPN38 20E6(N=6), VPN38 100E6(N=6), VPN68 20E6(N=6), VPN68 100E6(N=6).

도 57은 연구 전반에 걸친 평균 종양 부하를 보여준다. NALM-6 진행을 평가하기 위해 생물발광 이미징을 통해 모든 마우스를 격주로 모니터링했다. 오차 막대는 +/-1 SD와 같다. 비히클(N=5), 142(서열번호 121) 부착성 20E6(N=5), 201(서열번호 122) 부착성 2E6(N=6), VPN38 20E6(N=6), VPN38 100E6(N=6), VPN68 20E6(N=6), VPN68 100E6(N=6). 이들 마우스는 눈 종양을 유발하는 안와후 주사를 통해 NALM=6 세포를 투여받았다.

도 58a는 희생시 골수에 존재하는 NALM-6 GFP ffLUC 종양 세포의 백분율을 보여준다. 인도적 엔드포인트에 도달했을 때 마우스를 안락사시켰고, 이들의 골수를 수집하여 GFP+/CD45-/생세포의 빈도를 관찰하는 유세포 분석을 위해 처리했다.

도 58b는 희생시 비장에 존재하는 NALM-6 GFP ffLUC 종양 세포의 백분율을 보여준다. 인도적 엔드포인트에 도달했을 때 마우스를 안락사시켰고, 이들의 비장을 수집하여 GFP+/CD45-/생세포의 빈도를 관찰하는 유세포 분석을

위해 처리했다.

도 59는 본 개시내용의 렌티바이러스 표면 발현 플라스미드를 위한 예시적인 αCD3 scFv 작제물을 보여준다.

도 60은 다양한 예시적인 αCD3 scFv 표면 작제물을 갖는 렌티바이러스 입자에서 αCD3 scFv 발현의 백분율을 보여준다. 293T 세포를 표면 플라스미드 작제물에 변이를 가진 5개 플라스미드 시스템으로 형질감염시켰다. 생산자 293T 세포를 유세포 분석과 함께 항-테플리주맙 항체를 사용하여 αCD3 scFv 발현에 대해 분석했다. 바이러스를 수확하고 유세포분석에 의해 역가에 대해 분석된 Supt1 세포를 형질도입시키는 데 사용했다.

도 61은 다양한 예시적 αCD3 scFv 표면 작제물을 포함하는 렌티바이러스에 의해 형질도입된 Supt1 세포의 역가를 보여준다.

도 62는 T 세포 활성화를 보여주는 T 세포 활성화 생물검정(NFAT) 생물발광 세포 기반 검정에서 MOI의 함수로서 상대 광 단위(RLU)를 도시하는 그래프이다.

도 63은 NFAT 리포터 검정(RLU(MOI2))에 의한 αCD3 scFv 발현 및 T 세포 활성화의 상관관계를 도시하는 그래프이다.

도 64는 다양한 예시적인 αCD3 scFv 표면 작제물을 발현하고 αCD3 scFv를 가시화하기 위해 염색된 세포에 대한 대표적인 유세포분석 플롯을 보여준다.

도 65는 투약 후 24시간 후 및 부검 전에 수집된 개 혈액 샘플에서 αCD3-Cocal-GFP의 생체분포를 보여준다. 사전 부검: 그룹 1, 2, 3의 경우 8일, 그룹 4의 경우 29일. 각 기호는 단일 개체를 나타낸다. 결과는 조직 샘플에 대한 전체 개 DNA의 μg당 카피 수로서 나타내도록 외삽되었다. 점선은 검증의 일부인 qPCR 검정의 2개 매개변수를 나타낸다: 외삽 후 50 카피/μg DNA(10 카피/200 ng DNA)에서 정량화 하한(LLOQ) 및 외삽 후 25 카피/μg DNA(5 카피/200 ng DNA)에서 검출 한계(LOD). 로그 척도에서 음성 샘플을 가시화하기 위해 검출 불가능한 결과를 제공한 샘플에 그래픽 표현을 위해 1의 값을 부여했지만 이 연구에서는 여전히 검출 불가능한 것이었다.

도 66은 개 조직에서 αCD3-Cocal-GFP의 생체분포를 보여준다. 각 기호는 단일 개체를 나타낸다. 결과는 조직 샘플에 대한 전체 개 DNA의 μg당 카피 수로서 나타내도록 외삽되었다. 점선은 검증의 일부인 qPCR 검정의 2개 매개변수를 나타낸다: 외삽 후 50 카피/μg DNA(10 카피/200 ng DNA)에서 정량화 하한(LLOQ) 및 외삽 후 25 카피/μg DNA(5 카피/200 ng DNA)에서 검출 한계(LOD). 정량 한계(BLQ) 미만인 샘플에는 그래픽 표현을 위해 외삽 후 LLOQ와 LOD 값 사이인 37의 값이 제공되었다. 로그 척도에서 음성 샘플을 가시화하기 위해 검출 불가능한 결과를 제공한 샘플에 그래픽 표현을 위해 1의 값을 부여했지만 이 연구에서는 여전히 검출 불가능한 것이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 본 개시내용은 일반적으로 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 입자에 관한 것이며, 여기서 바이러스 입자는 생체내에서 면역 세포를 형질도입시킨다.

[0081] 본원에 기술된 방법 및 조성물은 바이러스 입자를 치료가 필요한 대상체에게 직접 투여하는 것을 용이하게 할 수 있다.

[0082] 시험관내 및 생체내 연구는 비-자극 T 세포를 활성화 및 형질도입하고, 이후 αCD19 CAR을 발현하고, 향상된 증식에 의해 라파마이신 처리에 반응하고, CD19를 발현하는 B-세포 악성종양 모델을 사멸시키는 본원에 기술된 방법 및 조성물의 능력을 입증한다.

[0083] 본 개시내용은 본 개시내용의 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 장애를 치료하고, 생체내에서 면역 세포를 형질도입시키고/시키거나, 항-CD19 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포를 이를 필요로 하는 대상체에서 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 라파마이신을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 바이러스 입자의 투여 전에 면역 세포의 사전-활성화에 대한 필요성을 제거한다. 일부 실시양태에서, 방법은 바이러스 입자의 투여 전에 대상체에서 면역 세포의 사전-활성화를 포함하지 않는다(예를 들어, 바이러스 입자의 투여 전 약 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 이내, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12주 이내에 사전-활성화를 포함하지 않음). 일부 실시양태에서, 면역 세포의 사전-활성화는, 선택적으로 각각 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 투여함에 의해, 면역 세포(예를 들어, T 세포)에서 CD3 및/또는 CD28 신호전달을 활성화하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 바이러스 입자의 투여 전에 별도의 CD3 및/또는 CD28 활성화제를 투

여하는 것을 포함하지 않는다.

[0084] *폴리뉴클레오타이드의 생체내 전달*

[0085] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 생체내에서 CAR의 생성을 허용하는 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드의 투여는 CAR의 직접 투여와 유사한 생체내 효과를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드의 투여는 입자의 생체내 형질도입 효율을 개선시킨다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 mRNA이다.

[0086] 일부 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오타이드의 생체내 전달은 시간 경과에 따라 CAR 발현을 발생시킨다(예를 들어, 몇 시간 내에 시작하여 며칠 동안 지속됨). 일부 실시양태에서, 이러한 폴리펩타이드의 생체내 전달은 암호화된 CAR의 바람직한 약동학, 약력학 및/또는 안전성 프로필을 초래한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드는 면역 활성화를 방지하고, 안정성을 증가시키고, 응집하는 임의의 경향을, 예를 들어 시간 경과에 따라 감소시키고/시키거나 불순물을 피하기 위한 하나 이상의 수단에 의해 최적화될 수 있다. 이러한 최적화는 개선된 세포내 안정성 및 해독 효율을 위해 변형된 뉴클레오사이드, 변형된 및/또는 특정 5' UTR, 3'UTR 및/또는 폴리(A) 테일 변형의 사용을 포함할 수 있다(예를 들어, Stadler 등, 2017, Nat.Med. 참조). 이러한 변형은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0087] 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, mRNA)의 생체내 전달을 위한 전략은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전략에 대한 요약은 전체 내용이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Mol Ther. 2019 Apr 10; 27(4) 710-728]을 참조한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 항-CD19 CAR을 발현하고 CD19-발현 종양 세포를 표적화하기 위해 T 세포를 생체내에서 형질도입시킬 수 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 다단계 작용 메카니즘을 갖는다:

[0090] (a) 바이러스 입자는 항-CD3 scFv를 통해 생체내에서 T 세포에 결합하고 T 세포를 활성화하며 Cocal 당단백질과의 상호작용을 통해 바이러스 입자 내재화를 용이하게 한다.

[0091] (b) 벡터 RNA 게놈인 αCD19 CAR-FRB-RACR은 DNA로 역전사되고 핵으로 이송되며 게놈 내로 통합된다.

[0092] (c) 형질도입된 T 세포는 항-CD19 CAR을 발현하고 CD19-발현 세포를 표적으로 하는 한편, 라파마이신-제어된 사이토카인 신호전달을 위한 FRB 및 RACR 시스템도 발현한다.

[0093] *투여 경로*

[0094] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 비경구, 정맥내, 근육내, 피하, 종양내, 복강내 및 림프내로 이루어지는 군으로부터 선택되는 경로를 통해 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 여러 번 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 바이러스 입자의 림프내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 바이러스 입자의 복강내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 결절내 주사에 의해 투여된다 - 즉, 바이러스 입자는 서혜부 림프절과 같은 림프절 내로의 주사를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 바이러스 입자를 종양 부위(즉, 종양내)로 주사함으로써 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 피하로 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 전신으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 동맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다.

[0095] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 복강내, 피하 또는 결절내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 복강내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 피하 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 결절내 주사에 의해 투여된다.

[0096] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 형질도입된 면역 세포는 대상체에게 투여된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 단일 주사로 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회 또는 적어도 10회 주사로서 투여된다.

[0098] *바이러스 입자*

[0099] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드

는 적어도 하나의 치료용 폴리펩타이드를 암호화한다. 용어 "치료용 폴리펩타이드"는 치료용으로 개발 중이거나 치료용으로 개발된 폴리펩타이드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료용 폴리펩타이드는 치료용 표적 세포(예를 들어, 숙주 T 세포)에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 치료용 폴리펩타이드는 T 세포 수용체, 키메라 항원 수용체 또는 사이토카인 수용체를 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 바이러스 입자는 레트로바이러스 입자이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 아데노-연관 바이러스 입자이다.

[0101] 바이러스 입자라는 용어는 핵산을 세포 내로 전달할 수 있는 거대분자 복합체를 지칭한다. 바이러스 벡터는 주로 바이러스에서 유래된 구조적 및/또는 기능적 유전자 요소를 함유한다. "레트로바이러스 벡터"라는 용어는 주로 레트로바이러스에서 유래된 구조적 및 기능적 유전자 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터를 지칭한다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스에서 유래되는 LTR을 포함하는 구조적 및 기능적 유전자 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터를 지칭한다. 용어 "혼성"은 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스 서열 및 비-렌티바이러스 바이러스의 서열을 모두 함유하는 벡터, LTR 또는 기타 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 혼성 벡터는 역전사, 복제, 통합 및/또는 패키징을 위한 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스 서열을 포함하는 벡터 또는 전달 플라스미드를 지칭한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 렌티바이러스 입자는 다음을 포함하는 복제 불능, 자가 불활성화(SIN) 렌티바이러스 벡터(LVV) 입자이다:

[0103] - 막-결합된 항-CD3 단일 사슬 가변 단편(scFv) 및 Cocal 당단백질의 발현을 포함하는 표면-조작된 바이러스 외피.

[0104] - 하기를 암호화하는 전이유전자:

[0105] 결합 도메인 FMC63 및 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인을 포함하는 2세대 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR);

[0106] 유도성 T 세포 증식 신호전달 시스템(라파마이신-활성화된 사이토카인 수용체, RACR); 및

[0107] 세포내 라파마이신에 결합하여 형질도입된 세포에 라파마이신-내성을 부여하는 포유동물의 라파마이신 표적(mTOR) 복합체로부터 유래된 인간 단백질 도메인(FRB).

[0108] *레트로바이러스 입자*

[0109] 레트로바이러스는 렌티바이러스, 감마-레트로바이러스 및 알파-레트로바이러스를 포함하며, 이들 각각은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 폴리뉴클레오타이드를 세포로 전달하는 데 사용될 수 있다. 렌티바이러스는 일반적인 레트로바이러스 유전자인 gag, pol 및 env 외에 조절 또는 구조적 기능을 가진 다른 유전자를 함유하는 복잡한 레트로바이러스이다. 더 높은 복잡성은 바이러스가 잠복 감염 과정에서와 같이 생활사를 조절할 수 있도록 한다. 예시적인 렌티바이러스는 HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 1형 및 HIV 2형 포함); 비스나-마에디 바이러스(VMV) 바이러스; 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 원숭이 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 백본은 HIV-기반 벡터 백본(즉, HIV 시스-작용 서열 요소)이다. 레트로바이러스 입자는 HIV 독성 유전자의 약독화를 배가시켜 생성되었고, 예를 들어, 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef가 결실되어 벡터를 생물학적으로 안전하게 만들었다.

[0110] 예시적인 렌티바이러스 입자는 문헌[Naldini 등(1996) Science 272:263-7; Zufferey 등(1998) J. Virol. 72:9873-9880; Dull 등(1998) J. Virol. 72:8463-8471; 미국 특허 제6,013,516호; 및 미국 특허 제5,994,136호에 기재된 것을 포함하며, 이들 각각은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다. 일반적으로, 이들 입자는 입자를 함유하는 세포의 선택, 렌티바이러스 입자에 외래 핵산의 혼입, 및 표적 세포 내로 핵산의 전달을 위해 필수적인 서열을 운반하도록 구성된다.

[0111] 일반적으로 사용되는 렌티바이러스 입자 시스템은 소위 3세대 시스템이다. 3세대 렌티바이러스 입자 시스템은 4개의 플라스미드를 포함한다. "전달 플라스미드"는 렌티바이러스 벡터 시스템에 의해 표적 세포로 전달되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 암호화한다. 전달 플라스미드는 일반적으로 숙주 게놈 내로 전달 플라스미드 서열의 통합을 용이하게 하는 긴 말단 반복(LTR) 서열이 측면에 있는 하나 이상의 관심 전이유전자 서열을 갖는다. 안전상의 이유로, 전달 플라스미드는 일반적으로 결과적으로 생성된 입자가 복제 불능성이도록 설계된다. 예를 들어, 전달 플라스미드에는 숙주 세포에서 감염성 입자를 생성하는 데 필요한 유전자 요소가 결여된다. 또한, 전

달 플라스미드는 3' LTR을 결실시켜 바이러스를 "자가 비활성화"(SIN)되도록 설계할 수 있다. Dull 등 (1998) J. Virol. 72:8463-71; Miyoshi 등 (1998) J. Virol. 72:8150-57 참조. 바이러스 입자는 또한 3' 비해독 영역(UTR) 및 5' UTR을 포함할 수 있다. UTR은 패키징, 역전사 및 레트로바이러스 입자에 의한 세포 접촉 후 세포로의 프로바이러스 게놈의 통합을 지원하는 레트로바이러스 조절 요소를 포함한다.

[0112] 3세대 시스템은 또한 일반적으로 2개의 "패키징 플라스미드" 및 "외피 플라스미드"를 포함한다. "외피 플라스미드"는 일반적으로 프로모터에 작동가능하게 연결된 Env 유전자를 암호화한다. 예시적인 3세대 시스템에서, Env 유전자는 VSV-G이고 프로모터는 CMV 프로모터이다. 예시적인 3세대 시스템에서, Env 유전자는 Cocal G 단백질(Cocal 당단백질)이고 프로모터는 MND(골수 증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 제어 영역 결실, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환) 프로모터이다. 예시적인 3세대 시스템에서, Env 유전자는 Cocal G 단백질(Cocal 당단백질)이고 프로모터는 CMV 프로모터이다. 3세대 시스템은 2개의 패키징 플라스미드를 사용하고, 하나는 gag 및 pol을 암호화하고 다른 하나는 추가 안전 특징으로서 rev를 암호화하며, 이는 소위 2세대 시스템의 단일 패키징 플라스미드보다 개선된 것이다. 3세대 시스템은 더 안전하지만 사용하기가 더 번거로울 수 있으며 추가 플라스미드의 첨가로 인해 더 낮은 바이러스 역가를 초래할 수 있다. 예시적인 패킹 플라스미드는 제한 없이 pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE 및 pRRL-GOI를 포함한다.

[0113] 많은 레트로바이러스 입자 시스템은 "패키징 세포주"의 사용에 의존적이다. 일반적으로, 패키징 세포주는 전달 플라스미드, 패키징 플라스미드 및 외피 플라스미드가 세포에 도입될 때 세포가 감염성 레트로바이러스 입자를 생산할 수 있는 세포주이다. 플라스미드를 세포에 도입하는 다양한 방법, 예컨대 형질감염 또는 전기천공법이 사용될 수 있다. 일부 경우에 패키징 세포주는 레트로바이러스 입자 시스템을 레트로바이러스 입자로 고효율 패키징하도록 개조된다.

[0114] 본원에서 사용되는 용어 "레트로바이러스 입자" 또는 "렌티바이러스 입자"는 이종 단백질(예를 들어, 키메라 항원 수용체), 하나 이상의 캡시드 단백질, 및 표적 세포 내로 폴리뉴클레오타이드의 형질도입에 필수적인 기타 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 입자를 지칭한다. 레트로바이러스 입자 및 렌티바이러스 입자는 일반적으로 RNA 게놈(전달 플라스미드에서 유래), Env 단백질이 내장된 지질 이중층 외피, 및 인테그라제, 프로테아제 및 매트릭스 단백질을 비롯한 기타 부속 단백질을 포함한다.

[0115] 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 입자 시스템의 생체외 효율은 정량적 폴리머라제 연쇄 반응(qPCR), 디지털 액적 PCR(ddPCR) 또는 밀리리터당 감염 단위(IU/mL)의 바이러스 역가와 같은 벡터 카피 수(VCN) 또는 벡터 게놈(vg)의 측정을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 다양한 방식으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 역가는 문헌[Humbert 등 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 같은 배양된 종양 세포주 HT1080에 대해 수행된 기능 검정을 사용하여 평가될 수 있다. 연속적으로 분열하는 배양 세포주에 대해 역가가 평가되는 경우, 자극은 필요하지 않으며, 이에 따라 측정된 역가는 레트로바이러스 입자의 표면 조작에 의해 영향을 받지 않는다. 레트로바이러스 벡터 시스템의 효율성을 평가하는 다른 방법은 문헌[Gaererts 등 Comparison of retroviral vector titration methods. BMC Biotechnol. 6:34 (2006)]에 제공되어 있다.

[0116] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 레트로바이러스 입자 및/또는 렌티바이러스 입자는 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터로는 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, CAG 프로모터, SV40 프로모터, SV40/CD43 프로모터, EF-1α 프로모터 및 MND 프로모터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0117] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 CMV이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 MND이다.

[0118] 일부 실시양태에서, RACR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 CMV이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 MND이다.

[0119] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 형질도입 인핸서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 T 세포 활성인자 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태

에서, 레트로바이러스 입자는 합텐-결합 수용체를 암호화하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 태그화(tagging) 단백질을 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 각각의 레트로바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 (i) 5' 긴 말단 반복부(LTR) 또는 비해독 영역(UTR), (ii) 프로모터, (iii) 합텐에 특이적으로 결합하는 수용체를 암호화하는 서열, 및 (iv) 3' LTR 또는 UTR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0121] *바이러스 외피*

[0122] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 표적 숙주 세포 상의 리간드에 결합하여 숙주 세포 형질도입을 허용하는 세포-표면 수용체를 포함한다. 바이러스 입자는 위형 바이러스 입자를 산출하는 이종 바이러스 외피 당단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 외피 당단백질은 RD114 또는 이의 변이체 중 하나, VSV-G, 긴팔원숭이-유인원(Gibbon-ape) 백혈병 바이러스(GALV)에서 유래될 수 있거나, 또는 양쪽지향성(Amphotropic) 외피, 홍역 외피 또는 개코원숭이 레트로바이러스 외피 당단백질이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 Cocal 균주로부터의 VSV G 단백질(Cocal 당단백질) 또는 이의 기능적 변이체이다.

[0123] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피 당단백질은 R354Q 돌연변이를 함유하는 Cocal 외피 변이체인 Cocal 균주로부터의 VSV G 단백질(Cocal 당단백질)이며, 이 변이체는 "블라인드화된" Cocal 외피로 지칭될 수 있다. 예시적인 Cocal 외피 변이체는 예를 들어 US 2020/0216502 A1에 제공되며, 이는 전체 내용이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0124] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 5와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0125] Cocal Env:

NFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLGITMK
VKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKESIKQT
KQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFPNGKCE
TEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSNYFA
YEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPTQTS
VDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGTLKY
FETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKFPLF
MIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFS
SWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK

[0126] (서열번호 5).

[0127] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 10과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0128] Cocal Env:

AATTTTCTGCTGCTGACCTTCATCGTGCTGCCTCTGTGCAGCCACGCCAAGTTTTC
CATCGTGTTCCCACAGTCCCAGAAGGGCAACTGGAAGAATGTGCCCTCTAGCTAC
CACTATTGCCCTTCCTCTAGCGACCAGAACTGGCACAATGATCTGCTGGGCATCA
CAATGAAGGTGAAGATGCCCAAGACCCACAAGGCCATCCAGGCAGATGGATGG
ATGTGCCACGCAGCCAAGTGGATCACAACCTGTGACTTTCGGTGGTACGGCCCCA
AGTATATCACACACTCCATCCACTCTATCCAGCCTACCTCCGAGCAGTGCAAGGA
GTCTATCAAGCAGACAAAGCAGGGCACCTGGATGAGCCCTGGCTTCCCACCCCA
GAACTGTGGCTACGCCACAGTGACCGACTCCGTGGCAGTGGTGGTGCAGGCAAC
ACCTCACCACGTGCTGGTGGATGAGTATACCGGCGAGTGGATCGACAGCCAGTT
TCCAAACGGCAAGTGCGAGACAGAGGAGTGTGAGACCGTGCACAATTCTACAGT
GTGGTACAGCGATTATAAGGTGACAGGCCTGTGCGACGCCACCCTGGTGGATAC
AGAGATCACCTTCTTTTCTGAGGACGGCAAGAAGGAGAGCATCGGCAAGCCCAA
CACCGGCTACAGATCCAATTACTTCGCCTATGAGAAGGGCGATAAGGTGTGCAA
GATGAATTATTGTAAGCACGCCGGGGTGCGGCTGCCTAGCGGCGTGTGGTTTGA

[0129] GTTCGTGGACCAGGACGTGTACGCAGCAGCAAAGCTGCCTGAGTGCCCAGTGGG

AGCAACCATCTCCGCCCCAACACAGACCTCCGTGGACGTGTCTCTGATCCTGGAT
GTGGAGCGCATCCTGGACTACAGCCTGTGCCAGGAGACCTGGAGCAAGATCCGG
TCCAAGCAGCCCGTGTCCCCTGTGGACCTGTCTTACCTGGCACCAAAGAACCCAG
GAACCGGACCAGCCTTTACAATCATCAATGGCACCCTGAAGTACTTCGAGACCC
GCTATATCCGGATCGACATCGATAACCCTATCATCAGCAAGATGGTGGGCAAGA
TCTCTGGCAGCCAGACAGAGAGAGAGCTGTGGACCGAGTGGTTCCCTTACGAGG
GCGTGGAGATCGGCCCAAATGGCATCCTGAAGACACCAACCGGCTATAAGTTTC
CCCTGTTCATGATCGGCCACGGCATGCTGGACAGCGATCTGCACAAGACCTCCCA
GGCCGAGGTGTTTGAGCACCCACACCTGGCAGAGGCACCAAAGCAGCTGCCTGA
GGAGGAGACACTGTTCTTTGGCGATACCGGCATCTCTAAGAACCCCGTGGAGCT
GATCGAGGGCTGGTTTTCCTCTTGGAAGAGCACAGTGGTGACCTTCTTTTTCGCC
ATCGGCGTGTTCATCCTGCTGTACGTGGTGGCCAGAATCGTGATCGCCGTGAGAT
ACAGGTATCAGGGCTCCAACAATAAGAGGATCTATAATGACATCGAGATGTCTC

[0130] GCTTCCGGAAG (서열번호 10).

[0131] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 104와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0132] Cocal Env:

ATGAACTTTCTGCTGCTGACCTTCATCGTGCTGCCTCTGTGCAGCCACGCCAAGTT
TTCCATCGTGTTCCCACAGTCCCAGAAGGGCAACTGGAAGAATGTGCCCAGCTCC
TACCACTATTGTCCTTCTAGCTCCGACCAGAACTGGCACAATGATCTGCTGGGCA
TCACCATGAAGGTGAAGATGCCTAAGACACACAAGGCCATCCAGGCAGATGGAT
GGATGTGCCACGCAGCCAAGTGGATCACCACATGTGACTTTCGGTGGTACGGCC
CCAAGTATATCACCCACAGCATCCACTCCATCCAGCCTACAAGCGAGCAGTGCA
AGGAGTCCATCAAGCAGACCAAGCAGGGCACATGGATGTCTCCCGGCTTCCCCC
CTCAGAACTGTGGCTACGCCACCGTGACAGATAGCGTGGCAGTGGTGGTGCAGG
CAACCCCACACCACGTGCTGGTGGATGAGTATACAGGCGAGTGGATCGACAGCC
AGTTTCCCAACGGCAAGTGCGAGACCGAGGAGTGTGAGACAGTGCACAATTCTA
CCGTGTGGTACAGCGATTATAAGGTGACCGGCCTGTGCGACGCCACACTGGTGG
ATACCGAGATCACATTCTTTTCCGAGGACGGCAAGAAGGAGTCTATCGGCAAGC
CCAACACCGGCTACAGGTCTAATTACTTCGCCTATGAGAAGGGCGATAAGGTGT

[0133] GCAAGATGAATTATTGTAAGCACGCCGGGGTGCGGCTGCCAAGCGGCGTGTGGT

TTGAGTTCGTGGACCAGGACGTGTACGCAGCAGCAAAGCTGCCAGAGTGCCCAG
TGGGAGCAACCATCAGCGCCCCCACCCAGACATCTGTGGACGTGAGCCTGATCC
TGGATGTGGAGAGAATCCTGGACTACTCCCTGTGCCAGGAGACATGGTCCAAGA
TCCGCTCTAAGCAGCCCGTGAGCCCAGTGGACCTGTCTTACCTGGCACCAAAGAA
CCCTGGAACAGGACCTGCCTTTACCATCATCAATGGCACACTGAAGTACTTCGAG
ACCCGGTATATCAGAATCGACATCGATAACCCAATCATCTCCAAGATGGTGGGC
AAGATCTCCGGCTCTCAGACCGAGAGAGAGCTGTGGACAGAGTGGTTCCCATAC
GAGGGCGTGGAGATCGGCCCCAATGGCATCCTGAAGACCCCTACAGGCTATAAG
TTTCCACTGTTCATGATCGGCCACGGCATGCTGGACTCTGATCTGCACAAGACCA
GCCAGGCCGAGGTGTTTGAGCACCCACACCTGGCAGAGGCACCAAAGCAGCTGC
CCGAGGAGGAGACCCTGTTCTTTGGCGATACAGGCATCTCCAAGAACCCTGTGG
AGCTGATCGAGGGCTGGTTTTCTAGCTGGAAGTCTACCGTGGTGACATTCTTTTTC
GCCATCGGCGTGTTCATCCTGCTGTACGTGGTGGCAAGGATCGTGATCGCCGTGC
GGTACAGATATCAGGGCAGCAACAATAAGAGAATCTATAATGACATCGAGATGT

[0134] CCAGGTTCCGCAAGTGA (서열번호 104)

[0135] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 1과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD8 유래 신호 펩타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0136] CD8 신호 펩타이드: MALPVTALLLPLALLLHAARP (서열번호 1).

[0137] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 6과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD8 유래 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

ATGGCACTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAG

[0138] CACGCCCA (서열번호 6).

[0139] 일부 실시양태에서, 세포-표면 수용체는 항-CD3 단일 사슬 가변 단편 또는 이의 기능적 변이체이다.

[0140] 다양한 융합 당단백질은 렌티바이러스 입자를 위형화하는데 사용될 수 있다. 가장 일반적으로 사용되는 예는 수포성 구내염 바이러스(VSV-G)의 외피 당단백질이지만, 다른 많은 바이러스 단백질도 렌티바이러스 입자의 위형화에 사용되었다. Joglekar 등 Human Gene Therapy Methods 28:291-301 (2017) 참조. 본 개시내용은 다양한 융

합 당단백질의 치환을 고려한다. 특히, 일부 융합 당단백질은 더 높은 바이러스 입자 효율을 초래한다.

[0141] 일부 실시양태에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체의 위형화는 T 세포 또는 NK-세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 특정 세포 유형의 표적화된 형질도입을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) gp160, 뮤린 백혈병 바이러스(MLV) gp70, 긴팔원숭이 유인원 백혈병 바이러스(GALV) gp70, 고양이 백혈병 바이러스(RD114) gp70, 양쪽지향성 레트로바이러스(Ampho) gp70, 10A1 MLV(10A1) gp70, 동종지향성(ecotropic) 레트로바이러스(Eco) gp70, 개코원숭이 유인원 백혈병 바이러스(BaEV) gp70, 홍역 바이러스(MV) H 및 F, 니파(Nipah) 바이러스(NiV) H 및 F, 광견병 바이러스(RabV) G, 모콜라(Mokola) 바이러스(MOKV) G, 에볼라 자이르(Ebola Zaire) 바이러스(EboZ) G, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV) GP1 및 GP2, 바큘로바이러스 GP64, 치쿤구니아 바이러스(CHIKV) E1 및 E2, 로스 리버(Ross River) 바이러스(RRV) E1 및 E2, 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스(SFV) E1 및 E2, 신드비스(Sindbis) 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 전염병 바이러스(FPV) HA, 항-CD3 scFv, (CD3), 수포성 구내염 바이러스 VSV-G , 또는 찬디푸라(Chandipura) 바이러스 및 피리(Piry) 바이러스 CNV-G 및 PRV-G의 전체 길이 폴리펩타이드(들), 기능적 단편(들), 상동체(들) 또는 기능적 변이체(들)이다.

[0142] 일부 실시양태에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 수포성 구내염 알라고아스 바이러스(VSAV), 카라자스 수포성바이러스(CJSV), 찬디푸라 수포성바이러스(CHPV), Cocal 수포성바이러스(COCV), 수포성 구내염 인디아나 바이러스(VSIV), 이스파한 수포성바이러스 (ISFV), 마라바 수포성바이러스 (MARAV), 수포성 구내염 뉴저지 바이러스(VSNJV), 바콩고(Bas-Congo) 바이러스(BASV)의 G 단백질의 전체 길이 폴리펩타이드, 기능적 단편, 상동체 또는 기능적 변이체이다. 일부 실시양태에서, 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체는 Cocal 바이러스 G 단백질이다.

[0143] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 니파 바이러스(NiV) 외피 위형 렌티바이러스 입자("니파 외피 위형 벡터")이다. 일부 실시양태에서, 니파 외피 위형 벡터는 니파 바이러스 외피 당단백질 NiV-F 및 NiV-G를 사용하여 위형화된다. 일부 실시양태에서, 이러한 니파 외피 위형 벡터 상의 NiV-F 및/또는 NiV-G 당단백질은 변형된 변이체이다. 일부 실시양태에서, 이러한 니파 외피 위형 벡터 상의 NiV-F 및/또는 NiV-G 당단백질은 항원 결합 도메인을 포함하도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 항원은 EpCAM, CD4, 또는 CD8이다. 일부 실시양태에서, 니파 외피 위형 벡터는 EpCAM, CD4 또는 CD8을 발현하는 세포를 효율적으로 형질도입할 수 있다. 미국 특허 제9,486,539호 및 Bender 등 PLoS Pathog. (2016) Jun; 12(6): e1005641을 참조한다.

[0144] *바이러스 입자 외피 항원 결합 도메인*

[0145] 일부 실시양태에서, 외피 위형 바이러스 입자 상의 당단백질은 항원 결합 도메인을 포함하도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 항원은 CD3이다. 일부 실시양태에서, 외피 위형 바이러스 입자는 CD3을 발현하는 세포를 효율적으로 형질도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD3 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD3 인간화 뮤린 scFv이다.

[0146] 일부 실시양태에서, 외피 위형 바이러스 입자는 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체 및 항원 결합 도메인 또는 이의 기능적 변이체를 포함하도록 변형된다. 일부 실시양태에서, 외피 위형 바이러스 입자는 Cocal 바이러스 G 단백질 또는 이의 기능적 변이체 및 항-CD3 scFv 또는 이의 기능적 변이체를 포함하도록 변형된다.

[0147] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 표면-조작된다. 레트로바이러스 벡터 입자를 표면-조작하는 예시적인 방법은 예를 들어 WO 2019/200056, PCT/US2019/062675, 및 US 제62/916,110호에 제공되며, 이들 각각은 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0148] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 융합 당단백질 또는 이의 기능적 변이체 및 항원 결합 도메인 또는 이의 기능적 변이체를 포함하도록 표면 조작된다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 Cocal 바이러스 G 단백질 또는 이의 기능적 변이체 및 항-CD3 scFv 또는 이의 기능적 변이체를 포함하도록 표면 조작된다.

[0149] 바이러스 표면 전시가 가능한 다양한 비-바이러스 단백질은 본 개시내용에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, 비-바이러스 단백질은 공동-자극 분자이다. 통상적으로, 시험관내 렌티바이러스 형질도입에는 Dynabeads™ Human T-Activator αCD3/αCD28과 같은 "스팀비드(stimbead)" 등의 외인성 활성화제를 추가로 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 벡터에는 T-세포 활성화 또는 공동-자극 분자(들)와 같은 비-바이러스 단백질의 하나 이상의 카피가 혼입되어 있다. 입자에 T-세포 활성화 또는 공동-자극 분자(들)의 혼입은 입자가 외인성 활성화제의 부재 또는 보다 적은 양의 존재 하에, 즉 스팀비드 또

는 등가제 없이, T 세포를 활성화하고 효율적으로 형질도입할 수 있게 할 수 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, T-세포 활성화 또는 공동-자극 분자는 항-CD3 항체, CD28 리간드(CD28L) 및 41bb 리간드(41BBL 또는 CD137L)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 다양한 T-세포 활성화 또는 공동-자극 분자는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 임의의 T-세포 발현 단백질 CD3, CD28, OX40으로도 알려진 CD134, 또는 4-1BB로도 알려진 41bb 또는 CD137 또는 TNFRSF9 중 임의의 것에 특이적으로 결합하는 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, CD3에 특이적으로 결합하는 작용제는 항-CD3 항체(예를 들어, OKT3, CRIS-7 또는 I2C) 또는 항-CD3 항체의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 작용제는 항-CD3 항체의 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다.

[0152] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 2와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 scFv(CD3 VL - 3x G4S 링커에 의해 CD3 VH에 연결됨)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0153] 항-CD3 scFv (VL-G4S x 3 링커-VH):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGV
PSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRTSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE
WIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDD
HYCLDYWGQGTPVTVSSAAAKP (서열번호 2).

[0154]

[0155] 이 scFv의 상보적 결정 영역(CDR)은 SASSSVSYMN(CDR-L1; 서열번호 133), DTSKLASG(CDR-L2; 서열번호 134), QQWSSNPFT(CDR-L3; 서열번호 135), RYTMH(CDR-H1; 서열번호 144), YINPSRGYTNYNQKVKD(CDR-H2; 서열번호 136), 및 YYDDHYCLDY(CDR-H3; 서열번호 137)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 이들 CDR을 갖는 항-CD3 scFv를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 선택적으로 항-CD3 scFv는 서열번호 2와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 7과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 scFv(CD3 VL - 3x G4S 링커에 의해 CD3 VH에 연결됨)를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0157] 항-CD3 scFv(VL-G4S x 3 링커-VH):

GATATCCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACCGG
GTGACAATCACCTGCAGCGCCTCTAGCTCCGTGTCCTACATGAACTGGTATCAGC
AGACACCTGGCAAGGCCCCAAAGAGATGGATCTACGATACCAGCAAGCTGGCCT
CCGGCGTGCCTTCTAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGATTATACATTCAC
CATCTCTAGCCTGCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTGGTCC
TCTAATCCCTTTACATTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACAAGAACCTCTG
GAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGCGGCGGCTCTCAGGTGCAG
CTGGTGCAGAGCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCAGAAGCCTGAGGCTGTCC
TGTAAGGCCTCTGGCTACACATTCACCAGATATACAATGCACTGGGTGAGGCAG
GCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCTCCAGGGGCTAC
ACCAACTATAATCAGAAGGTGAAGGATCGGTTCACCATCAGCAGGGACAACTCC
AAGAATACCGCCTTCCTGCAGATGGACAGCCTGAGGCCAGAGGATACCGGCGTG
TACTTTTGCGCCCGGTACTATGACGATCACTACTGTCTGGATTATTGGGGCCAGG
GAACACCAGTGACCGTGAGCTCCGCCGCAGCAAAGCCT (서열번호 7).

[0158]

[0159] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 12와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 scFv(CD3 VL - 3 x G4S 링커에 의해 CD3 VH에 연결됨)를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0160] 항-CD3 scFv(VL-G4S x 3 링커-VH):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGV
PSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRTSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE
WIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDD
HYCLDYWGQGTPVTVSSAS (서열번호 12).

[0161]

[0162] 이 scFv의 상보적 결정 영역(CDR)은 SASSSVSYMN(CDR-L1; 서열번호 133), DTSKLASG(CDR-L2; 서열번호 134), QQWSSNPFT(CDR-L3; 서열번호 135), RYTMH(CDR-H1; 서열번호 144), YINPSRGYTNYNQKVKD(CDR-H2; 서열번호 136), 및 YYDDHYCLDY(CDR-H3; 서열번호 137)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 이들 CDR을 갖는 항-CD3 scFv를 포함하는 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 선택적으로 항-CD3 scFv는 서열번호 12와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0163] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 15와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 scFv(CD3 VL - 3x G4S 링커에 의해 CD3 VH에 연결됨)를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0164] 항-CD3 scFv(VL-G4S x 3 링커-VH):

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGA
GTGACCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAG
CAAACACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCT
TCTGGAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCA
CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTC
CTCTAATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGC
GGCGGGGGGAGGAAGCGGCGGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCA
GCTGGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAG
CTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAG
GCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTAC
ACCAACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGC
AAGAATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTG
TACTTCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGG
GCACCCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCC (서열번호 15).

[0165]

[0166] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 3x G4S 링커에 의해 CD3 VH에 연결된 CD3 VL을 포함하는 항-CD3 scFv를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0167] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 3x G4S 링커에 의해 CD3 VH에 연결된 CD3 VL을 포함하는 항-CD3 scFv를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 107과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 힌지 도메인에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아(Gaussia) 루시페라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0169] αCD3scFv_짧은 힌지-TM-CT(pUMJ_224)

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASGVELIEGWFSSWKSTVVTFFF

[0170] AIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (서열번호 107)

[0171] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 108과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 힌지 도메인에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0172] αCD3scFv_짧은 힌지-TM-CT(pUMJ_224)

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT
TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCGGAGTGGAACTGATCGAGGGCTGGTTCAGC

[0173] AGCTGGAAAAGCACCGTGGTTACATTCTTTTTCGCCATCGGCGTGTTCATCCTGC
TGTACGTGGTCGCCAGAATTGTGATCGCCGTGCGGTATAGATACCAGGGCAGCA
ACAACAAGCGGATCTACAACGACATCGAGATGAGCAGATTCAGAAAG (서열번호
108)

[0174]

[0175] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 109와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 힌지 도메인에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0176] αCD3scFv_긴 힌지_TM_CT(pUMJ_163)

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASSGFEHPHLAEAPKQLPEEETL
FFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNK

[0177] RIYNDIEMSRFRK (서열번호 109)

[0178] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 110과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 힌지 도메인에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0179] αCD3scFv_긴 힌지_TM_CT(pUMJ_163)

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT
TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCGGATTCGAGCACCCCCACCTGGCCGAGGCC
CCTAAGCAGCTGCCTGAAGAAGAGACACTGTTTTTCGGAGATACCGGCATCAGC
AAAAACCCCGTGGAGCTGATCGAGGGCTGGTTCAGCTCTTGGAAGAGCACCGTG
GTCACATTCTTTTTCGCCATCGGCGTCTTTATCCTGCTGTACGTGGTAGCCAGAAT
CGTGATCGCCGTGCGGTACAGATACCAGGGCAGCAACAACAAGCGGATCTACAA

[0180] CGACATCGAGATGAGCCGGTTCAGAAAG (서열번호 110)

[0181] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 111과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 글리코포린 A 유래 막관통 도메인 및 HIV 외피 유래 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0182] αCD3scFv_h글리코포린A_TM_HIV Env CT(pUMJ_194)

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASGGSTSGSGKPGSGEGSTKGPE
ITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLALKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVA
EGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL (서열번호 111)

[0183]

[0184] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 112와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 글리코포린 A 유래 막관통 도메인 및 HIV 외피 유래 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0185] αCD3scFv_h글리코포린A_TM_HIV Env CT(pUMJ_194)

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT
TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCGGAGGATCTACAAGCGGCTCTGGCAAGCCT
GGCAGCGGAGAAGGCAGCACCAAGGGCCCTGAGATCACACTGATCATCTTCGGC
GTGATGGCCGGCGTCATCGGCACCATCCTGCTGATCAGCTACGGCATCAGAAGA
CTGGCTCTGAAGTACTGGTGGAATCTGCTGCAATACTGGAGCCAGGAGCTGAAA
AACAGCGCCGTGTCCCTGCTCAACGCCACCGCCATCGCCGTGGCCGAGGGCACC
GACAGAGTGATCGAGGTGGTGCAGGGAGCCTGCAGAGCTATTCGGCACATCCCC
AGACGGATCAGGCAGGGCCTGGAAAGAATCCTGCTG (서열번호 112)

[0186]

[0187] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 113과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3-scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시페라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0188] αCD3scFv_218 링커_HIV Env 엑토-TM-CT(pUMJ_195)

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASGGSTSGSGKPGSGEGSTKGN
WLWYIRIFIIIVGSLIGLRIVFAVLSLVNRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLL
NATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL (서열번호 113)

[0189]

[0190] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 114와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3-scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시페라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0191] αCD3scFv_218 링커_HIV Env 엑토-TM-CT(pUMJ_195)

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT

[0192]

TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCGGAGGAAGCACCAGCGGCTCTGGCAAGCC
TGGCAGCGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCAATTGGCTGTGGTACATCAGAATCTT
CATCATCATCGTGGGCAGCCTGATCGGCCTGAGAATCGTGTTCGCCGTGCTGAGC
CTGGTGAACCGGGGCTGGGAAGCTCTGAAGTACTGGTGGAACCTGCTGCAATAC
TGGTCCCAGGAGCTGAAAAACAGCGCTGTGTCCCTGCTCAACGCCACCGCCATC
GCCGTCGCCGAGGGAACAGACAGAGTGATCGAGGTGGTGCAGGGAGCCTGCAG
AGCCATTCGGCACATCCCCAGACGCATCAGACAGGGCCTGGAAAGAATCCTGCT

[0193] G (서열번호 114)

[0194] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 115와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 삼중 G4S링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0195] αCD3scFv_G4S 링커_HIV Env 엑토-TM-CT(pUMJ_196)

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSI
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASGGGGGSGGGGSGGGGSYIRIF
IIIVGSLIGLRIVFAVLSLVNRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVA
EGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL (서열번호 115)

[0196]

[0197] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 116과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 삼중 G4S링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0198] αCD3scFv_G4S 링커_HIV Env 엑토-TM-CT(pUMJ_196)

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT
TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCGGAGGCGGTGGAGGCTCTGGTGGCGGAGG
GAGCGGTGGCGGAGGCAGCTACATCAGAATCTTCATCATCATCGTGGGCAGCCT
GATCGGCCTGAGAATCGTGTTCGCCGTTCTGAGCCTGGTGAACCGGGGCTGGGA
AGCCCTGAAGTACTGGTGGAATCTGCTCCAGTACTGGTCTCAGGAGCTGAAGAA
CAGCGCCGTGTCCCTGCTGAACGCTACAGCTATCGCCGTCGCCGAGGGCACCGA
CAGAGTGATCGAGGTGGTGCAGGGCGCCTGCAGAGCCATCCGGCACATCCCTAG
AAGGATTCGGCAAGGCCTGGAAAGAATCCTGCTG (서열번호 116)

[0199]

[0200] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 117에 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피에 작동가능하게 연결된 Cocal 외피 유래 막관통 도메인, 세포질 꼬리, 및 T2A 자가-절단 펩타이드에 작동가능하게 연결된 힌지 도메인에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0201] 항-CD3scFv_짧은 힌지_TM_CT_T2A_Cocal 외피:

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASGVELIEGWFSSWKSTVVTFFF
AIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRKGSGEGRGSLLTCGDVEE
NPGPNFLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSSYHYCPSSSDQNWHNDLLG
ITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWITTCDFRWYGPKYITHSIHSIQPTSEQCKES
IKQTKQGTWMSPGFPPQNCGYATVTDSVAVVVQATPHHVLVDEYTGEWIDSQFPNG
KCETEECETVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTEITFFSEDGKKESIGKPNTGYRSN
YFAYEKGDKVCKMNYCKHAGVRLPSGVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGATISAPT
QTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAFTIINGT
LKYFETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPTGYKF
PLFMIGHGMLDSDLHKTSQAEVFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEG
WFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK

[0202] (서열번호 117)

[0203] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 118에 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피에 작동가능하게 연결된 Cocal 외피 유래 막관통 도메인, 세포질 꼬리, 및 T2A 자가-절단 펩타이드에 작동가능하게 연결된 힌지 도메인에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0204] 항-CD3scFv_짧은 힌지_TM_CT_T2A_Cocal 외피:

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT
TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCGGAGTGGAACTGATCGAGGGCTGGTTCAGC
AGCTGGAAAAGCACCGTGGTTACATTCTTTTTCGCCATCGGCGTGTTCATCCTGC
TGTACGTGGTCGCCAGAATTGTGATCGCCGTGCGGTATAGATACCAGGGCAGCA
ACAACAAGCGGATCTACAACGACATCGAGATGAGCAGATTCAGAAAGGGATCTG
GAGAGGGAAGGGGAAGCCTGCTGACATGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCAGGA
CCAAATTTTCTGCTGCTGACCTTCATCGTGCTGCCTCTGTGCAGCCACGCCAAGTT
TTCCATCGTGTTCCCACAGTCCCAGAAGGGCAACTGGAAGAATGTGCCCTCTAGC
TACCACTATTGCCCTTCCTCTAGCGACCAGAACTGGCACAATGATCTGCTGGGCA

[0205] TCACAATGAAGGTGAAGATGCCCAAGACCCACAAGGCCATCCAGGCAGATGGAT

GGATGTGCCACGCAGCCAAGTGGATCACAACCTGTGACTTTCGGTGGTACGGCC
CCAAGTATATCACACACTCCATCCACTCTATCCAGCCTACCTCCGAGCAGTGCAA
GGAGTCTATCAAGCAGACAAAGCAGGGCACCTGGATGAGCCCTGGCTTCCCACC
CCAGAACTGTGGCTACGCCACAGTGACCGACTCCGTGGCAGTGGTGGTGCAGGC
AACACCTCACCACGTGCTGGTGGATGAGTATACCGGCGAGTGGATCGACAGCCA
GTTTCCAAACGGCAAGTGCGAGACAGAGGAGTGTGAGACCGTGCACAATTCTAC
AGTGTGGTACAGCGATTATAAGGTGACAGGCCTGTGCGACGCCACCCTGGTGGA
TACAGAGATCACCTTCTTTTCTGAGGACGGCAAGAAGGAGAGCATCGGCAAGCC
CAACACCGGCTACAGATCCAATTACTTCGCCTATGAGAAGGGCGATAAGGTGTG
CAAGATGAATTATTGTAAGCACGCCGGGGTGCGGCTGCCTAGCGGCGTGTGGTTT
GAGTTCGTGGACCAGGACGTGTACGCAGCAGCAAAGCTGCCTGAGTGCCCAGTG
GGAGCAACCATCTCCGCCCCAACACAGACCTCCGTGGACGTGTCTCTGATCCTGG
ATGTGGAGCGCATCCTGGACTACAGCCTGTGCCAGGAGACCTGGAGCAAGATCC
GGTCCAAGCAGCCCGTGTCCCCTGTGGACCTGTCTTACCTGGCACCAAAGAACCC
AGGAACCGGACCAGCCTTTACAATCATCAATGGCACCCTGAAGTACTTCGAGAC
CCGCTATATCCGGATCGACATCGATAACCCTATCATCAGCAAGATGGTGGGCAA
GATCTCTGGCAGCCAGACAGAGAGAGAGCTGTGGACCGAGTGGTTCCCTTACGA
GGGCGTGGAGATCGGCCCAAATGGCATCCTGAAGACACCAACCGGCTATAAGTT
TCCCCTGTTCATGATCGGCCACGGCATGCTGGACAGCGATCTGCACAAGACCTCC
CAGGCCGAGGTGTTTGAGCACCCACACCTGGCAGAGGCACCAAAGCAGCTGCCT
GAGGAGGAGACACTGTTCTTTGGCGATACCGGCATCTCTAAGAACCCCGTGGAG
CTGATCGAGGGCTGGTTTTCCTCTTGGAAGAGCACAGTGGTGACCTTCTTTTTCG
CCATCGGCGTGTTCATCCTGCTGTACGTGGTGGCCAGAATCGTGATCGCCGTGAG
ATACAGGTATCAGGGCTCCAACAATAAGAGGATCTATAATGACATCGAGATGTC

[0206] TCGCTTCCGGAAG (서열번호 118)

[0207] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 119와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 글리코포린 A 유래 힌지, 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0208] αCD3scFv_인간 글리코포린 A 힌지-TM-CT(pUMJ_232, VV100에 사용됨)

MGVKVLFALICIAVAEADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPG
KAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFG
QGTKLQITRTSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT
RYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNTAFLQMDSL
RPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPVTVSSASHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTIL
LISYGIRRLIKKSPSDVKPLPSPDTDVPLSSVEIENPETSDQ (서열번호 119)

[0209]

[0210] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 120과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 글리코포린 A 유래 힌지, 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 링커에 작동가능하게 연결된 항-CD3 scFv에 작동가능하게 연결된 가우시아 루시퍼라제 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0211] αCD3scFv_인간 글리코포린 A 힌지-TM-CT(pUMJ_232, VV100에 사용됨)

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCCGACA
TCCAGATGACCCAGTCTCCTAGCAGCCTCAGCGCTAGCGTGGGCGATAGAGTGA
CCATCACATGTAGCGCCAGCAGCAGCGTGTCCTACATGAACTGGTACCAGCAAA
CACCTGGAAAGGCCCCTAAAAGGTGGATCTATGACACATCTAAGCTGGCTTCTG
GAGTGCCATCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACTGATTATACATTCACCAT
CAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGTCCTCT
AATCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCAGAACCAGCGGC
GGGGGAGGAAGCGGCGGGGGAGGATCTGGCGGCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCT
GGTGCAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAACCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG
CAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCATTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATCAACCCCAGCAGAGGCTACACC
AACTACAACCAGAAGGTGAAGGACAGATTCACAATTTCTCGGGACAACAGCAAG
AATACCGCCTTCCTGCAAATGGACTCCCTGCGCCCAGAAGATACCGGCGTGTACT
TCTGCGCTAGATATTACGACGACCACTACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCAC
CCCTGTGACCGTGTCCAGCGCCTCCCACTTCAGCGAGCCTGAGATCACCCTGATC
ATCTTCGGCGTGATGGCCGGAGTGATCGGCACAATCCTGCTGATCAGCTACGGCA
TCAGAAGACTGATTAAGAAATCCCCATCTGATGTGAAGCCTCTGCCTTCTCCTGA
CACCGACGTCCCCCTGAGCAGCGTGGAAATCGAGAACCCCGAAACCAGCGACCA
G (서열번호 120)

[0212]

[0213] 일부 실시양태에서, T-세포 활성화 또는 공동자극 분자는 항-CD3 항체, CD28에 대한 리간드(예를 들어, CD28L) 및 41bb 리간드(41BBL 또는 CD137L)로 이루어진 군으로부터 선택된다. B7-2로도 알려진 CD86은 CD28과 CTLA-4 모두에 대한 리간드이다. 일부 실시양태에서, CD28에 대한 리간드는 CD86이다. CD80은 CD28에 대한 추가 리간드이다. 일부 실시양태에서, CD28에 대한 리간드는 CD80이다. 일부 실시양태에서, CD28에 대한 리간드는 벡터 표면 상에 전시를 위해 막관통 도메인에 커플링된 항-CD28 scFv 또는 항-CD28 항체이다. 일부 실시양태에서, 공동자극 분자는 CD80이다. 하나 이상의 T-세포 활성화 또는 공동자극 분자(들)를 포함하는 바이러스 입자는 WO 2016/139463에 의해 제공된 방법에 의해 패키징 세포주를 조작함으로써; 또는 국제 출원 공개 번호 WO 2020/106992 A1에 기재된 바와 같은 폴리시스트론성 헬퍼 벡터로부터의 T-세포 활성화 또는 공동자극 분자(들)의 발현에 의해 제조될 수 있다.

[0214] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 천연 막관통 도메인 또는 이종 막관통 도메인에 커플링된 CD19 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD19는 블리나투모맙에 대한 리간드로서 작용하여, 블리나투모맙의 항-CD3 모이어티를 통해 입자를 T-세포에 커플링하기 위한 어댑터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 또 다른 유형의 입자 표면 리간드는 입자 표면 리간드에 대한 결합 모이어티를 포함하는 다중특이적 항체를 사용하여 적절하게 표면 조작된 렌티바이러스 입자를 T 세포에 커플링시키는 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다중특이적 항체는 이중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 T-세포 인게이저(BiTE)이다.

[0215] 비-바이러스성 단백질은 사이토카인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 사이토카인은 IL-15, IL-7 및 IL-2로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 사용된 비-바이러스성 단백질이 가용성 단백질(예컨대, scFv 또는 사이토카인)인 경우 CD8의 막관통 도메인과 같은 막관통 도메인에 융합하여 렌티바이러스 입자의 표면에 묶일 수 있다. 대안적으로, 가용성 단백질을 결합하도록 조작된 막관통 단백질을 사용하여 렌티바이러스 입자에 간접적으로 묶일 수 있다. 하나 이상의 세포질 잔기의 추가 포함은 융합 단백질의 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0216] 일부 실시양태에서, 표면 조작된 벡터는 분열촉진 도메인 및/또는 사이토카인-기반 도메인을 포함하는 막관통 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 분열촉진 도메인은 CD3, CD28, CD134 및 CD137과 같은 T 세포 표면 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 분열촉진 도메인은 CD3ε 사슬에 결합한다.

[0217] CD28은 T 세포 활성화 및 생존에 필요한 공동자극 신호를 제공하는 T 세포에서 발현되는 단백질 중 하나이다. T 세포 수용체(TCR) 외에 CD28을 통한 T 세포 자극은 다양한 인터루킨(특히 IL-6) 생산을 위한 강력한 신호를 제

공할 수 있다.

[0218] OX40으로도 알려져 있는 CD134는 CD28과 달리 휴지기의 나이브 T 세포에서 구성적으로 발현되지 않는 수용체의 TNFR-수퍼패밀리의 구성원이다. OX40의 발현은 T 세포의 완전한 활성화에 의존적이고; CD28 없이 OX40의 발현은 지연되고 4배 더 낮은 수준이다.

[0219] 4-1BB로도 알려진 CD137은 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 계열의 구성원이다. CD137은 활성화된 T 세포에 의해 발현될 수 있지만 CD4 T 세포에서보다 CD8에서 더 많이 발현될 수 있다. 또한 CD137의 발현은 수지상 세포, 여포성 수지상 세포, 자연 살해 세포, 과립구 및 염증 부위의 혈관벽 세포에서 발견된다. CD137의 가장 특징적인 활성은 활성화된 T 세포에 대한 공동자극 활성이다. CD137의 가교결합은 T 세포 증식, IL-2 분비 생존 및 세포용해 활성을 향상시킨다.

[0220] 분열촉진 도메인은 T-세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 다른 분자의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 항체는 TCR 또는 CD28을 활성화할 수 있다. 항체는 TCR, CD3 또는 CD28에 결합할 수 있다. 이러한 항체의 예는 OKT3, 15E8 및 TGN1412를 포함한다. 다른 적합한 항체는 항-CD28: CD28.2, 10F3; 항-CD3/TCR: UCHT1, YTH12.5, TR66을 포함한다. 분열촉진 도메인은 OKT3, 15E8, TGN1412, CD28.2, 10F3, UCHT1, YTH12.5 또는 TR66의 결합 도메인을 포함할 수 있다. 분열촉진 도메인은 OX40L 및 41 BBL과 같은 공동-자극 분자의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, 분열촉진 도메인은 OX40L 또는 41 BBL의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0221] 일부 실시양태에서, 벡터는 막관통 도메인에 커플링된 항-CD3ε 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 예시적인 항-CD3ε 항체는 OKT3이다. 무로모나브-CD3으로도 알려진 OKT3은 CD3ε 사슬을 표적으로 하는 단클론 항체이다.

[0222] 일부 실시양태에서, 벡터는 4-1BB에 대한 리간드 또는 이의 기능적 단편을 이의 천연 막관통 도메인 또는 이종성 막관통 도메인에 커플링시켜 포함한다. 4-1BBL은 종양 괴사 인자(TNF) 리간드 계열에 속하는 사이토카인이다. 이 막관통 사이토카인은 T 림프구에서 공동자극 수용체 분자인 4-1BB에 대한 리간드로서 작용하는 양방향 신호 변환인자이다. 4-1BBL은 T 림프구 증식을 촉진하는 것 외에도 무반응성 T 림프구를 재활성화하는 것으로 나타났다.

[0223] *형질도입 인핸서 스페이서 도메인*

[0224] 분열촉진 형질도입 인핸서 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 항원 결합 도메인을 막관통 도메인과 연결하기 위해 "스페이서 서열"을 포함할 수 있다. 유연한 스페이서는 항원 결합 도메인이 결합을 용이하게 하도록 다른 방향으로 배향되도록 한다. 본원에 사용된 용어 "~에 커플링된"은 두 단백질의 직접적인 C-말단 대 N-말단 융합인 화학적 연결; 비펩타이드 공간에 대한 화학적 연결; 폴리펩타이드 공간에 대한 화학적 연결; 및 폴리펩타이드 스페이서, 예를 들어 스페이서 서열에 대한 펩타이드 결합을 통한 2개의 단백질의 C-말단 대 N-말단 융합을 지칭한다.

[0225] 스페이서 서열은 예를 들어 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 인간 CD8 줄기(stalk) 또는 마우스 CD8 줄기를 포함할 수 있다. 스페이서는 lgG1 Fc 영역, lgG1 힌지 또는 CD8 줄기와 유사한 길이 및/또는 도메인 이격 특성을 갖는 대안적인 링커 서열을 대안적으로 포함할 수 있다. 인간 IgG1 스페이서는 변경되어 Fc 결합 모티프를 제거할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 인간 단백질로부터 유래될 수 있다.

[0226] 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 CD8 유래 힌지를 포함한다.

[0227] 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 '짧은' 힌지를 포함한다. 짧은 힌지는 관련 기술분야에 공지된 CAR 힌지 영역에 비해 더 적은 뉴클레오타이드를 포함하는 힌지 영역이라고 기술된다.

[0228] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 3과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD8 힌지를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0229] CD8 힌지:

[0230] TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFASD (서열번호 3).

[0231] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 8과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD8 힌지를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0232] CD8 힌지:

ACCACAACCCCTGCCCCAAGGCCACCTACACCCGCCCCTACCATCGCCTCTCAGC
CACTGAGCCTGAGGCCAGAGGCATCCAGGCCTGCCGCAGGGGGGGCCGTGCACA

[0233] CCCGGGGCCTGGACTTTGCCTCTGAT (서열번호 8).

[0234] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 13과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질로부터 유래된 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 짧은 힌지를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0235] Cocal Env 유래의 짧은 힌지-TM-CT:

GVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMS

[0236] RFRK (서열번호 13).

[0237] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 16과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질로부터 유래된 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 짧은 힌지를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0238] Cocal Env 유래의 짧은 힌지-TM-CT:

GGAGTGGAACTGATCGAGGGCTGGTTCAGCAGCTGGAAAAGCACCGTGGTTACA
TTCTTTTTCGCCATCGGCGTGTTCATCCTGCTGTACGTGGTCGCCAGAATTGTGAT
CGCCGTGCGGTATAGATACCAGGGCAGCAACAACAAGCGGATCTACAACGACAT

[0239] CGAGATGAGCAGATTCAGAAAG (서열번호 16).

[0240] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 19와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질로부터 유래된 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 긴 힌지를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0241] Cocal Env로부터의 긴 힌지-TM-CT:

SGFEHPHLAEAPKQLPEEETLFFGDTGISKNPVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILL

[0242] YVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMSRFRK (서열번호 19).

[0243] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 22와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질 유래의 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 긴 힌지를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0244] Cocal Env로부터의 긴 힌지-TM-CT:

TCCGGATTCGAGCACCCCCACCTGGCCGAGGCCCCTAAGCAGCTGCCTGAAGAA
GAGACACTGTTTTTCGGAGATACCGGCATCAGCAAAAACCCCGTGGAGCTGATC
GAGGGCTGGTTCAGCTCTTGGAAGAGCACCGTGGTCACATTCTTTTTCGCCATCG
GCGTCTTTATCCTGCTGTACGTGGTAGCCAGAATCGTGATCGCCGTGCGGTACAG
ATACCAGGGCAGCAACAACAAGCGGATCTACAACGACATCGAGATGAGCCGGTT

[0245] CAGAAAG (서열번호 22).

[0246] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 25와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 바이러스 외피로부터 유래된 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 인간 글리코포린 A 엑토도메인 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 218 링커를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0247] 218 링커_인간 글리코포린 A 엑토-TM_HIV Env CT:

SGGSTSGSGKPGSGEGSTKGPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLALKYWWNLLQY
WSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL

[0248] (서열번호 25)

[0249] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 28과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 바이러스 외피로부터 유래된 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 인간 글리코포린 A 엑토도메인 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 218 링커를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0250] 218 링커_인간 글리코포린 A 엑토-TM_HIV Env CT:

TCCGGAGGATCTACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGCAGCGGAGAAGGCAGCACC
AAGGGCCCTGAGATCACACTGATCATCTTCGGCGTGATGGCCGGCGTCATCGGC
ACCATCCTGCTGATCAGCTACGGCATCAGAAGACTGGCTCTGAAGTACTGGTGG
AATCTGCTGCAATACTGGAGCCAGGAGCTGAAAAACAGCGCCGTGTCCCTGCTC
AACGCCACCGCCATCGCCGTGGCCGAGGGCACCGACAGAGTGATCGAGGTGGTG
CAGGGAGCCTGCAGAGCTATTCGGCACATCCCCAGACGGATCAGGCAGGGCCTG

[0251] GAAAGAATCCTGCTG (서열번호 28).

[0252] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 31과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 바이러스 외피 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 218 링커를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0253] 218 링커_HIV Env-TM-CT:

SGGSTSGSGKPGSGEGSTKGNWLWYIRIFIIIVGSLIGLRIVFAVLSLVNRGWEALKY
WWNLLQYWSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLE

[0254] RILL (서열번호 31).

[0255] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 34와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 바이러스 외피 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 218 링커를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0256] 218 링커_HIV Env-TM-CT:

TCCGGAGGAAGCACCAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGCTCTACC
AAGGGCAATTGGCTGTGGTACATCAGAATCTTCATCATCATCGTGGGCAGCCTGA
TCGGCCTGAGAATCGTGTTCGCCGTGCTGAGCCTGGTGAACCGGGGCTGGGAAG
CTCTGAAGTACTGGTGGAACCTGCTGCAATACTGGTCCCAGGAGCTGAAAAACA
GCGCTGTGTCCCTGCTCAACGCCACCGCCATCGCCGTCGCCGAGGGAACAGACA
GAGTGATCGAGGTGGTGCAGGGAGCCTGCAGAGCCATTCGGCACATCCCCAGAC

[0257] GCATCAGACAGGGCCTGGAAAGAATCCTGCTG (서열번호 34).

[0258] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 37과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 바이러스 외피 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 삼중 G4S 링커를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0259] G4Sx3 링커_HIV Env-TM-CT:

SGGGGGSGGGGSGGGGSYIRIFIIIVGSLIGLRIVFAVLSLVNRGWEALKYWWNLLQY
WSQELKNSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQGACRAIRHIPRRIRQGLERILL

[0260] (서열번호 37)

[0261] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 40과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 HIV 바이러스 외피 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 삼중 G4S 링커를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0262] G4Sx3 링커_HIV Env-TM-CT:

TCCGGAGGCGGTGGAGGCTCTGGTGGCGGAGGGAGCGGTGGCGGAGGCAGCTA
CATCAGAATCTTCATCATCATCGTGGGCAGCCTGATCGGCCTGAGAATCGTGTTC
GCCGTTCTGAGCCTGGTGAACCGGGGCTGGGAAGCCCTGAAGTACTGGTGGAAT
CTGCTCCAGTACTGGTCTCAGGAGCTGAAGAACAGCGCCGTGTCCCTGCTGAACG
CTACAGCTATCGCCGTCGCCGAGGGCACCGACAGAGTGATCGAGGTGGTGCAGG
GCGCCTGCAGAGCCATCCGGCACATCCCTAGAAGGATTCGGCAAGGCCTGGAAA

[0263] GAATCCTGCTG (서열번호 40).

[0264] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 97과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 인간 글리코포린 A 유래의 작은 엑토도메인, 막관통 도메인 및 세포질 꼬리 서열에 작동가능하게 연결된 Ser-Gly 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 밑줄친 서열은 막관통 도메인 단편을 의미한다.

[0265] 인간 글리코포린 A TM_CT:

SGHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLPSPDTDVPLSSVEIENP

[0266] ETSDQ (서열번호 97)

[0267] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 98과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 인간 글리코포린 A 유래의 작은 엑토도메인, 막관통 및 세포질 꼬리 서열에 작동가능하게 연결된 Ser-Gly 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0268] 218 링커_인간 글리코포린 A 엑토-TM_HIV Env CT:

TCCGGACACTTCAGCGAGCCTGAGATCACCCTGATCATCTTCGGCGTGATGGCCG
GAGTGATCGGCACAATCCTGCTGATCAGCTACGGCATCAGAAGACTGATTAAGA
AATCCCCATCTGATGTGAAGCCTCTGCCTTCTCCTGACACCGACGTCCCCCTGAG

[0269] CAGCGTGGAAATCGAGAACCCCGAAACCAGCGACCAG (서열번호 98).

[0270] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 105와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 인간 글리코포린 A로부터 유래된 막관통 도메인 및 세포질 꼬리 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0271] 인간 글리코포린 A 힌지-TM-CT:

HFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLPSPDTDVPLSSVEIENPETS

[0272] DQ (서열번호 105)

[0273] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 106과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 글리코포린 A 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 힌지를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0274] 인간 글리코포린 A 힌지-TM-CT

CACTTCAGCGAGCCTGAGATCACCCTGATCATCTTCGGCGTGATGGCCGGAGTGA
TCGGCACAATCCTGCTGATCAGCTACGGCATCAGAAGACTGATTAAGAAATCCC
CATCTGATGTGAAGCCTCTGCCTTCTCCTGACACCGACGTCCCCCTGAGCAGCGT

[0275] GGAAATCGAGAACCCCGAAACCAGCGACCAG (서열번호 106)

[0276] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 43과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도

95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 당단백질 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 짧은 힌지를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0277] Cocal Env_T2A로부터의 짧은 힌지-TM-CT:

GVELIEGWFSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRYQGSNNKRIYNDIEMS

[0278] RFRKGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (서열번호 43).

[0279] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 47과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 T2A 링커에 작동가능하게 연결된 Cocal 당단백질 막관통 도메인 및 세포질 꼬리에 작동가능하게 연결된 짧은 힌지를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0280] Cocal Env_T2A로부터의 짧은 힌지-TM-CT:

GGAGTGGAACTGATCGAGGGCTGGTTCAGCAGCTGGAAAAGCACCGTGGTTACA
TTCTTTTTCGCCATCGGCGTGTTCATCCTGCTGTACGTGGTCGCCAGAATTGTGAT
CGCCGTGCGGTATAGATACCAGGGCAGCAACAACAAGCGGATCTACAACGACAT
CGAGATGAGCAGATTCAGAAAGGGATCTGGAGAGGGAAGGGGAAGCCTGCTGA

[0281] CATGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCAGGACCA (서열번호 47).

[0282] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 4와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 T2A 링커에 작동가능하게 연결된 CD4 유래의 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0283] CD4 TM 및 세포질 꼬리_T2A:

MALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRCRHRRRQGSGEGRGSLLTCGDVEENPGP

[0284] (서열번호 4).

[0285] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 9와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 T2A 링커에 작동가능하게 연결된 CD4 유래의 막관통 도메인 및 세포질 꼬리를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0286] CD4 TM 및 세포질 꼬리_T2A:

ATGGCACTGATCGTGCTGGGAGGAGTGGCAGGACTGCTGCTGTTCATCGGACTG
GGCATCTTCTTTTGCGTGCGCTGTAGGCACCGGAGAAGGCAGGGATCTGGAGAG
GGAAGGGGAAGCCTGCTGACATGCGGCGACGTGGAGGAGAACCCAGGACCA

[0287] (서열번호 9).

[0288] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 11과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 가우시아 루시퍼라제 유래의 신호 펩타이드 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0289] 가우시아 루시퍼라제 SP: MGVKVLFALICIAVAEA (서열번호 11).

[0290] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 14와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 가우시아 루시퍼라제 유래의 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0291] 가우시아 루시퍼라제 SP:

ATGGGCGTGAAAGTGCTGTTCGCCCTGATCTGCATCGCAGTTGCTGAAGCC

[0292] (서열번호 14).

[0293] 막관통 도메인은 막에 걸쳐 있는 분열촉진 형질도입 인핸서 및/또는 사이토카인-기반 형질도입 인핸서의 서열이다. 막관통 도메인은 소수성 알파 나선을 포함할 수 있다. 막관통 도메인은 CD28로부터 유래될 수 있다. 일부

실시양태에서, 막관통 도메인은 인간 단백질로부터 유래된다.

[0294] 본 발명의 바이러스 입자는 바이러스 외피에 사이토카인-기반 형질도입 인핸서를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 바이러스 입자 생산 동안 숙주 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 숙주 세포에 의해 만들어지고 세포 표면에서 발현된다. 초기 바이러스 입자가 숙주 세포막으로부터 발아하는 경우, 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 패키징 세포-유래 지질 이중층의 일부로서 바이러스 외피에 혼입될 수 있다.

[0295] 사이토카인-기반 형질도입 인핸서는 사이토카인 도메인 및 막관통 도메인을 포함할 수 있다. 이것은 구조 C-S-TM을 가질 수 있으며, 여기서 C는 사이토카인 도메인이고, S는 선택적 스페이서 도메인(예를 들어, 스페이서 서열)이고 TM은 막관통 도메인이다. 스페이서 도메인 및 막관통 도메인은 상기 정의된 바와 같다.

[0296] 사이토카인 도메인은 IL2, IL7 및 IL15와 같은 T-세포 활성화 사이토카인 또는 이의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 사이토카인의 "기능적 단편"은 특정 수용체에 결합하고 T-세포를 활성화시키는 능력을 보유하는 폴리펩타이드의 단편이다.

[0297] 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 글리코실화된 폴리펩타이드로서 분비되며, 이의 활성을 위해 신호 서열의 절단이 필요하다. 용액 NMR은 IL2의 구조가 4개의 나선 다발(A-D라고 함)과, 측면에 2개의 더 짧은 나선과 여러 개의 명확하지 못한(poorly defined) 루프를 포함한다는 것을 시사한다. 나선 A에 있는 잔기, 및 나선 A와 B 사이의 루프 영역에 있는 잔기는 수용체 결합에 중요하다.

[0298] *바이러스 입자 외피 발현 카세트*

[0299] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0300] (a) CD8 유래 신호 펩타이드

[0301] (b) 항-CD3 scFV

[0302] (c) CD8 유래 힌지 도메인

[0303] (d) CD4 막관통 도메인 및 세포질 꼬리

[0304] (e) T2A 링커

[0305] (f) Cocal 당단백질

[0306] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0307] (a) 가우시아 루시퍼라제 유래 신호 펩타이드

[0308] (b) 항-CD3 scFV

[0309] (c) 짧은 힌지 도메인

[0310] (d) Cocal 당단백질 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리

[0311] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0312] (a) 가우시아 루시퍼라제 유래 신호 펩타이드

[0313] (b) 항-CD3 scFV

[0314] (c) 긴 힌지 도메인

[0315] (d) Cocal 당단백질 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리

[0316] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0317] (a) 가우시아 루시퍼라제 유래 신호 펩타이드

[0318] (b) 항-CD3 scFV

[0319] (c) 218 링커

[0320] (d) 인간 글리코포린 A 엑토도메인 유래 막관통 도메인

[0321] (e) HIV 바이러스 외피 유래 세포질 꼬리

[0322] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0323] (a) 가우시아 루시퍼라제 유래 신호 펩타이드

[0324] (b) 항-CD3 scFV

[0325] (c) 218 링커

[0326] (d) HIV 바이러스 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리

[0327] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0328] (a) 가우시아 루시퍼라제 유래 신호 펩타이드

[0329] (b) 항-CD3 scFV

[0330] (c) 삼중 G4S 링커

[0331] (d) HIV 바이러스 외피 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리

[0332] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 바이러스 외피 발현 카세트를 포함한다:

[0333] (a) 가우시아 루시퍼라제 유래 신호 펩타이드

[0334] (b) 항-CD3 scFV

[0335] (c) 짧은 힌지 도메인

[0336] (d) Cocal 당단백질 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리

[0337] (e) T2A 링커

[0338] (f) Cocal 당단백질

[0339] *아데노-연관 바이러스*

[0340] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자이다. AAV는 4.7kb의 단일 가닥 DNA 바이러스이다. AAV 기반의 재조합 입자는 야생형 AAV가 비병원성이고 임의의 알려진 질환과 병인학적 연관성이 없기 때문에 우수한 임상 안전성과 연관이 있다. 또한 AAV는 수많은 조직에서 매우 효율적인 유전자 전달 및 지속적인 전이유전자 발현을 위한 능력을 제공한다. "AAV 입자"는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAVrh.10, AAVrh.74 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 아데노-연관 바이러스 혈청형으로부터 유래된 입자를 의미한다. AAV 벡터는 전체 또는 일부가 결실된 하나 이상의 AAV 야생형 유전자, 예를 들어 rep 및/또는 cap 유전자를 가질 수 있지만, 기능적인 측면의 역 말단 반복(ITR) 서열을 보유한다. 기능적 ITR 서열은 AAV 비리온의 구조, 복제 및 패키징에 필요하다. 따라서, AAV 벡터는 바이러스의 복제 및 패키징(예를 들어, 기능적 ITR)을 위해 적어도 필요한 해당 서열을 시스로 포함하는 것으로 본원에서 정의된다. ITR은 야생형 뉴클레오타이드 서열일 필요는 없으며, 서열이 기능적 구조, 복제 및 패키징을 제공하는 한, 예를 들어 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있다. AAV 입자는 하나 이상의 변형된 캡시드 단백질(예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다른 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 캡시드 단백질은 향성을 변경하고/하거나 면역원성을 감소시키도록 변형될 수 있다.

[0341] 재조합 AAV 입자의 혈청형은 이의 캡시드에 의해 결정된다. 국제 특허 공개 번호 WO2003042397A2는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV8, AAV9 및 rh10의 것을 포함하는 다양한 캡시드 서열을 개시한다. 국제 특허 공개 번호

WO2013078316A1은 AAVrh74로부터의 VP1의 폴리펩타이드 서열을 개시한다. 다수의 다양한 천연 발생 또는 유전자 변형된 AAV 캡시드 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0342] 본 개시내용의 실시에 유용한 유전자 전달 바이러스 입자는 분자 생물학 분야에 공지된 방법론을 활용하여 작제될 수 있다. 전형적으로, 전이유전자를 운반하는 바이러스 벡터는 전이유전자, 적합한 조절 요소 및 바이러스 단백질의 생산에 필수적인 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 조립되며, 이는 세포 형질도입을 매개한다. 이러한 재조합 바이러스는 관련 기술분야에 공지된 기술, 예를 들어 패키징 세포를 형질감염시키거나 헬퍼 플라스미드 또는 바이러스를 사용한 일시적 형질감염에 의해 생산될 수 있다. 바이러스 패키징 세포의 예로는 HeLa 세포, SF9 세포(선택적으로 배큘로바이러스 헬퍼 벡터 포함), 293 세포 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 복제-결손 재조합 바이러스의 생산에 대한 상세한 프로토콜은 예를 들어, WO95/14785, WO96/22378, 미국 특허 제5,882,877호, 미국 특허 제6,013,516호, 미국 특허 제4,861,719호, 미국 특허 제5,278,056호 및 WO 94/19478에서 찾아볼 수 있으며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0343] 본 개시내용의 조성물 및 방법에 사용가능한 바이러스 벡터의 예시적인 예는 WO2016/139463; WO2017/165245; WO2018111834에 개시되어 있으며, 이들 각각은 전체 내용이 본원에 포함된다.

[0344] *키메라 항원 수용체*

[0345] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바이러스 입자는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열(폴리뉴클레오타이드)을 세포(예를 들어, T 림프구) 내로 형질도입하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 형질도입은 형질도입된 세포에서 하나 이상의 CAR의 발현을 초래한다.

[0346] CAR은 T 림프구를 항원으로 유도하고 T 림프구를 자극하여 항원을 전시하는 세포를 사멸시키는 인공 막-결합 단백질이다. 예를 들어, Eshhar, 미국 특허 제7,741,465호 참조. 일반적으로, CAR은 항원, 예를 들어 세포 상의 항원에 결합하는 세포외 도메인, 선택적 링커, 막관통 도메인, 및 공동자극 도메인 및/또는 활성화 신호를 면역 세포로 전송하는 신호전달 도메인을 포함하는 세포내(세포질) 도메인을 포함하는 유전자 조작된 수용체이다. CAR을 사용하면, 단일 수용체는 특정 항원을 인식하고 해당 항원에 결합되면 면역 세포를 활성화하여 해당 항원을 보유한 세포를 공격하고 파괴하도록 프로그래밍될 수 있다. 이러한 항원이 종양 세포에 존재할 때 CAR을 발현하는 면역 세포는 종양 세포를 표적으로 삼아 사멸시킬 수 있다. 다른 모든 조건이 충족된다면, CAR이 예를 들어 T 림프구의 표면에서 발현되고 CAR의 세포외 도메인이 항원에 결합하는 경우, 세포내 신호전달 도메인은 T 림프구에 신호를 전송하여 활성화 및/또는 증식하도록 하고, 항원이 세포 표면에 존재한다면, 항원을 발현하는 세포를 사멸시키도록 한다. T 림프구는 최대로 활성화하기 위해, 1차 활성화 신호 및 공동자극 신호인 2가지 신호를 필요로 하기 때문에 CAR은 세포외 도메인에 대한 항원의 결합이 1차 활성화 신호 및 공동자극 신호 모두의 전송을 초래하도록 자극 및 공동자극 도메인을 포함할 수 있다.

[0347] 일부 실시양태에서, 폴리시스트론성 전이유전자 페이로드의 발현은 MND 프로모터에 의해 유도된다. MND 프로모터(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 제어 영역 결실됨, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환됨)는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서13과 함께 변형된 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV) LTR의 U3 영역을 함유하는 바이러스-유래 합성 프로모터이며, 인간 CD34+ 줄기 세포, 림프구, 및 기타 조직에서 높은 발현을 갖는다. 일부 실시양태에서, 해독 동안 리보솜 스키핑 및 절단을 유도하는 2A 펩타이드 서열에 의해 분리된, 4개의 분리 단백질이 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인에 연결된 FMC63 마우스 항-인간 CD19 scFv를 포함하는 2세대 CAR이다.

[0348] *CAR 세포내 도메인*

[0349] 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 T 림프구의 표면 상에서 발현되고 상기 T 림프구의 활성화 및/또는 증식을 촉발하는 단백질의 세포내 도메인 또는 모티프이거나 이들을 포함한다. 이러한 도메인 또는 모티프는 CAR의 세포외 부분에 대한 항원 결합에 반응하여 T 림프구의 활성화에 필수적인 1차 항원-결합 신호를 전송할 수 있다. 전형적으로, 이 도메인 또는 모티프는 ITAM(면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프)을 포함하거나 ITAM이다. CAR에 적합한 ITAM-함유 폴리펩타이드는 예를 들어 제타 CD3 사슬(CD3ζ) 또는 이의 ITAM-함유 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인이다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 림프구 수용체 사슬, TCR/CD3 복합 단백질, Fc 수용체 서브유닛 또는 IL-2 수용체 서브유닛으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 예를 들어 OO3ζ, CD3ε, CD22, CD79a, CD66d 또는 CD39의 신호전달 도메인으로부터 유래될 수 있다. "세포내 신호전달 도메인"은 이펙터 세포 기능, 예를 들어 활성화, 사이토카인 생성, 증식 및 세포독성 활성, 예컨대 CAR-결합된 표적 세포로 세포독성 인자의

방출, 또는 세포외 CAR 도메인에 대한 항원 결합 후 유발된 다른 세포 반응을 유발하는 면역 이펙터 세포의 내부로 표적 항원에 효과적인 CAR 결합의 메시지를 형질도입시키는데 참여하는 CAR 폴리펩타이드의 부분을 지칭한다.

[0350] 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 제타 CD3 사슬(CD3제타)이다.

[0351] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포내 도메인이 서열번호 54와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 CD3제타 도메인을 포함한다.

[0352] CD3제타:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL

[0353] PPR (서열번호 54).

[0354] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 66과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 CD3제타 도메인을 포함하는 CAR의 세포내 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0355] CD3제타:

CGCGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGATGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAAC
CAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGAT
AAGAGGAGGGGGAAGGGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCC
ACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTC
TGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGT
ACCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACATATGATGCCCTGCACATGCAGG

[0356] CCCTGCCACCTAGG (서열번호 66).

[0357] 일부 실시양태에서, CAR은 하나 이상의 공동자극 도메인 또는 모티프를, 예를 들어 폴리펩타이드의 세포내 도메인의 일부로서 추가로 포함한다. 공동자극 분자는 항원에 결합할 때 T 림프구의 효율적인 활성화 및 기능에 필요한 제2 신호를 제공하는 항원 수용체 또는 Fc 수용체 외에 잘 알려진 세포 표면 분자이다. 하나 이상의 공동자극 도메인 또는 모티프는, 예를 들어 공동자극 CD27 폴리펩타이드 서열, 공동자극 CD28 폴리펩타이드 서열, 공동자극 OX40(CD134) 폴리펩타이드 서열, 공동자극 4-1BB(CD137) 폴리펩타이드 서열, 또는 공동자극 유도성 T 세포 공동자극(ICOS) 폴리펩타이드 서열, 또는 다른 공동자극 도메인 또는 모티프, 또는 이의 임의의 조합 중 하나 이상일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54(ICAM), CD83, CD134(OX40), CD150(SLAMF1), CD152(CTLA4), CD223(LAG3), CD270(HVEM), CD278(ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM 및 ZAP70의 세포내 도메인으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0358] 일부 실시양태에서, 공동자극 도메인은 4-1BB의 세포내 도메인이다.

[0359] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포내 도메인이 서열번호 53과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 공동자극성 4-1BB 폴리펩타이드 서열을 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0360] 4-1BB 신호 도메인:

[0361] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열번호 53).

[0362] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 65와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 공동자극성 4-1BB 서열을 포함하는 CAR의 세포내 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0363] 4-1BB 신호 도메인:

AAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCCTTCATGCGCCCT
GTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTCGGTTTCCAGAGGAGGAG

[0364] GAGGGAGGATGCGAGCTG (서열번호 65).

[0365] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포내 도메인이 서열번호 80과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD3제타 도메인에 작동적으로 연결된 공동자극성 4-1BB 폴리펩타이드에 작동적으로 연결된 CD28 유래의 막관통 도메인에 작동적으로 연결된 IgG4 링커를 포함하는, CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0366] IgG4 링커-CD28 TM_4-1BB-CD3제타:

ESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG

[0367] HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 80).

[0368] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 86과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD3제타 도메인에 작동적으로 연결된 공동자극성 4-1BB 폴리펩타이드에 작동적으로 연결된 CD28 유래의 막관통 도메인에 작동적으로 연결된 IgG4 링커를 포함하는 CAR의 세포내 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0369] IgG4 링커-CD28 TM_4-1BB-CD3제타:

GAGTCTAAGTATGGCCCTCCATGCCCCCCTTGTCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGT
GGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATCATC
TTCTGGGTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCCTTCA
TGAGACCTGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTTCCAG
AGGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGCGCGTGAAGTTCTCTCGGAGCGCCGATG
CCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCC
GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGAGACCCAGAGATG
GGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCA
GAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGC
GCCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAG

[0370] GACACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGG (서열번호 86).

[0371] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포내 도메인이 서열번호 90과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD3제타 도메인에 작동적으로 연결된 공동자극성 4-1BB 폴리펩타이드에 작동적으로 연결된 CD28 유래의 막관통 도메인에 작동적으로 연결된 IgG4 링커를 포함하는, CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0372] IgG4 링커-CD28 TM_4-1BB-CD3제타_P2A:

ESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호

[0373] 90).

[0374] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 95와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD3제타 도메인에 작동적으로 연결된 공동자극성 4-1BB 폴리펩타이드에 작동적으로 연결된 CD28 유래의 막관통 도메인에 작동적으로 연결된 IgG4 링커를 포함하는, CAR의 세

포내 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0375] IgG4 링커-CD28 TM_4-1BB-CD3제타_P2A:

GAGTCCAAGTACGGCCCACCCTGCCCTCCATGTCCCATGTTTTGGGTGCTGGTGG
TGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTATTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCAT
CTTTTGGGTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTC
ATGAGACCCGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCCA
GAGGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCCCGGTCTGCCGAT
GCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGC
AGGCGCGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGAGGAAGGGACCCTGAGAT
GGGAGGCAAGCCAAGGCGCAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTGC
AGAAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGCGG
AGAAGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAA
GGACACCTACGATGCACTGCACATGCAGGCCCTGCCACCTAGAGGATCTGGAGC
CACAAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAGGAGAATCCTGGACC
A (서열번호 95).

[0376]

[0377] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 검출성 단백질, 예를 들어 형광 단백질(예를 들어, 녹색 형광 단백질), 또는 이의 공지된 임의의 변이체를 암호화하도록 추가로 변형될 수 있다.

[0378] *CAR 막관통 영역*

[0379] 막관통 영역은 기능적 CAR에 혼입될 수 있는 임의의 막관통 영역, 예를 들어, CD4 또는 CD8 분자의 막관통 영역일 수 있다.

[0380] 일부 실시양태에서, CAR의 막관통 도메인은 CD8, T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (촉각성), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 및/또는 NKG2C의 막관통 도메인으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR의 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인으로부터 유래될 수 있다.

[0381] *CAR 링커 영역*

[0382] 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이에 위치한 CAR의 선택적 링커는 약 2 내지 100개 아미노산 길이의 폴리펩타이드일 수 있다. 링커는 인접한 단백질 도메인이 서로에 자유롭게 이동하도록 글리신 및 세린과 같은 유연한 잔기를 포함하거나 이것으로 구성될 수 있다. 예를 들어, 2개의 인접한 도메인이 서로 입체적으로 간섭하지 않도록 하는 것이 바람직한 경우에는 더 긴 링커가 사용될 수 있다. 링커는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있다. 절단가능한 링커의 예로는 2A 링커(예를 들어 T2A), 2A-유사 링커 또는 이의 기능적 등가물 및 이의 조합을 포함한다.

[0383] 일부 실시양태에서, 링커는 P2A 자가-절단 펩타이드이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 55와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 링커를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0384] P2A 자가-절단 펩타이드: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호 55).

[0385] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 67과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 링커를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0386] P2A 자가-절단 펩타이드:

GGATCTGGAGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGATGTGGAGGAG

[0387] AATCCAGGACCT (서열번호 67).

[0388] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 69와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 링커를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0389] P2A 자가-절단 펩타이드:

GGCTCCGGCGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAAGAA

[0390] AATCCAGGACCA (서열번호 69).

[0391] 일부 실시양태에서, 링커는 임의의 면역글로불린의 힌지 영역 또는 힌지 영역의 부분으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 링커는 IgG4로부터 유래된다.

[0392] 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 52와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD28 유래의 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 IgG4 링커이다.

[0393] IgG4 링커-CD28 TM:

[0394] ESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (서열번호 52).

[0395] 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 64와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CD28 유래의 막관통 도메인에 작동가능하게 연결된 IgG4 링커이다.

[0396] IgG4 링커-CD28 TM:

GAGTCTAAGTATGGCCCACCCTGCCCTCCATGTCCAATGTTCTGGGTGCTGGTGG

TGGTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATCAT

[0397] CTTCTGGGTG (서열번호 64).

[0398] *CAR 세포외 도메인*

[0399] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 세포 내로 형질도입된 핵산은 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함하며, 여기서 폴리펩타이드의 세포외 도메인은 관심 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 상기 항원에 결합하는 수용체 또는 수용체의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 부분이거나, 또는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 단일-사슬 Fv 도메인을 포함하거나 단일-사슬 Fv 도메인이다. 단일-사슬 Fv 도메인은 예를 들어 유연한 링커에 의해 VH에 연결된 VL을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 VL 및 VH는 상기 항원에 결합하는 항체로부터 유래된다.

[0400] 일부 실시양태에서, CAR의 세포외 도메인은 원하는 항원(예를 들어, 전립선 신생항원)에 결합하는 임의의 폴리펩타이드를 함유할 수 있다. 세포외 도메인은 scFv, 항체의 일부 또는 대체 스캐폴드를 포함할 수 있다. CAR은 또한 일렬로 배열되고 링커 서열에 의해 분리될 수 있는 2개 이상의 원하는 항원에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 도메인 항체, scFv, 라마 VHH 항체 또는 다른 VH 단독 항체 단편은 CAR에 이중특이성 또는 다중특이성을 제공하기 위해 링커를 통해 일렬로 조직화될 수 있다.

[0401] 폴리펩타이드의 세포외 도메인이 결합하는 항원은 임의의 관심 항원일 수 있으며, 예를 들어 종양 세포 상의 항원일 수 있다. 종양 세포는 예를 들어 고형 종양 세포 또는 혈액암 세포일 수 있다. 항원은 임의의 종양 또는 암 유형의 세포, 예를 들어 림프종, 폐암, 유방암, 전립선암, 부신피질 암종, 갑상선 암종, 비인두 암종, 흑색종, 예를 들어 악성 흑색종, 피부 암종, 결장직장 암종, 데스모이드 종양, 결합조직형성 작은 원형 세포 종양, 내분비 종양, 유잉 육종, 말초 원시 신경외배엽 종양, 고형 생식 세포 종양, 간모세포종, 신경모세포종, 비-횡문근육종 연조직 육종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 윌름스 종양, 교모세포종, 점액종, 섬유종, 지방종 등의 세포에서 발현되는 임의의 항원일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 림프종은 만성 림프구성 백혈병(소림프구성 림프종), B-세포 전림프구성 백혈병, 림프형질세포 림프종, 발덴스트룀 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질 세포 골수종, 형질세포종, 결절외 변연부 B 세포 림프종, MALT 림프종, 결절 변연부 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관

내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 버킷 림프종, T 림프구 전림프구성 백혈병, T 림프구 거대 과립성 림프구성 백혈병, 공격적 NK 세포 백혈병, 성인 T 림프구 백혈병/림프종, 결절외 NK/T 림프구 림프종, 비강 유형, 장병증 유형 T 림프구 림프종, 간비장 T 림프구 림프종, 모세포 NK 세포 림프종, 균상 식육종, 세자리 증후군, 원발성 피부 역형성 대세포 림프종, 림프종양 구진증, 혈관면역모세포성 T 림프구 림프종, 말초 T 림프구 림프종(상세불명), 역형성 대세포 림프종, 호지킨 림프종 또는 비호지킨 림프종일 수 있다. 암이 만성 림프구성 백혈병(CLL)인 일부 실시양태에서, CLL의 B 세포는 정상 핵형을 갖는다. 암이 만성 림프구성 백혈병(CLL)인 일부 실시양태에서, CLL의 B 세포는 17p 결실, 11q 결실, 12q 삼염색체성, 13q 결실 또는 p53 결실을 운반한다.

[0402] 일부 실시양태에서, 항원은 B 세포 악성 세포, 재발성/불응성 CD19-발현 악성 세포, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 세포, 버킷형 거대 B 세포 림프종(B-LBL) 세포, 여포성 림프종(FL) 세포, 만성 림프구성 백혈병(CLL) 세포, 급성 림프구성 백혈병(ALL) 세포, 외투 세포 림프종(MCL) 세포, 혈액학적 악성종양 세포, 결장암 세포, 폐암 세포, 간암 세포, 유방암 세포, 신장암 세포, 전립선암 세포, 난소암 세포, 피부암 세포, 흑색종 세포, 골암 세포, 뇌암 세포, 편평 세포 암종 세포, 백혈병 세포, 골수종 세포, B 세포 림프종 세포, 신장암 세포, 자궁암 세포, 선암종 세포, 췌장암 세포, 만성 골수성 백혈병 세포, 교모세포종 세포, 신경모세포종 세포, 수모세포종 세포, 또는 육종 세포에서 발현된다.

[0403] 일부 실시양태에서, 항원은 종양-연관 항원(TAA) 또는 종양-특이적 항원(TSA)이다. 일부 실시양태에서, 제한 없이, 종양-연관 항원 또는 종양-특이적 항원은 B 세포 성숙 항원(BCMA), B 세포 활성화 인자(BAFF), Her2, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선-특이적 막 항원(PSMA) 알파-태아단백(AFP), 암태아항원(CEA), EGFRvIII, 암 항원-125(CA-125), CA19-9, 칼레티닌, MUC-1, 상피막단백질(EMA), 상피종양항원(ETA), 티로시나제, 흑색종-연관 항원(MAGE), CD19, CD20, CD34, CD45, CD99, CD117, 크로모그라닌, 사이토케라틴, 데스민, 신경아교 원섬유 산성 단백질(GFAP), 총 낭포성 질환 유체 단백질(GCDFP-15), HMB-45 항원, 단백질 멜란-A(T 림프구에 의해 인식되는 흑색종 항원; MART-1), myo-D1, 근육 특이적 액틴(MSA), 신경필라멘트, 뉴런-특이적 에놀라제(NSE), 태반 알칼리 포스파타제, 시냅토피시스, 티로글로불린, 갑상선 전사 인자-1, 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 피루베이트 키나아제 동종효소 유형 M2(종양 M2-PK)의 이량체 형태, 비정상 ras 단백질, 또는 비정상 p53 단백질이다.

[0404] 일부 실시양태에서, 항원은 CD19이다.

[0405] 일부 실시양태에서, CAR은 CD19 결합을 위한 FMC63 scFv 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0406] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 서열번호 50과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 신호 펩타이드를 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0407] 신호 펩타이드(인간 CSF2R): MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP (서열번호 50).

[0408] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 서열번호 51과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 αCD19 scFv(CD19 VH에 연결된 CD19 VL)를 포함하는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0409] CD19 VL_링커_VH:

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPG
SGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG
VIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYA

[0410] MDYWGQGTSVTVSS (서열번호 51).

[0411] 이 scFv의 상보적 결정 영역(CDR)은 RASQDISKYLN, (CDR-L1; 서열번호 138), HTSRLHS (CDR-L2; 서열번호 139), QQGNTLPYT (CDR-L3; 서열번호 140), DYGV (CDR-H1; 서열번호 141), VIWGSETTYYNSALKS (CDR-H2; 서열번호 142), HYYYGGSYAMDY (CDR-H3; 서열번호 143)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 이들 CDR을 갖는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 선택적으로 αCD19 scFv는 서열번호 51과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0412] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 이들 CDR을 갖는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 선택적으로 αCD19 scFv는 서열번호 51 또는 89와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0413] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 62와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 CAR의 세포외 도메인을 위한 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0414] 신호 펩타이드(인간 CSF2R):

ATGCTGCTGCTGGTGACCTCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCTCACCCAGCCTTTCT

[0415] GCTGATCCCC (서열번호 62).

[0416] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 63과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR의 세포외 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0417] αCD19 scFv(VL_링커_VH):

GACATCCAGATGACACAGACCACAAGCTCCCTGTCTGCCAGCCTGGGCGACAGA
GTGACCATCTCCTGTAGGGCCTCTCAGGATATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATC
AGCAGAAGCCAGATGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTACCACACCTCCAGGCTGC
ACTCTGGAGTGCCAAGCCGGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACCGACTATTCCCT
GACAATCTCTAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACATACTTTTGCCAGCAGGG
CAATACCCTGCCATATACATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGATCACCGGATC
CACATCTGGAAGCGGCAAGCCAGGAAGCGGAGAGGGATCCACAAAGGGAGAGG
TGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGCACCATCCCAGTCTCTGAGCG
TGACCTGTACAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCTGACTACGGCGTGTCCTGGATCAG
GCAGCCACCTAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCTCTGAGAC
CACATACTATAATTCTGCCCTGAAGAGCCGCCTGACCATCATCAAGGACAACTCC
AAGTCTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACGATACAGCCATCT
ACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTACGCCATGGATTATTGGGG

[0418] CCAGGGCACCTCCGTGACAGTGTCTAGC (서열번호 63).

[0419] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 서열번호 79와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0420] αCD19 scFv:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ

[0421] TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 79).

[0422] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 85와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR의 세포외 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0423] αCD19 scFv:

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACACCCTGCCTTCC
TGCTGATCCCAGATATCCAGATGACACAGACCACATCCTCTCTGTCCGCCTCTCT
GGGCGACAGAGTGACCATCTCTTGTAGGGCCAGCCAGGATATCTCCAAGTACCT
GAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGACGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTACCACAC
CTCTAGGCTGCACAGCGGAGTGCCATCCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAAC
AGACTATTCTCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACATACTTT
TGCCAGCAGGGCAATACCCTGCCATATACATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAG
ATCACCGGAAGCACATCCGGATCTGGCAAGCCAGGATCCGGAGAGGGATCTACA
AAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGCACCCAGCCA
GTCCCTGTCTGTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCCGATTACGGCGTG
TCCTGGATCAGACAGCCACCAAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGG
GGCTCTGAGACCACATACTATAATAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCA
AGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTTCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACG
ATACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTACGCCAT
[0424] GGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (서열번호 85).

[0425] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 서열번호 89와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0426] αCD19 scFv:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ
[0427] TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS (서열번호 89).

[0428] 이 scFv의 상보적 결정 영역(CDR)은 RASQDISKYLN,(CDR-L1; 서열번호 138), HTSRLHS(CDR-L2; 서열번호 139), QQGNTLPYT(CDR-L3; 서열번호 140), DYGV(CDR-H1; 서열번호 141), VIWGSETTYYNSALKS(CDR-H2; 서열번호 142), HYYYGGSYAMDY(CDR-H3; 서열번호 143)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포외 도메인이 이들 CDR을 갖는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 선택적으로 αCD19 scFv는 서열번호 89와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0429] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 94와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 αCD19 scFv를 포함하는 CAR의 세포외 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0430] αCD19 scFv:

ATGCTGCTGCTGGTGACATCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACACCCAGCCTTCC
TGCTGATCCCCGATATCCAGATGACCCAGACCACAAGCTCCCTGAGCGCCTCCCT
GGGCGACAGGGTGACAATCTCTTGTCGGGCCAGCCAGGATATCTCCAAGTATCT
GAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTATCACAC
ATCTAGACTGCACAGCGGCGTGCCTTCCAGGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACC
GACTACTCTCTGACAATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACCTATTTCT
GCCAGCAGGGCAATACCCTGCCTTACACATTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGA
TCACCGGCTCTACAAGCGGATCCGGCAAGCCAGGATCCGGAGAGGGATCTACCA
AGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCTGGACTGGTGGCACCATCTCAG
AGCCTGTCCGTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCAGATTATGGCGTGA
GCTGGATCAGGCAGCCACCTAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGG
GCTCCGAGACCACATACTATAACAGCGCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCATCAA
GGACAACTCTAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAATTCCCTGCAGACCGACGA
TACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCTTATGCCATG
[0431] GATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (서열번호 94).

[0432] 일부 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 암/고환(CT) 항원, 예를 들어 BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1 또는 TPTE이다.

[0433] 일부 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 탄수화물 또는 강글리오시드, 예를 들어, fuc-GM1, GM2(종양태아 항원-면역원성-1; OFA-I-1); GD2(OFA-I-2), GM3, GD3 등이다.

[0434] 일부 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 알파-액티닌-4, Bage-1, BCR-ABL, Bcr-Abl 융합 단백질, 베타-카테닌, CA 125, CA 15-3(CA 27.29\BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, dek-can 융합 단백질, EBNA, EF2, 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 항원, ETV6-AML1 융합 단백질, HLA-A2, HLA-All, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2, 3, neo-PAP, 미오신 클래스 I, OS-9, pml-RARα 융합 단백질, PTPRK, K-ras, N-ras, 트리오스포스페이트 이소머라제, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100(Pmel 17), 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 인간 유두종 바이러스(HPV) 항원 E6 및 E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-카테닌, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, 텔로머라제, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68\KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733(EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, CD19, CD20, CD22, CD27, CD30, CD70, CD123, CD133, B 세포 성숙 항원, CS1, GPCR5, GD2(강글리오사이드 G2), EGFRvIII(표피 성장 인자 변이체 III), 정자 단백질 17(Sp17), 메소텔린, PAP(전립선 산 포스파타제), 프로스테인, TARP(T 세포 수용체 감마 대체 판독 프레임 단백질), Trp-p8, STEAP1(전립선 1의 6개-막관통 상피 항원), 비정상 ras 단백질 또는 비정상 p53 단백질이다. 일부 실시양태에서, 상기 종양-연관 항원 또는 종양-특이적 항원은 인테그린 αvβ3(CD61), 갈락틴, K-Ras(V-Ki-ras2 Kirsten 래트 육종 바이러스 종양유전자) 또는 Ral-B이다. 다른 종양-연관 및 종양-특이적 항원은 관련 기술분야의 기술자에게 알려져 있다.

[0435] TSA 및 TAA에 결합하는 항체 및 scFv는 관련 기술분야에 공지된 항체 및 scFV를 포함하며, 이들을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열도 마찬가지이다.

[0436] 일부 실시양태에서, 항원은 TSA 또는 TAA로 고려되지 않는 항원이지만, 그럼에도 불구하고 종양 세포 또는 종양에 의해 야기된 손상과 연관이 있는 항원이다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 항원은, 예를 들어 성장 인자, 사이토카인 또는 인터루킨, 예를 들어 혈관신생 또는 맥관형성과 연관된 성장 인자, 사이토카인 또는 인터루킨이다. 이러한 성장 인자, 사이토카인 또는 인터루킨은, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 간세포 성장 인자(HGF), 인슐린-유사 성장 인자(IGF), 또는

인터루킨-8(IL-8)을 포함할 수 있다. 종양은 또한 종양에 국한된 저산소 환경을 만들 수 있다. 이와 같이, 일부 실시양태에서, 항원은 저산소증-연관 인자, 예를 들어, HIF-1α, HIF-1β, HIF-2a, HIF-2β, HIF-3α, 또는 HIF-3β이다. 종양은 또한 정상 조직에 국부적인 손상을 유발할 수 있어, 손상 연관 분자 패턴 분자(DAMP; 알라민이라고도 알려짐)로 알려진 분자의 방출을 유발한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 항원은 DAMP, 예를 들어 열충격 단백질, 염색질-연관 단백질 고 이동성 그룹 박스 1(HMGB1), S100A8(MRP8, 칼그라눌린 A), S100A9(MRP14, 칼그라눌린 B), 혈청 아밀로이드 A(SAA)이거나, 또는 데옥시리보핵산, 아데노신 트리포스페이트, 요산 또는 헤파린 설페이트일 수 있다.

[0437] 본원에 기재된 폴리펩타이드의 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 상기 막관통 도메인에 직접 또는 링커, 스페이서 또는 힌지 폴리펩타이드 서열, 예를 들어 CD28로부터의 서열 또는 CTLA4로부터의 서열에 의해 연결된다.

[0438] 일부 실시양태에서, 원하는 항원에 결합하는 세포외 도메인은 본원에 기술된 기술을 사용하여 생성된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로부터 유래될 수 있다.

[0439] *라파마이신-활성화된 세포-표면 수용체(RACR)*

[0440] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 다분할 세포-표면 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 증식 수용체이다.

[0441] 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 라파마이신-활성화 세포-표면 수용체(RACR)이다.

[0442] 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 화학적으로 유도가능한 세포-표면 수용체이다.

[0443] 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인(FRB 도메인) 또는 이의 기능적 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다분할 세포-표면 수용체는 FK506 결합 단백질 도메인(FKBP) 또는 이의 기능적 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, FKBP는 FKBP12이다.

[0444] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 57과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 FKBP12에 작동가능하게 연결된 신호 펩타이드를 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0445] 신호 펩타이드-FKBP12:

MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKK
FDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIP
[0446] PHATLVFDVELLKL (서열번호 57)

[0447] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 58과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 세포질 도메인에 작동가능하게 연결된 IL-2R 감마 막관통 도메인을 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0448] IL-2R 감마 TM-세포질 도메인:

GEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEY
HGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAP
[0449] PCYTLKPET (서열번호 58).

[0450] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 55와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 자가-절단 펩타이드를 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0451] P2A: GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호 55).

[0452] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 59와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 FRB에 작동가능하게 연결된 신호 펩타이드를 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0453] 신호 펩타이드-FRB:

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLH
AMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVF
RRISK (서열번호 59).

[0454]

[0455] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 60과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 세포질 도메인에 작동가능하게 연결된 IL-2R 베타 막관통 도메인을 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0456] IL-2R 베타 TM-세포질 도메인:

GKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSS
EHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSN
HSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQP
LSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWD
PQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALN
ARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV (서열번호 60).

[0457]

[0458] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 70과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 FKBP12에 작동가능하게 연결된 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0459] 신호 펩타이드-FKBP12:

ATGCCTCTGGGACTGCTGTGGCTGGGACTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCC
AGGCCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCAGCCCTGGCGACGGCAGAACCTTTCCAA
AGAGGGGCCAGACATGCGTGGTGCACTACACCGGCATGCTGGAGGATGGCAAGA
AGTTCGACTCCTCTCGCGATCGGAACAAGCCCTTTAAGTTCATGCTGGGCAAGCA
GGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGTCTGTGGGCCAGA
GGGCCAAGCTGACAATCAGCCCAGACTATGCATACGGAGCAACCGGACACCCTG
GAATCATCCCACCACACGCCACACTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTG
(서열번호 70).

[0460]

[0461] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 71과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 세포질 도메인에 작동가능하게 연결된 IL-2R 감마 막관통 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0462] IL-2R 감마 TM-세포질 도메인:

GGCGAGGGCTCTAACACCAGCAAGGAGAATCCATTTCTGTTCGCACTGGAGGCA
GTGGTCATCTCCGTGGGCTCTATGGGCCTGATCATCTCCCTGCTGTGCGTGTACTT
TTGGCTGGAGAGAACAATGCCAAGGATCCCCACCCTGAAGAACCTGGAGGACCT
GGTGACCGAGTACCACGGCAATTTCAGCGCCTGGTCCGGCGTGTCTAAGGGACT
GGCAGAGTCCCTGCAGCCAGATTATTCTGAGCGGCTGTGCCTGGTGAGCGAGAT
CCCTCCAAAGGGAGGCGCCCTGGGAGAGGGACCAGGAGCCAGCCCCTGCAACCA
GCACTCCCCTTACTGGGCCCCCCCTTGTTATACCCTGAAGCCAGAGACA
(서열번호 71).

[0463]

[0464] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 72와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 자가-절단 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0465] P2A:

GGCTCTGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAAGCCGGCGACGTGGAAGAA

[0466] AACCCAGGACCA (서열번호 72).

[0467] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 73과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 FRB에 작동가능하게 연결된 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0468] 신호 펩타이드-FRB:

ATGGCACTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAG
CCAGACCCATCCTGTGGCACGAAATGTGGCATGAAGGCCTGGAGGAGGCAAGCA
GACTGTACTTTGGCGAGAGAAATGTGAAAGGAATGTTTGAGGTGCTGGAGCCTC
TGCACGCCATGATGGAGAGGGGCCCTCAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACC
AGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAGGAGTGGTGCAGGAAGTATATGA
AGAGCGGAAATGTGAAAGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTACCACGTGT

[0469] TCCGCCGGATCTCTAAG (서열번호 73).

[0470] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 74와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 세포질 도메인에 작동가능하게 연결된 IL-2R 베타 막관통 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0471] IL-2R 베타 TM-세포질 도메인:

GGCAAGGATACAATCCCTTGGCTGGGACACCTGCTGGTGGGACTGAGCGGAGCC
TTTGGCTTCATCATCCTGGTGTATCTGCTGATCAACTGCAGAAATACAGGCCCAT
GGCTGAAGAAGGTGCTGAAGTGTAACACCCCTGACCCATCCAAGTTCTTTTCTCA
GCTGAGCTCCGAGCACGGCGGCGATGTGCAGAAGTGGCTGTCTAGCCCCTTTCCT
TCCTCTAGCTTCAGCCCTGGAGGACTGGCACCTGAGATCTCCCCACTGGAGGTGC
TGGAGAGGGACAAGGTGACCCAGCTGCTGCTGCAGCAGGATAAGGTGCCAGAGC
CCGCCTCCCTGTCCTCTAACCACAGCCTGACCTCCTGCTTTACAAATCAGGGCTA
CTTCTTTTTCCACCTGCCAGACGCACTGGAGATCGAGGCATGTCAGGTGTATTTC
ACATACGATCCCTATAGCGAGGAGGACCCTGATGAGGGAGTGGCCGGCGCCCCA
ACCGGAAGCTCCCCTCAGCCACTGCAGCCACTGAGCGGAGAGGACGATGCATAT
TGTACATTTCCTTCCCGCGACGATCTGCTGCTGTTCTCTCCAAGCCTGCTGGGAGG
ACCATCTCCACCCAGCACCGCACCTGGAGGATCCGGGGCAGGGGAGGAGCGGAT
GCCTCCATCTCTGCAGGAGAGAGTGCCAAGGGACTGGGATCCACAGCCTCTGGG
ACCACCTACCCCTGGAGTGCCAGACCTGGTGGATTTCCAGCCACCCCCTGAGCTG
GTGCTGCGGGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCAGACGCAGGACCTAGAGAGGGCGT
GAGCTTTCCCTGGTCCAGGCCACCAGGACAGGGAGAGTTCCGCGCCCTGAACGC
CCGGCTGCCCCTGAATACAGACGCCTACCTGTCTCTGCAGGAGCTGCAGGGCCA

[0472] GGATCCTACCCACCTGGTG (서열번호 74).

[0473] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 77과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 펩타이드에 작동가능하게 연결된 IL-2R 감마 도메인에 작동가능하게 연결된 FKBP12를 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0474] RACRg(FKBP12_IL-2R 감마)_P2A:

MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKK
FDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIP
PHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMP
RIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGP

[0475] GASPCNQHSPYWAPPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호 77).

[0476] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 78과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성를 공유하는 P2A 펩타이드에 작동가능하게 연결된 IL-2R 베타 도메인에 작동가능하게 연결된 FRB를 포함하는 RACR 폴리펩타이드를 포함한다.

[0477] RACRb(FRB_IL-2R 베타)_P2A:

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLH
AMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVF
RRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFS
QLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASL
SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQP
LQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPR
DWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEF
RALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0478] (서열번호 78).

[0479] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 83과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A에 작동가능하게 연결된 IL-2R 감마 도메인에 작동가능하게 연결된 FKBP12를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0480] RACRg(FKBP12_IL-2R 감마)_P2A:

ATGCCACTGGGACTGCTGTGGCTGGGACTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCC
AGGCCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCAGCCCTGGCGACGGACGCACCTTTCCAA
AGAGGGGACAGACATGCGTGGTGCACTACACCGGCATGCTGGAGGATGGCAAG
AAGTTCGACAGCTCCAGAGATAGGAATAAGCCCTTTAAGTTCATGCTGGGCAAG
CAGGAAGTGATCAGGGGATGGGAGGAGGGAGTGGCACAGATGTCTGTGGGACA
GCGGGCCAAGCTGACAATCAGCCCAGACTATGCATACGGAGCAACCGGACACCC
TGGAATCATCCCACCTCACGCCACACTGGTGTTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTG
GGCGAGGGCAGCAACACCTCCAAGGAGAATCCATTTCTGTTCGCCCTGGAGGCC
GTGGTCATCTCTGTGGGCAGCATGGGCCTGATCATCTCCCTGCTGTGCGTGTACT
TTTGGCTGGAGCGCACAATGCCACGGATCCCCACCCTGAAGAACCTGGAGGACC
TGGTGACCGAGTACCACGGCAATTTCTCCGCCTGGTCTGGCGTGAGCAAGGGACT
GGCAGAGTCTCTGCAGCCAGATTATAGCGAGCGGCTGTGCCTGGTGAGCGAGAT
CCCACCCAAGGGAGGCGCCCTGGGAGAGGGACCAGGAGCCTCCCCTTGCAACCA
GCACTCTCCTTACTGGGCCCCTCCATGTTATACCCTGAAGCCAGAGACAGGCAGC
GGAGCTACTAACTTCTCCCTGCTGAAGCAAGCAGGCGACGTGGAAGAAAATCCT

[0481] GGACCA (서열번호 83).

[0482] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 84와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A에 작동가능하게 연결된 IL-2R 베타 도메인에 작동가능하게 연결된 FRB를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0483] RACRb(FRB_IL-2R 베타)_P2A:

ATGGCACTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAG
CCAGACCCATCCTGTGGCACGAAATGTGGCATGAAGGCCTGGAGGAGGCAAGCA
GGCTGTACTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGAATGTTTGAAGTGCTGGAGCCTCT
GCACGCCATGATGGAGAGGGGCCCTCAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACCA
GGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAGGAGTGGTGCAGGAAGTATATGAA
GTCTGGAAATGTGAAAGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTATTATCACGTGTTC
AGGCGCATCTCTAAGGGCAAGGATACAATCCCTTGGCTGGGACACCTGCTGGTG
GGACTGAGCGGAGCCTTTGGCTTCATCATCCTGGTGTATCTGCTGATCAACTGCC
GCAATACAGGCCCATGGCTGAAGAAGGTGCTGAAGTGTAACACCCCCGACCCTT
CCAAGTTCTTTTCTCAGCTGTCTAGCGAGCACGGCGGCGATGTGCAGAAGTGGCT
GTCCTCTCCATTTCCCAGCTCCTCTTTCAGCCCAGGAGGACTGGCACCAGAGATC
TCCCCACTGGAGGTGCTGGAGAGGGACAAGGTGACCCAGCTGCTGCTGCAGCAG
GATAAGGTGCCTGAGCCAGCCTCCCTGAGCTCCAACCACTCCCTGACCTCTTGCT
TTACAAATCAGGGCTACTTCTTTTTCCACCTGCCAGACGCACTGGAGATCGAGGC
ATGTCAGGTGTATTTCACATACGATCCCTATAGCGAGGAGGACCCTGATGAGGG
AGTGGCCGGCGCCCCAACCGGATCTAGCCCACAGCCTCTGCAGCCACTGAGCGG
AGAGGACGATGCATATTGTACATTTCCTTCCCGCGACGATCTGCTGCTGTTCTCTC
CAAGCCTGCTGGGAGGACCAAGCCCACCTTCCACCGCACCAGGCGGCTCCGGGG
CAGGGGAGGAGCGGATGCCACCCTCTCTGCAGGAGAGAGTGCCAAGGGACTGG
GATCCACAGCCACTGGGACCTCCAACCCCTGGAGTGCCAGACCTGGTGGATTTCC
AGCCCCCTCCAGAGCTGGTGCTGAGAGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCTGACGCAG
GACCAAGAGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGGTCCAGGCCACCTGGACAGGGAGAGT
TCAGAGCCCTGAACGCCAGGCTGCCCCTGAATACAGACGCCTACCTGTCTCTGCA
GGAGCTGCAGGGCCAGGATCCTACACACCTGGTCGGATCTGGCGCCACCAACTT
TAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGACCA (서열번호 84).

[0484]

[0485] 일부 실시양태에서, FKBP 도메인 및 FRB 도메인은 T 세포 활성인자 단백질 복합체를 형성한다. FKBP 및 FRB 도메인에 의해 형성된 복합체는 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진한다. 일부 실시양태에서, FKBP 및 FRB 도메인에 의해 형성된 복합체는 리간드에 의해 제어된다.

[0486] 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신이다.

[0487] 일부 실시양태에서, FRB 도메인 및 FKBP는 형질도입된 세포에 라파마이신을 격리시키는 라파마이신을 갖는 3분할 복합체를 형성한다.

[0488] 일부 실시양태에서, 리간드는 단백질, 항체, 소분자 또는 약물이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체(라파로그)이다. 일부 실시양태에서, 라파로그는 라파마이신에 대해 하기 변형 중 하나 이상을 갖는 라파마이신의 변이체를 포함한다: C7, C42 및/또는 C29에서 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 교체; C13, C43 및/또는 C28에서 하이드록시의 제거, 유도체화 또는 교체; C14, C24 및/또는 C30에서 케톤의 환원, 제거 또는 유도체화; 6원 피페콜레이트 고리를 5원 프롤릴 고리로 교체; 및 사이클로헥실 고리 상의 대안적 치환 또는 사이클로헥실 고리를 치환된 사이클로펜틸 고리로 교체. 따라서, 일부 실시양태에서, 라파로그는 에베롤리무스, 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 조타롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 소듐 마이코페르놀산, 베니디핀 염산염, 라파민, AP23573 또는 AP1903, 또는 이들의 대사산물, 유도체 및/또는 조합이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 IMID-클래스 약물(예를 들어, 탈리도마이드, 포말리디마이드, 레날리도마이드 또는 관련 유사체)이다.

[0489] 일부 실시양태에서, 분자는 FK1012, 타크롤리무스(FK506), FKCsA, 라파마이신, 쿠메르마이신, 지베렐린, HaXS, TMP-HTag 및 ABT-737 또는 이의 기능성 유도체로부터 선택된다.

[0490] 일부 실시양태에서, FKBP 도메인은 IL2R 감마 도메인에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, FRB 도메인은 IL2R 베타 도메인에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, IL2R 감마 도메인 및 IL2R 베타 도메인은 이종이량체화한다. 일부 실시양태에서, IL2R 감마 도메인 및 IL2R 베타 도메인은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하기 위해 리간드의 존재 하에 이종이량체화한다. 일부 실시양태에서, IL2R 감마 도메인 및 IL2R 베타 도메인은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하기 위해 라파마이신의 존재 하에 이종이량체화한다. 일부 실시양태에서, IL2R 감마 도메인 및 IL2R 베타 도메인은 T 세포 활성화를 촉진하기 위해 라파마이신의 존재 하에 이종이량체화한다.

[0491] *시토졸 FRB*

[0492] 일부 실시양태에서, 벡터 게놈은 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0493] 일부 실시양태에서, 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 폴리뉴클레오타이드는 라파마이신에 결합한다. 일부 실시양태에서, 면역억제제에 대한 내성을 부여하는 폴리뉴클레오타이드는 시토졸("네이키드") FRB 도메인을 암호화한다. 네이키드 FRB 도메인은 mTOR 단백질 키나아제에서 추출된 대략 100개의 아미노산 도메인이다. 이는 자유롭게 확산 가능한 가용성 단백질로서 시토졸에서 발현된다. FRB 도메인의 목적은 형질도입된 세포에서 mTOR에 대한 라파마이신의 저해 효과를 감소시키는 것이며, 이는 형질도입된 T 세포의 일관된 활성화를 허용하고 천연 T 세포보다 나은 증식 이점을 제공해야 한다.

[0494] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 56과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 시토졸 FRB 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0495] 네이키드 FRB:

[0496] EMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLM
EAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISK (서열번호 56).

[0497] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 68과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 시토졸 FRB 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0498] 네이키드 FRB:

[0499] GAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCAAGCAGGCTGTACTTTGGCGAGCG
GAATGTGAAGGGCATGTTCGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCAATGATGGAGAG
GGGACCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTCAACCAGGCATACGGAAGGGACCT
GATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTATATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGA
CCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTATTACCACGTGTTTAGAAGGATCAGCAAG
(서열번호 68).

[0500] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 76과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 펩타이드에 작동가능하게 연결된 시토졸 FRB 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0501] 네이키드 FRB_P2A:

[0502] MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL
MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGP (서열번호 76).

[0503] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 82와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A에 작동가능하게 연결된 시토졸 FRB 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0504] 네이키드 FRB_P2A:

ATGGAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCAAGCAGACTGTACTTTGGCGAG
AGGAACGTGAAGGGCATGTTCGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCAATGATGGAG
AGGGGACCACAGACCCTGAAGGAGACATCTTTCAACCAGGCATACGGAAGGGAC
CTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTATATGAAGAGCGGCAATGTGAA
GGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAG
GGCTCTGGCGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAGGAG
AATCCTGGACCA (서열번호 82).

[0505]

[0506] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 88과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A 펩타이드에 작동가능하게 연결된 시토졸 FRB 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0507] 네이키드 FRB_P2A:

MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL
MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGP (서열번호 88).

[0508]

[0509] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 93과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 P2A에 작동가능하게 연결된 시토졸 FRB 도메인을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0510] 네이키드 FRB_P2A:

ATGGAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCATCCAGACTGTACTTCGGCGAG
AGGAACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCCATGATGGAG
AGAGGCCCCCAGACCCTGAAGGAGACATCTTTCAACCAGGCCTATGGAAGGGAC
CTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTACATGAAGAGCGGCAATGTGAA
GGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTCCGGAGAATCAGCAA
GGGCTCCGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGACGTGGAGGA
GAATCCAGGACCT (서열번호 93).

[0511]

[0512] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 발현은 데그론 융합 폴리펩타이드에 의해 조절되며 데그론 융합 폴리펩타이드의 억제는 리간드에 의해 화학적으로 유도될 수 있다.

[0513] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 발현은 FRB-데그론 융합 폴리펩타이드에 의해 조절되며, FRB-데그론 융합 폴리펩타이드의 억제는 리간드에 의해 화학적으로 유도될 수 있다.

[0514] 일부 실시양태에서, 리간드는 본원에 기술된 바와 같은 라파마이신 또는 라파로그이다.

[0515] *TGF-β 이중 음성(TGF-β DN)*

[0516] 종양 세포는 암 진행을 허용하면서 면역성을 저해하는 수단으로서 형질전환 성장 인자 β(TGF-β)를 분비한다. T 세포에서 TGF-β 신호전달을 차단하면 항종양 반응을 침윤, 증식 및 매개하는 능력이 증가한다(Kloss 등, Mol. Therapy 26(7):1855-1866 (2018)). 우성-음성 TGF-β(TGF-β DN)는 절두되고 하류 신호전달에 필수적인 세포내 도메인이 부족하다.

[0517] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 우성-음성 TGF-β의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 91과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 우성-음성 TGF-β를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0518] TGF 베타 DN:

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDV
RFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE
DAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLP

[0519] PLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKRRR (서열번호 91).

[0520] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 96과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 우성-음성 TGF-β를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0521] TGF 베타 DN:

ATGGGAAGAGGACTGCTGAGGGGACTGTGGCCACTGCACATCGTGCTGTGGACC
AGGATCGCCTCTACAATCCCACCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAACAATGACATG
ATCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGTG
ACGTGCGCTTTTCCACCTGTGATAACCAGAAGTCCTGCATGTCTAATTGTAGCAT
CACATCCATCTGCGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAGAA
CGACGAGAATATCACCCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCCAAGCTGCCTTATCA
CGACTTCATCCTGGAGGATGCCGCCTCTCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAA
GAAGCCAGGCGAGACCTTCTTTATGTGCAGCTGTTCCTCTGACGAGTGCAACGAT
AATATCATCTTCTCCGAGGAGTACAACACCTCTAATCCTGACCTGCTGCTGGTCA
TCTTTCAGGTGACAGGCATCTCCCTGCTGCCTCCACTGGGCGTGGCCATCTCTGT
GATCATCATCTTTTATTGTTACAGAGTGAACAGGCAGCAGAAGCGCCGGCGCTA

[0522] G (서열번호 96).

[0523] *벡터 게놈*

[0524] *페이로드 플라스미드*

[0525] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 폴리시스트론 전사체 상에서 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0526] (a) MND 프로모터;

[0527] (b) CD19에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 CAR;

[0528] (c) 시토졸 FRB 도메인 또는 이의 부분;

[0529] (d) RACR 세포-표면 수용체; 및

[0530] (e) WPRE 서열

[0531] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0532] (a) CD19에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 CAR;

[0533] (b) 시토졸 FRB 도메인 또는 이의 부분; 및

[0534] (c) RACR 세포-표면 수용체.

[0535] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 35와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0536] MND 프로모터:

GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTC
CTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAG
GATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC
CCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGG
TGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCG
CTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCG

[0537] TTTAGTGAACCGTCAGATCGCTAGC (서열번호 35).

[0538] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 49와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0539] αCD19 CAR_FRB_RACR 렌티바이러스 벡터:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY
TFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSL
PDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVG
GVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG
CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLE
PLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYY
HVFRRISKGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVET
ISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEG
VAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLF
ALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSK
GLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPETGSGA
TNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRL
YFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKS
GNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLER
DKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYS
EEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG
SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAG
PREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV (서열번호 49).

[0540]

[0541] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 61과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0542] αCD19 CAR_FRB_RACR 렌티바이러스 벡터:

ATGCTGCTGCTGGTGACCTCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCTCACCCAGCCTTTCT
GCTGATCCCCGACATCCAGATGACACAGACCACAAGCTCCCTGTCTGCCAGCCTG
GGCGACAGAGTGACCATCTCCTGTAGGGCCTCTCAGGATATCAGCAAGTACCTG
AACTGGTATCAGCAGAAGCCAGATGGCACAGTGAAGCTGCTGATCTACCACACC
TCCAGGCTGCACTCTGGAGTGCCAAGCCGGTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACC
GACTATTCCCTGACAATCTCTAACCTGGAGCAGGAGGATATCGCCACATACTTTT
GCCAGCAGGGCAATACCCTGCCATATACATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGGAGA
TCACCGGATCCACATCTGGAAGCGGCAAGCCAGGAAGCGGAGAGGGATCCACA
AAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGCACCATCCCA
GTCTCTGAGCGTGACCTGTACAGTGTCCGGCGTGTCTCTGCCTGACTACGGCGTG
TCCTGGATCAGGCAGCCACCTAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGG
GGCTCTGAGACCACATACTATAATTCTGCCCTGAAGAGCCGCCTGACCATCATCA
AGGACAACTCCAAGTCTCAGGTGTTTCTGAAGATGAATAGCCTGCAGACCGACG
ATACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTCCTACGCCAT
GGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGTCTAGCGAGTCTAAGTATGG
CCCACCCTGCCCTCCATGTCCAATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGAGGCGTG
CTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATCATCTTCTGGGTGAAGA
GAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCCTTCATGCGCCCTGTGCA
GACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTCGGTTTCCAGAGGAGGAGGAGG
GAGGATGCGAGCTGCGCGTGAAGTTCAGCCGGTCCGCCGATGCCCCTGCCTACC
AGCAGGGCCAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAG
TACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCC
TCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAAGA
TGGCCGAGGCCTATTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGGGGCAAG
GGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACATATGAT
[0543] GCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCTAGGGGATCTGGAGCCACCAACTTTAGCC

TGCTGAAGCAGGCAGGCGATGTGGAGGAGAATCCAGGACCTGAGATGTGGCACG
AGGGACTGGAGGAGGCAAGCAGGCTGTACTTTGGCGAGCGGAATGTGAAGGGC
ATGTTCGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCAATGATGGAGAGGGGACCACAGACC
CTGAAGGAGACATCCTTCAACCAGGCATACGGAAGGGACCTGATGGAGGCACAG
GAGTGGTGCCGGAAGTATATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTGCAGGCC
TGGGATCTGTATTACCACGTGTTTAGAAGGATCAGCAAGGGCTCCGGCGCCACC
AACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAAGAAAATCCAGGACCAATG
CCTCTGGGACTGCTGTGGCTGGGACTGGCCCTGCTGGGCGCCCTGCACGCCCAGG
CCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCAGCCCTGGCGACGGCAGAACCTTTCCAAAGA
GGGGCCAGACATGCGTGGTGCACTACACCGGCATGCTGGAGGATGGCAAGAAGT
TCGACTCCTCTCGCGATCGGAACAAGCCCTTTAAGTTCATGCTGGGCAAGCAGGA
AGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCCAGATGTCTGTGGGCCAGAGGGC
CAAGCTGACAATCAGCCCAGACTATGCATACGGAGCAACCGGACACCCTGGAAT
CATCCCACCACACGCCACACTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGA
GGGCTCTAACACCAGCAAGGAGAATCCATTTCTGTTCGCACTGGAGGCAGTGGT
CATCTCCGTGGGCTCTATGGGCCTGATCATCTCCCTGCTGTGCGTGTACTTTTGGC
TGGAGAGAACAATGCCAAGGATCCCCACCCTGAAGAACCTGGAGGACCTGGTGA
CCGAGTACCACGGCAATTTCAGCGCCTGGTCCGGCGTGTCTAAGGGACTGGCAG
AGTCCCTGCAGCCAGATTATTCTGAGCGGCTGTGCCTGGTGAGCGAGATCCCTCC
AAAGGGAGGCGCCCTGGGAGAGGGACCAGGAGCCAGCCCCTGCAACCAGCACT
CCCCTTACTGGGCCCCCCCTTGTTATACCCTGAAGCCAGAGACAGGCTCTGGCGC
CACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAAGCCGGCGACGTGGAAGAAAACCCAGGACC
AATGGCACTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCA
GCCAGACCCATCCTGTGGCACGAAATGTGGCATGAAGGCCTGGAGGAGGCAAGC
AGACTGTACTTTGGCGAGAGAAATGTGAAAGGAATGTTTGAGGTGCTGGAGCCT

[0544] CTGCACGCCATGATGGAGAGGGGCCCTCAGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAAC

CAGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAGGAGTGGTGCAGGAAGTATATG
AAGAGCGGAAATGTGAAAGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTACCACGTG
TTCCGCCGGATCTCTAAGGGCAAGGATACAATCCCTTGGCTGGGACACCTGCTGG
TGGGACTGAGCGGAGCCTTTGGCTTCATCATCCTGGTGTATCTGCTGATCAACTG
CAGAAATACAGGCCCATGGCTGAAGAAGGTGCTGAAGTGTAACACCCCTGACCC
ATCCAAGTTCTTTTCTCAGCTGAGCTCCGAGCACGGCGGCGATGTGCAGAAGTGG
CTGTCTAGCCCCTTTCCTTCCTCTAGCTTCAGCCCTGGAGGACTGGCACCTGAGAT
CTCCCCACTGGAGGTGCTGGAGAGGGACAAGGTGACCCAGCTGCTGCTGCAGCA
GGATAAGGTGCCAGAGCCCGCCTCCCTGTCCTCTAACCACAGCCTGACCTCCTGC
TTTACAAATCAGGGCTACTTCTTTTTCCACCTGCCAGACGCACTGGAGATCGAGG
CATGTCAGGTGTATTTCACATACGATCCCTATAGCGAGGAGGACCCTGATGAGG
GAGTGGCCGGCGCCCCAACCGGAAGCTCCCCTCAGCCACTGCAGCCACTGAGCG
GAGAGGACGATGCATATTGTACATTTCCTTCCCGCGACGATCTGCTGCTGTTCTC
TCCAAGCCTGCTGGGAGGACCATCTCCACCCAGCACCGCACCTGGAGGATCCGG
GGCAGGGGAGGAGCGGATGCCTCCATCTCTGCAGGAGAGAGTGCCAAGGGACTG
GGATCCACAGCCTCTGGGACCACCTACCCCTGGAGTGCCAGACCTGGTGGATTTC
CAGCCACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGGGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCAGACGCA
GGACCTAGAGAGGGCGTGAGCTTTCCCTGGTCCAGGCCACCAGGACAGGGAGAG
TTCCGCGCCCTGAACGCCCGGCTGCCCCTGAATACAGACGCCTACCTGTCTCTGC
AGGAGCTGCAGGGCCAGGATCCTACCCACCTGGTGTGA (서열번호 61).

[0545]

[0546] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 폴리시스트론 전사체 상에서 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0547] (a) MND 프로모터;

[0548] (b) 시토졸 FRB 도메인 또는 이의 부분;

[0549] (c) RACR 세포-표면 수용체;

[0550] (d) CD19에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 CAR; 및

[0551] (e) WPRE 서열.

[0552] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0553] (a) 시토졸 FRB 도메인 또는 이의 부분;

[0554] (b) RACR 세포-표면 수용체; 및

[0555] (c) CD19에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 CAR.

[0556] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 75와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0557] FRB_RACR_αCD19 CAR 렌티바이러스 벡터

MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL
MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLED
GKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHP
GIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYFWLER
TMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALG
EGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPETGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALL
LPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQ
TLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTI
PWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGD
VQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSC
FTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDD
AYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGP
PTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLN
TDAYLSLQELQGQDPTHLVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMLLLVTSLLLCELPHP
AFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSG
SGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKG
LEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYY
GGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFII
FWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
[0558] MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열번호 75)

[0559] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 81과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0560] FRB_RACR_αCD19 CAR 렌티바이러스 벡터

ATGGAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCAAGCAGACTGTACTTTGGCGAG
AGGAACGTGAAGGGCATGTTCGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCAATGATGGAG
AGGGGACCACAGACCCTGAAGGAGACATCTTTCAACCAGGCATACGGAAGGGAC
CTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTATATGAAGAGCGGCAATGTGAA
GGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAG
GGCTCTGGCGCCACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAGGAG
AATCCTGGACCAATGCCACTGGGACTGCTGTGGCTGGGACTGGCCCTGCTGGGC
GCCCTGCACGCCCAGGCCGGCGTGCAGGTGGAGACAATCAGCCCTGGCGACGGA
CGCACCTTTCCAAAGAGGGGACAGACATGCGTGGTGCACTACACCGGCATGCTG
GAGGATGGCAAGAAGTTCGACAGCTCCAGAGATAGGAATAAGCCCTTTAAGTTC
ATGCTGGGCAAGCAGGAAGTGATCAGGGGATGGGAGGAGGGAGTGGCACAGAT
GTCTGTGGGACAGCGGGCCAAGCTGACAATCAGCCCAGACTATGCATACGGAGC
AACCGGACACCCTGGAATCATCCCACCTCACGCCACACTGGTGTTTGATGTGGAG
CTGCTGAAGCTGGGCGAGGGCAGCAACACCTCCAAGGAGAATCCATTTCTGTTC
GCCCTGGAGGCCGTGGTCATCTCTGTGGGCAGCATGGGCCTGATCATCTCCCTGC
TGTGCGTGTACTTTTGGCTGGAGCGCACAATGCCACGGATCCCCACCCTGAAGAA
CCTGGAGGACCTGGTGACCGAGTACCACGGCAATTTCTCCGCCTGGTCTGGCGTG
AGCAAGGGACTGGCAGAGTCTCTGCAGCCAGATTATAGCGAGCGGCTGTGCCTG
GTGAGCGAGATCCCACCCAAGGGAGGCGCCCTGGGAGAGGGACCAGGAGCCTC
CCCTTGCAACCAGCACTCTCCTTACTGGGCCCCTCCATGTTATACCCTGAAGCCA
GAGACAGGCAGCGGAGCTACTAACTTCTCCCTGCTGAAGCAAGCAGGCGACGTG
GAAGAAAATCCTGGACCAATGGCACTGCCAGTGACCGCCCTGCTGCTGCCTCTG
GCCCTGCTGCTGCACGCAGCCAGACCCATCCTGTGGCACGAAATGTGGCATGAA
GGCCTGGAGGAGGCAAGCAGGCTGTACTTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGAATG
TTTGAAGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGGGGCCCTCAGACCCTG

[0561] AAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTACGGCAGAGACCTGATGGAGGCCCAGGAG

TGGTGCAGGAAGTATATGAAGTCTGGAAATGTGAAAGACCTGCTGCAGGCCTGG
GATCTGTATTATCACGTGTTCAGGCGCATCTCTAAGGGCAAGGATACAATCCCTT
GGCTGGGACACCTGCTGGTGGGACTGAGCGGAGCCTTTGGCTTCATCATCCTGGT
GTATCTGCTGATCAACTGCCGCAATACAGGCCCATGGCTGAAGAAGGTGCTGAA
GTGTAACACCCCCGACCCTTCCAAGTTCTTTTCTCAGCTGTCTAGCGAGCACGGC
GGCGATGTGCAGAAGTGGCTGTCCTCTCCATTTCCCAGCTCCTCTTTCAGCCCAG
GAGGACTGGCACCAGAGATCTCCCCACTGGAGGTGCTGGAGAGGGACAAGGTGA
CCCAGCTGCTGCTGCAGCAGGATAAGGTGCCTGAGCCAGCCTCCCTGAGCTCCA
ACCACTCCCTGACCTCTTGCTTTACAAATCAGGGCTACTTCTTTTTCCACCTGCCA
GACGCACTGGAGATCGAGGCATGTCAGGTGTATTTCACATACGATCCCTATAGCG
AGGAGGACCCTGATGAGGGAGTGGCCGGCGCCCCAACCGGATCTAGCCCACAGC
CTCTGCAGCCACTGAGCGGAGAGGACGATGCATATTGTACATTTCCTTCCCGCGA
CGATCTGCTGCTGTTCTCTCCAAGCCTGCTGGGAGGACCAAGCCCACCTTCCACC
GCACCAGGCGGCTCCGGGGCAGGGGAGGAGCGGATGCCACCCTCTCTGCAGGAG
AGAGTGCCAAGGGACTGGGATCCACAGCCACTGGGACCTCCAACCCCTGGAGTG
CCAGACCTGGTGGATTTCCAGCCCCCTCCAGAGCTGGTGCTGAGAGAGGCAGGA
GAGGAGGTGCCTGACGCAGGACCAAGAGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGGTCCAGG
CCACCTGGACAGGGAGAGTTCAGAGCCCTGAACGCCAGGCTGCCCCTGAATACA
GACGCCTACCTGTCTCTGCAGGAGCTGCAGGGCCAGGATCCTACACACCTGGTCG
GATCTGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGACGTGGAAGAGA
ACCCTGGACCAATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCACA
CCCTGCCTTCCTGCTGATCCCAGATATCCAGATGACACAGACCACATCCTCTCTG
TCCGCCTCTCTGGGCGACAGAGTGACCATCTCTTGTAGGGCCAGCCAGGATATCT
CCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCTGACGGCACAGTGAAGCTGCTGA
TCTACCACACCTCTAGGCTGCACAGCGGAGTGCCATCCCGGTTCAGCGGATCCGG
[0562] ATCTGGAACAGACTATTCTCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATATCGC

CACATACTTTTGCCAGCAGGGCAATACCCTGCCATATACATTCGGCGGAGGAACC
AAGCTGGAGATCACCGGAAGCACATCCGGATCTGGCAAGCCAGGATCCGGAGAG
GGATCTACAAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCAGGACTGGTGGC
ACCCAGCCAGTCCCTGTCTGTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCCGAT
TACGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCACCAAGGAAGGGACTGGAGTGGCTGGGC
GTGATCTGGGGCTCTGAGACCACATACTATAATAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGA
CCATCATCAAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTTCTGAAGATGAATAGCCTGC
AGACCGACGATACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGGCTC
CTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCCGAGTCT
AAGTATGGCCCTCCATGCCCCCCTTGTCCTATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTGG
GAGGCGTGCTGGCCTGTTACTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTTATCATCTTCTGG
GTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTTAAGCAGCCCTTCATGAGA
CCTGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTTCCAGAGGAG
GAGGAGGGAGGATGCGAGCTGCGCGTGAAGTTCTCTCGGAGCGCCGATGCCCCT
GCCTACCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGA
GAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGAGACCCAGAGATGGGAGG
CAAGCCTCGGAGAAAGAACCCACAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGG
ACAAGATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGGCGCCGG
GGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGGACACC
[0563] TATGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCAGGTGA (서열번호 81).

[0564] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 폴리시스트론 전사체 상에 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0565] (a) MND 프로모터;

[0566] (b) 시토졸 FRB 도메인 또는 이의 부분;

[0567] (c) CD19에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 CAR;

[0568] (d) TGF-β DN 도메인 또는 이의 부분; 및

[0569] (e) WPRE 서열.

[0570] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0571] (a) 시토졸 FRB 도메인 또는 이의 부분;

[0572] (b) CD19에 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 CAR; 및

[0573] (c) TGF-β DN 도메인 또는 이의 부분.

[0574] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 87과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0575] FRB_αCD19 CAR_TGFbDN 렌티바이러스 벡터

MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDL
MEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGSGATNFSLLKQAGDVEEN
PGPMLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLN
WYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGN
TLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKM
NSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSESKYGPPCPPCPMFWVL
VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG
KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIP
PHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCS
SDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYCYRVNRQQKRRR

[0576] (서열번호 87).

[0577] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 92와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0578] FRB_αCD19 CAR_TGFbDN 렌티바이러스 벡터

ATGGAGATGTGGCACGAGGGACTGGAGGAGGCATCCAGACTGTACTTCGGCGAG
AGGAACGTGAAGGGCATGTTTGAGGTGCTGGAGCCACTGCACGCCATGATGGAG
AGAGGCCCCCAGACCCTGAAGGAGACATCTTTCAACCAGGCCTATGGAAGGGAC
CTGATGGAGGCACAGGAGTGGTGCCGGAAGTACATGAAGAGCGGCAATGTGAA
GGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCTGTACTATCACGTGTTCCGGAGAATCAGCAA
GGGCTCCGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAGCAGGCAGGCGACGTGGAGGA
GAATCCAGGACCTATGCTGCTGCTGGTGACATCCCTGCTGCTGTGCGAGCTGCCA
CACCCAGCCTTCCTGCTGATCCCCGATATCCAGATGACCCAGACCACAAGCTCCC
TGAGCGCCTCCCTGGGCGACAGGGTGACAATCTCTTGTCGGGCCAGCCAGGATA
TCTCCAAGTATCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGC
TGATCTATCACACATCTAGACTGCACAGCGGCGTGCCTTCCAGGTTTTCTGGCAG
CGGCTCCGGCACCGACTACTCTCTGACAATCAGCAACCTGGAGCAGGAGGATAT
CGCCACCTATTTCTGCCAGCAGGGCAATACCCTGCCTTACACATTTGGCGGCGGC
ACAAAGCTGGAGATCACCGGCTCTACAAGCGGATCCGGCAAGCCAGGATCCGGA
GAGGGATCTACCAAGGGAGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCTGGACTGGT
GGCACCATCTCAGAGCCTGTCCGTGACCTGTACAGTGTCTGGCGTGAGCCTGCCA
GATTATGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCACCTAGGAAGGGACTGGAGTGGCTG
GGCGTGATCTGGGGCTCCGAGACCACATACTATAACAGCGCCCTGAAGTCCCGC
CTGACCATCATCAAGGACAACTCTAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAGATGAATTCCC
TGCAGACCGACGATACAGCCATCTACTATTGCGCCAAGCACTACTATTACGGCGG
CTCTTATGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGCGA
GTCCAAGTACGGCCCACCCTGCCCTCCATGTCCCATGTTTTGGGTGCTGGTGGTG
GTGGGAGGCGTGCTGGCCTGTTATTCCCTGCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCT
TTTGGGTGAAGCGCGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCAT
GAGACCCGTGCAGACCACACAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCCAGA
[0579] GGAGGAGGAGGGAGGATGCGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCCCGGTCTGCCGATGC

CCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCAG
GCGCGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGAGGAAGGGACCCTGAGATGG
GAGGCAAGCCAAGGCGCAAGAACCCTCAGGAGGGCCTGTATAATGAGCTGCAG
AAGGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGCGGAG
AAGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACAAAGG
ACACCTACGATGCACTGCACATGCAGGCCCTGCCACCTAGAGGATCTGGAGCCA
CAAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGATGTGGAGGAGAATCCTGGACCAA
TGGGAAGAGGACTGCTGAGGGGACTGTGGCCACTGCACATCGTGCTGTGGACCA
GGATCGCCTCTACAATCCCACCCCACGTGCAGAAGAGCGTGAACAATGACATGA
TCGTGACCGATAACAATGGCGCCGTGAAGTTTCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGTGA
CGTGCGCTTTTCCACCTGTGATAACCAGAAGTCCTGCATGTCTAATTGTAGCATC
ACATCCATCTGCGAGAAGCCTCAGGAGGTGTGCGTGGCCGTGTGGCGGAAGAAC
GACGAGAATATCACCCTGGAGACAGTGTGCCACGATCCCAAGCTGCCTTATCAC
GACTTCATCCTGGAGGATGCCGCCTCTCCTAAGTGTATCATGAAGGAGAAGAAG
AAGCCAGGCGAGACCTTCTTTATGTGCAGCTGTTCCTCTGACGAGTGCAACGATA
ATATCATCTTCTCCGAGGAGTACAACACCTCTAATCCTGACCTGCTGCTGGTCAT
CTTTCAGGTGACAGGCATCTCCCTGCTGCCTCCACTGGGCGTGGCCATCTCTGTG
ATCATCATCTTTTATTGTTACAGAGTGAACAGGCAGCAGAAGCGCCGGCGCTAG

[0580] (서열번호 92).

[0581] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0582] (a) RSV 프로모터, (b) 5' LTR, (c) HIV-1 패키징 신호(Psi), (d) HIV-1의 Rev 반응 요소(RRE), (e) gp41 펩타이드, (f) cPPT/CTS, (g) MND 프로모터, (h) CMV2 연장, (i) 인간 CSF2R 신호 펩타이드, (j) 항-CD19 scFv, (k) IgG4 힌지 도메인, (l) 인간 CD28 막관통 도메인, (m) 41BB, (n) CD3ζ, (o) P2A, (p) 시토졸 FRB 도메인, (q) P2A, (r) 호중구 젤라티나제-연관 리포칼린, ER 신호전달 도메인, (s) FKBP12, (t) IL2RG, (u) 막관통 도메인, (v) 세포질 도메인, (w) P2A, (x) CD8a 신호 펩타이드, (y) Frb(DmrC) [T2098L 돌연변이], (z) IL2RB, (aa) 막관통 도메인, (bb) 세포질 도메인, (cc) WPRE, 및 (dd) 3' LTR, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 121과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0583] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 121과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0584] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0585] (a) 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 인핸서 및 CMV 프로모터, (b) HIV-1의 5' LTR, (c) HIV-1 패키징 신호(Psi), (d) HIV-1의 Rev 반응 요소(RRE), (e) HIV-1의 중심 폴리퓨린 트랙 및 중심 종결(cPPT/CTS) 서열, (f) MND 프로모터 (g) 인간 CSF2R 신호 펩타이드, (h) 항-CD19 scFv, (i) IgG4 힌지 도메인, (j) 인간 CD28 막관통 도메인, (k) 인간 CD28 막관통 도메인, (l) 41BB 도메인, (m) CD3ζ, (n) P2A, (o) 시토졸 FRB 도메인, (p) P2A, (q) 호중구 젤라티나제-연관 리포칼린, ER 신호전달 도메인, (r) FKBP12, (s) IL2RG, (t) 막관통 도메인, (u) 세포질 도메인, (v) P2A, (w) CD8a 신호 펩타이드, (x) Frb(DmrC) [T2098L 돌연변이], (y) IL2RB, (z) 막관통 도메인, (aa) 세포질 도메인, (bb) 3' LTR, 및 (cc) 합성 polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 122와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0586] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 122와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0587] *헬퍼 플라스미드*

[0588] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 폴리시스트론 전사체 상에서 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0589] (a) gag 단백질; 및

[0590] (b) Pol 단백질.

[0591] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 99와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 gag 단백질 아미노산 서열을 포함한다.

[0592] gag:

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEG
CRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKK
AQQAAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIP
MFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAP
GQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTHNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILD
IRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPG
ATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTNPATIMIQKGNFRNQRKTVKCFNC
GKEGHIAKNCRAPRKKGCWKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQ

[0593] SRPEPTAPPEESFRFGEETTTPSQKQEPIDKELYPLASLRSLFGSDPSSQ (서열번호 99)

[0594] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 100과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Pol 단백질 아미노산 서열을 포함한다.

[0595] Pol:

FFREDLAFPQGKAREFSSEQTRANSPTRRELQVWGRDNNSLSEAGADRQGTVSFSFP
QITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGIGGFIKVRQ
YDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNFPISPIETVPVKLKPGMDGP
KVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDF
RELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKQKKSVTVLDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPS
INNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQCSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLYVGSD
LEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEK
DSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYAGIKVRQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEAELELAE
NREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGQWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMKGAH
TNDVKQLTEAVQKIATESIVIWGKTPKFKLPIQKETWEAWWTEYWQATWIPEWEFV
NTPPLVKLWYQLEKEPIIGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTDRGRQKVVPLTDTT
NQKTELQAIHLALQDSGLEVNIVTDSQYALGIIQAQPDKSESELVSQIIEQLIKKEKVY
LAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSAGIRKVLFLDGIDKAQEEHEKYHSNWRAMASDFN
LPPVVAKEIVASCDKCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVILVAVHVASGY
IEAEVIPAETGQETAYFLLKLAGRWPVKTVHTDNGSNFTSTTVKAACWWAGIKQEF
GIPYNPQSQGVIESMNKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGGYSA
GERIVDIIATDIQTKELQKQITKIQNFRVYYRDSRDPVWKGPAKLLWKGEGAVVIQD

[0596] NSDIKVVPRRKAKIIRDYGKQMAGDDCVASRQDED (서열번호 100)

[0597] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 101과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 gag-pol 핵산 서열을 포함한다.

[0598] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 124와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도

95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 gag-pol 핵산 서열을 포함한다.

[0599] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0600] (a) 인간 CMV 인핸서 및 CMV 프로모터, (b) 인간 베타-글로빈 인트론, (c) HIV-1 gag, (d) HIV-1 pol, (d) cPPT/CTS, (e) RRE, (f) 베타-글로빈 polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 131과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0601] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 131과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 gag-pol 핵산 서열을 포함한다.

[0602] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 102와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Rev 단백질 아미노산 서열을 포함한다.

[0603] Rev 단백질:

MAGRSGDSDEDLLKAVRLIKFLYQSNPPPNPEGTRQARRNRRRRWRERQRQIHSISE
RILSTYLGRSAEPVPLQLPPLERLTLDCNEDCGTSGTQGVGSPQILVESPTILESGAKE*

[0604] (서열번호 102)

[0605] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 103과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Rev 핵산 서열을 포함한다.

[0606] Rev 핵산 서열:

ATGGCCGGCAGAAGCGGCGACAGCGACGAGGATCTGCTGAAAGCCGTGCGGCTG
ATCAAGTTCCTGTACCAGAGCAACCCTCCTCCTAACCCCGAGGGCACCAGACAG
GCTAGACGGAACCGCAGAAGAAGGTGGCGGGAACGGCAAAGACAGATCCACTC
TATCAGCGAGAGAATCCTGAGCACCTACCTGGGAAGATCCGCCGAGCCTGTCCC
CCTGCAGCTGCCTCCACTGGAAAGACTGACCCTGGATTGTAATGAGGACTGCGG
CACAAGCGGAACCCAGGGCGTGGGCAGCCCCCAGATTCTGGTGGAATCCCCTAC

[0607] AATCCTCGAGTCTGGCGCCAAGGAATGA (서열번호 103)

[0608] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 125와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Rev 핵산 서열을 포함한다.

[0609] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0610] (a) RSV 프로모터, (b) HXB3 Rev, (c) HIV-1 polyA LTR 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 132와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0611] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 132와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 gag-pol 핵산 서열을 포함한다.

[0612] *Cocal 외피 플라스미드*

[0613] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 Cocal 외피, 항-CD3 scFv를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0614] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 128과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 Cocal 외피 및 항-CD3 scFv 핵산 서열을 포함한다.

[0615] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0616] (a) MND 프로모터;

[0617] (b) CD8 유래 신호 펩타이드;

[0618] (c) 항-CD3 scFv;

[0619] (d) CD8 유래 힌지;

[0620] (e) CD4 유래 막관통 도메인 및 세포질 꼬리;

[0621] (f) T2A;

[0622] (g) Cocal 외피;

[0623] (h) WPRE; 및

[0624] (i) polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 128과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0625] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0626] (a) 인간 CMV 인핸서 및 CMV 프로모터, (b) 인간 베타-글로빈 인트론, (c) 항-CD3 scFv, (d) Cocal 외피, (d) 막관통 도메인, (e) 세포질 꼬리 도메인, (f) T2A 펩타이드, (g) BGH polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 129와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0627] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 129와 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0628] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0629] (a) 인간 CMV 인핸서 및 CMV 프로모터, (b) 인간 베타-글로빈 인트론, (c) Cocal 외피, (d) 막관통 도메인, (e) 세포질 꼬리 도메인, (f) 소 성장 호르몬 폴리아데닐화(BGH polyA) 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 123과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0630] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 123과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0631] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0632] (a) MND 프로모터, (b) Cocal 외피, (c) 막관통 도메인, (d) 세포질 꼬리 도메인, (e) WPRE, (f) BGH polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 130과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0633] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 130과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 핵산 서열을 포함한다.

[0634] *항-CD3 플라스미드*

[0635] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 126과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 핵산 서열을 포함한다.

[0636] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0637] (a) 인간 CMV 인핸서 및 CMV 프로모터, (b) 인간 베타-글로빈 인트론, (c) 가우시아 luc 신호 펩타이드, (d) 항-CD3 VL 사슬, (e) G4S 링커, (f) 항-CD3 VH 사슬, (g) 힌지 도메인, (h) 막관통 도메인, (i) 세포질 꼬리 도메인, (j) BGH polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 126과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0638] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 서열번호 127과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 동일성을 공유하는 항-CD3 핵산 서열을 포함한다.

[0639] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자는 5'에서 3' 순서로 하기를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다:

[0640] (a) 인간 CMV 인핸서 및 CMV 프로모터, (b) 인간 베타-글로빈 인트론, (c) 가우시아 luc 신호 펩타이드, (d) 항-CD3 VL 사슬, (e) G4S 링커, (f) 항-CD3 VH 사슬, (g) 글리코포린 A 막관통 도메인, (h) 글리코포린 A 세포질 꼬리 도메인, (i) BGH polyA 신호, 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열번호 127과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일성을 공유한다.

[0641] *유전자 편집*

[0642] 수많은 유전자 편집 방법은 관련 기술분야에 알려져 있으며 추가 방법이 지속적으로 만들어지고 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물은 표적 세포의 게놈 및/또는 유전자 편집 시스템(CRISPR-Cas, 메가뉴클레아제, 귀소 엔도뉴클레아제, 징크 핑거 효소 및 등)에 삽입하기 위해 의도된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 다양한 유전자 페이로드를 전달할 수 있다. 실시양태에서, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 전이유전자), 효소 및/또는 가이드 RNA는 동일한 유형(예를 들어, 렌티바이러스, AAV 등) 또는 상이한 유형(예를 들어, 비-바이러스 및 바이러스 벡터 또는 상이한 유형의 바이러스 벡터의 조합)의 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 벡터에서 전달된다. 본 개시내용의 방법 및 시스템은 점 돌연변이(들), 삽입, 결실 등을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 무작위 돌연변이유발 및 다중-유전자좌 유전자 편집도 본 개시내용의 범위 내에 있다.

[0643] ***표적 면역 세포***

[0644] 본원에 기재된 바이러스 입자의 표적일 수 있는 세포의 비제한적 예로는 T 림프구, 수지상 세포(DC), Treg 세포, B 세포, 자연 살해 세포 및 대식세포를 포함한다.

[0645] *T 세포*

[0646] T 세포("T 림프구")는 세포-매개 면역에서 중심 역할을 하는 림프구의 한 유형(그 자체가 백혈구의 한 유형)이다. 각각 고유한 기능을 가진 T 세포의 여러 하위집합이 있다. T 세포는 세포 표면에 있는 T 세포 수용체(TCR)의 존재에 의해 B 세포 및 NK 세포와 같은 다른 림프구와 구별될 수 있다. TCR은 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 데 역할을 하며 2개의 상이한 단백질 사슬로 구성된다. T 세포의 95%에서 TCR은 알파(α) 및 베타(β) 사슬로 이루어진다. TCR이 항원성 펩타이드 및 MHC(펩타이드/MHC 복합체)와 체결되는 경우, T 림프구는 연관 효소, 공동수용체, 특화된 어댑터 분자, 및 활성화되거나 방출된 전사 인자에 의해 매개되는 일련의 생화학적 이벤트를 통해 활성화된다.

[0647] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 사용되는 세포는 1차 T 림프구(예를 들어, 1차 인간 T 림프구)이다. 본원에 제공된 방법에 사용되는 1차 T 림프구는 나이브 T 림프구 또는 MHC-제한 T 림프구일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 림프구는 CD4+이다. 다른 실시양태에서, T 림프구는 CD8+이다. 일부 실시양태에서, 1차 T 림프구는 종양 침윤 림프구(TIL)이다. 일부 실시양태에서, 1차 T 림프구는 종양 생검으로부터 단리되었거나 종양 생검으로부터 단리된 T 림프구로부터 확장되었다. 일부 실시양태에서, 1차 T 림프구는 말초 혈액, 제대혈 또는 림프로부터 단리되었거나, 또는 단리된 T 림프구로부터 확장된다. 일부 실시양태에서, T 림프구는 특정 개체, 예를 들어 상기 T 림프구의 수용자에 대해 동종이계이다. 특정 다른 실시양태에서, T 림프구는 특정 개체, 예를 들어 상기 T 림프구의 수용자에 대해 동종이계가 아니다. 일부 실시양태에서, T 림프구는 특정 개체, 예를 들어 상기 T 림프구의 수용자에 대해 자가 유래이다.

[0648] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 사용되는 1차 T 림프구는 종양으로부터 단리되며, 예를 들어 종양-침윤 림프구이다. 일부 실시양태에서, 이러한 T 림프구는 종양 특이적 항원(TSA) 또는 종양 연관 항원(TAA)에 대해 특이적이다. 일부 실시양태에서, 1차 T 림프구는 개체로부터 수득되고, 선택적으로 확장된 다음, 본원에 기재된 방법을 사용하여 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산에 의해 형질도입되고, 선택적으로 그 다음 확장된다. T 림프구는 예를 들어, CD3 및/또는 CD28에 대한 항체, 예를 들어 비드 또는 세포 배양 플레이트의 표면에 부착된 항체와 배양물 중의 T 림프구를 접촉시킴으로써 확장될 수 있다; 예를 들어, 미국 특허 제5,948,893호; 제6,534,055호; 제6,352,694호; 제6,692,964호; 제6,887,466호; 및 제6,905,681호를 참조한다. 일부 실시양태에서, 항체는 항-CD3 및/또는 항-CD28이고, 항체는 고체 표면에 결합되지 않는다(예를 들어, 항체는 용액에서 T 림프구와 접촉함). 일부 실시양태에서, 항-CD3 항체 또는 항-CD28 항체 중 어느 하나는 고체 표면(예를 들어, 비드, 조직 배양 접시 플라스틱)에 결합되고, 다른 항체는 고체 표면에 결합되지 않는다(예를 들어, 용액에 존재함).

[0649] *NK 세포*

[0650] 자연 살해(NK) 세포는 선천적 면역계의 주요 구성요소를 구성하는 세포독성 림프구이다. NK 세포는 전형적으로 정상 말초 혈액에서 단핵 세포 분율의 대략 10 내지 15%를 포함한다. NK 세포는 인간에서 T-세포 항원 수용체(TCR), CD3 또는 표면 면역글로불린(Ig) B 세포 수용체를 발현하지 않지만, 일반적으로 표면 마커 CD16(FcγRIII) 및 CD56을 발현한다. NK 세포는 세포독성이다; 이들의 세포질에서 작은 과립은 그랜자임으로 알려진 프로테아제 및 퍼포린과 같은 특수 단백질을 함유한다. 사멸이 예정된 세포에 매우 가깝게 방출 시, 퍼포린은 표적 세포의 세포막에 그랜자임과 연관 분자가 들어갈 수 있는 소공을 형성하여 아폽토시스를 유도한다. 그랜자임 중 하나인 그랜자임 B(그랜자임 2 및 세포독성 T-림프구-연관 세린 에스테라아제 1로도 알려짐)는 세포-매개 면역 반응에서 표적 세포 아폽토시스의 신속한 유도에 중대한 세린 프로테아제이다.

[0651] NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 반응하여 활성화된다. 활성화된 NK 세포는 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포로 지칭된다. NK 세포는 세포의 세포독성 활성을 제어하는 "활성화 수용체" 및 "저해 수용체"로 표지된 2가지 유형의 표면 수용체를 보유한다.

[0652] 다른 활성 중에서, NK 세포는 종양의 숙주 거부에 역할을 한다. 많은 암세포는 클래스 I MHC 발현의 감소 또는 부재를 갖기 때문에, 이들은 NK 세포의 표적이 될 수 있다. 자연 살해 세포는 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 단백질이 부족하거나 감소된 수준을 전시하는 세포에 의해 활성화될 수 있다. 직접적인 세포독성 사멸에 관여하는 것 외에도 NK 세포는 암 및 감염을 제어하는 데 중요할 수 있는 사이토카인 생산에 역할을 하기도 한다. 활성화 및 확장된 NK 세포 및 LAK 세포는 백혈병과 같은 골수 관련 질환; 유방암, 및 특정 유형의 림프종에 대한 일부 성공을 거두면서, 진행성 암 환자의 생체외 요법 및 생체내 치료 모두에 사용되고 있다.

[0653] *면역 세포 활성화*

[0654] 일부 실시양태에서, 대상체에게 입자의 투여는 면역 세포의 활성화를 초래한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 면역 세포 및 특정 항원을 발현하는 세포 모두에 대한 CAR의 결합에 의해 매개된다.

[0655] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 하나 이상의 세포 마커의 수준에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 하나 이상의 세포 마커에 대해 양성인 면역 세포의 백분율에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포(T 림프구) 또는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포 마커는 CD71, CD25 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0656] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 CD71 양성인 면역 세포의 백분율에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 투여는 CD71+ 면역 세포의 백분율을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 면역 세포의 표면에서 발현되는 CD71의 수준에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 투여는 면역 세포의 표면에서 발현되는 CD71의 수준을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 5배, 적어도 7배, 또는 적어도 10배 증가시킨다.

[0657] 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 CD25 양성인 면역 세포의 백분율에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 투여는 CD25+ 면역 세포의 백분율을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 활성화는 면역 세포의 표면에서 발현되는 CD25의 수준에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 투여는 면역 세포의 표면에서 발현되는 CD25의 수준을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 5배, 적어도 7배, 또는 적어도 10배 증가시킨다.

[0658] 일부 실시양태에서, 대상체에서 바이러스 입자의 투여는 면역 세포의 활성 증식을 초래한다. 일부 실시양태에서, 면역 세포의 증식은 벡터에 의한 형질도입에 대한 수 및/또는 감수성을 증가시킨다.

[0659] 일부 실시양태에서, 대상체에서 바이러스 입자의 투여는 G0 단계에서 면역 세포(예를 들어, T 세포) 수의 감소 및/또는 비-G0 단계에서 면역 세포(예를 들어, T 세포) 수의 증가를 초래한다.

[0660] 일부 실시양태에서, 대상체에서 바이러스 입자의 투여는 벡터의 형질도입을 위해 대사 적합성 상태에 있는 면역 세포의 수 및/또는 백분율을 증가시킨다.

[0661] 일부 실시양태에서, 대상체에서 바이러스 입자의 투여는 림프절에 면역 세포의 축적을 초래한다. 일부 실시양태에서, 대상체에 바이러스 입자의 투여는 종양 부위에 면역 세포의 축적을 초래한다.

[0662] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 여기서 CAR의 적어도 하나의 항원-특이적 결합 도메인에 의해 인식될 수 있는 생체내 면역 세포의 하위집합이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 림프절에 존재한다.

[0663] *투여량 형태 및 투약 요법*

[0664] *바이러스 입자*

[0665] 바이러스 입자는 임의의 유효 투여량으로 생체내에서 세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 치료를 필요로 하는 세포, 조직, 기관 또는 대상체에 직접 주사함으로써 생체내 대상체에게 투여된다.

[0666] 바이러스 입자는 또한 바이러스 역가(TU/mL)에 따라 전달될 수 있다. 직접 주사된 렌티바이러스의 양은 총 TU에 의해 결정되며 주사되는 조직의 유형 및 부위에 실행 가능하게 주사될 수 있는 부피 모두에 기초하여 변동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전달되는 바이러스 역가는 주사당 약 1×10^{5} 내지 1×10^{6}, 약 1×10^{5} 내지 1×10^{7}, 1×10^{5} 내지 1×10^{7}, 약 1×10^{6} 내지 1×10^{9}, 약 1×10^{7} 내지 1×10^{10}, 약 1×10^{7} 내지 1×10^{11}, 또는 약 1×10^{9} 내지 1×10^{11} TU 또는 그 이상이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전달되는 바이러스 역가는 주사당 약 1×10^{6} 내지 1×10^{7}, 약 1×10^{6} 내지 1×10^{8}, 1×10^{6} 내지 1×10^{9}, 약 1×10^{7} 내지 1×10^{10}, 약 1×10^{8} 내지 1×10^{11}, 약 1×10^{8} 내지 1×10^{12}, 또는 약 1×10^{10} 내지 1×10^{12} 또는 그 이상이 사용될 수 있다. 예를 들어, 뇌 주사 부위는 주사될 바이러스를 극소량만 허용할 수 있어서, 높은 역가의 제제가 바람직할 것이며, 주사당 약 1×10^{6} 내지 1×10^{7}, 약 1×10^{6} 내지 1×10^{8}, 1×10^{6} 내지 1×10^{9}, 약 1×10^{7} 내지 1×10^{10}, 약 1×10^{8} 내지 1×10^{11}, 약 1×10^{8} 내지 1×10^{12}, 또는 약 1×10^{10} 내지 1×10^{12} 또는 그 이상이 사용될 수 있다. 하지만, 전신 전달은 더 많은 TU를 수용할 수 있으며, 약 1×10^{8}, 약 1×10^{9}, 약 1×10^{10}, 약 1×10^{11}, 약 1×10^{12}, 약 1×10^{13}, 약 1×10^{14}, 또는 약 1×10^{15}의 부하량이 전달될 수 있다.

[0667] 일부 실시양태에서, 벡터는 대상체의 전체 체질량의 킬로그램(vg)당 벡터의 약 1×10^{12} 내지 5×10^{14} 벡터 게놈(vg) 사이의 용량(vg/kg)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 1×10^{13} 내지 5×10^{14} vg/kg 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 5×10^{13} 내지 3×10^{14} vg/kg 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 5×10^{13} 내지 1×10^{14} vg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 1×10^{12} vg/kg 미만, 약 3×10^{12} vg/kg 미만, 약 5×10^{12} vg/kg 미만, 약 7×10^{12} vg/kg 미만, 약 1×10^{13} vg/kg 미만, 약 3×10^{13} vg/kg 미만, 약 5×10^{13} vg/kg 미만, 약 7×10^{13} vg/kg 미만, 약 1×10^{14} vg/kg 미만, 약 3×10^{14} vg/kg 미만, 약 5×10^{14} vg/kg 미만, 약 7×10^{14} vg/kg 미만, 약 1×10^{15} vg/kg 미만, 약 3×10^{15} vg/kg 미만, 약 5×10^{15} vg/kg 미만, 또는 약 7×10^{15} vg/kg 미만의 용량으로 투여된다.

[0668] 일부 실시양태에서, 벡터는 대상체의 전체 체질량의 킬로그램(vp)당 벡터의 약 1×10^{12} 내지 5×10^{14} 벡터 입자(vp)의 용량(vp/kg)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 1×10^{13} 내지 5×10^{14} vp/kg 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 5×10^{13} 내지 3×10^{14} vp/kg 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 5×10^{13} 내지 1×10^{14} vp/kg 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 약 1×10^{12} vp/kg 미만, 약 3×10^{12} vp/kg 미만, 약 5×10^{12} vp/kg 미만, 약 7×10^{12} vp/kg 미만, 약 1×10^{13} vp/kg 미만, 약 3×10^{13} vp/kg 미만, 약 5×10^{13} vp/kg 미만, 약 7×10^{13} vp/kg 미만, 약 1×10^{14} vp/kg 미만, 약 3×10^{14} vp/kg 미만, 약 5×10^{14} vp/kg 미만, 약 7×10^{14} vp/kg 미만, 약 1×10^{15} vp/kg 미만, 약 3×10^{15} vp/kg 미만, 약 5×10^{15} vp/kg 미만, 또는 약 7×10^{15} vp/kg 미만의 용량으로 투여된다.

[0669] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자의 투여는 대상체에서 B 세포의 수를 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 7%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 감소는 바이러스 입자가 투여된 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12주 후에 B 세포 수에 의해 평가되며, 여기서 기준 숫자는 비히클 대조군이 투여된 대상체에서의 B 세포의 수이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 입자의 투여는 대상체의 B 세포 수를 적어도 95% 감소시킨다.

[0670] 일부 실시양태에서, B 세포는 대상체의 말초혈액에 존재한다. 일부 실시양태에서, B 세포는 대상체의 골수에 있다. 일부 실시양태에서, B 세포는 대상체의 비장에 있다.

[0671] 일부 실시양태에서, B 세포는 바이러스 입자를 투여한 후 적어도 7일, 적어도 10일, 적어도 20일, 적어도 30일, 적어도 40일, 적어도 50일, 적어도 60일, 적어도 70일, 또는 적어도 80일 동안 대상체에서 고갈된다.

[0672] 일부 실시양태에서, B 세포는 바이러스 입자를 투여한 후 적어도 80일 동안 대상체에서 고갈된다.

[0673] *라파마이신*

[0674] Rapamune®(시롤리무스, 라파마이신)은 경구 용액 또는 정제로 이용 가능하며 다음 적응증에 대해 FDA 승인을 받았다:

[0675] - 신장 이식 시 기관 거부 예방

[0676] - 신장 이식에 사용 제한

[0677] - 림프관평활근종증 환자의 치료

[0678] 미국 처방 정보(USPI)에 따라, 라파마이신은 1 mg/mL 경구 용액 또는 0.5, 1 또는 2mg 정제로 이용가능하고 1일 1회 투여되어야 한다. 라파마이신은 또한 다른 투여 형태로 및/또는 다른 투여 경로에 의해 전달될 수 있다.

[0679] 일부 실시양태에서, 라파마이신은 대상체 표면적의 약 0.1 mg/m² 내지 100 mg/m² 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.5 mg/m² 내지 50 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.5 mg/m² 내지 10 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.5 mg/m² 내지 3 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.5 mg/m² 내지 5 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 1 mg/m² 내지 5 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 2 mg/m² 내지 6 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 1 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 2 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 3 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 2 mg/m² 내지 6 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 3 mg/m² 내지 9 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 4 mg/m² 내지 12 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 5 mg/m² 내지 15 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 6 mg/m² 내지 20 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 10 mg/m² 내지 50 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신의 용량은 24시간 기간 내의 총 용량이다.

[0680] 일부 실시양태에서, 라파마이신은 대상체의 표면적의 약 0.001 mg/m² 내지 100 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.001 mg/m² 내지 0.1 mg/m² , 약 0.01 mg/m² 내지 1 mg/m² , 약 0.1 mg/m² 내지 10 mg/m² , 약 1 mg/m² 내지 100 mg/m² , 약 0.001 mg/m² 및 0.05 mg/m² , 약 0.005 mg/m² 및 0.25 mg/m² , 약 0.01 mg/m² 내지 0.5 mg/m² , 약 0.05 mg/m² 내지 2.5 mg/m² , 약 0.1 mg/m² 내지 5 mg/m² , 약 0.5 mg/m² 내지 25 mg/m² , 약 1 mg/m² 내지 50 mg/m² , 약 2 mg/m² 내지 100mg/m² , 약 0.001mg/m² 내지 0.01 mg/m² , 약 0.005 mg/m² 내지 0.05mg/m² , 약 0.01 mg/m² 내지 0.1 mg/m² , 약 0.05 mg/m² 내지 0.5 mg/m² , 약 0.1 mg/m² 내지 1 mg/m² , 약 0.5 mg/m² 내지 5 mg/m² , 약 1 mg/m² 내지 10mg/m² , 약 5 mg/m² 내지 50 mg/m² , 약 10 mg/m² 내지 100 mg/m² , 예컨대 이들 사이의 모든 범위 및 하위범위의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.001 mg/m² 내지 0.005 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.002 mg/m² 내지 0.01 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.003 mg/m² 내지 0.015 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.004 mg/m² 내지 0.02 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.005 mg/m² 내지 0.025 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.006 mg/m

^{2} 내지 0.03 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.007 mg/m^2 내지 0.035 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.008 mg/m^2 내지 0.04 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.009 mg/m^2 내지 0.045 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.01 mg/m^2 내지 0.05 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.02 mg/m^2 내지 0.1 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.03 mg/m^2 내지 0.15 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.04 mg/m^2 내지 0.2 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.05 mg/m^2 내지 0.25 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.06 mg/m^2 내지 0.3 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.07 mg/m^2 내지 0.35 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.08 mg/m^2 내지 0.4 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.09 mg/m^2 내지 0.45 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.1 mg/m^2 내지 0.5 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.2 mg/m^2 내지 1 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.3 mg/m^2 내지 1.5 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.4 mg/m^2 내지 2 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.5mg/m^2 내지 2.5mg/m^2 사이의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.6 mg/m^2 내지 3 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.7 mg/m^2 내지 3.5 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.8 mg/m^2 내지 4 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.9 mg/m^2 내지 4.5 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 1 mg/m^2 내지 5 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 2 mg/m^2 내지 10 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 3 mg/m^2 내지 15 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 4 mg/m^2 내지 20 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 5 mg/m^2 내지 25 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 6 mg/m^2 내지 30 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 7 mg/m^2 내지 35 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 8 mg/m^2 내지 40 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 9 mg/m^2 내지 45 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 10 mg/m^2 내지 50 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 20 mg/m^2 내지 100 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.001 mg/m^2 내지 0.02 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.002 mg/m^2 내지 0.04 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.003 mg/m^2 내지 0.06 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.004 mg/m^2 내지 0.08 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.005 mg/m^2 내지 0.1 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.006 mg/m^2 내지 0.12 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.007 mg/m^2 내지 0.14 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.008 mg/m^2 내지 0.16 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.009 mg/m^2 내지 0.18 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.01 mg/m^2 내지 0.2 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.02 mg/m^2 내지 0.4 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.03 mg/m^2 내지 0.6 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.04 mg/m^2 내지 0.8 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.05 mg/m^2 내지 1 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.06 mg/m^2 내지 1.2 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.07 mg/m^2 내지 1.4 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.08 mg/m^2 내지 1.6 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.09 mg/m^2 내지 1.8 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.1 mg/m^2 내지 2 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.2 mg/m^2 내지 4 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.3 mg/m^2 내지 6 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.4 mg/m^2 내지 8 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.5 mg/m^2 내지 10 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.6 mg/m^2 내지 12 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.7 mg/m^2 내지 14 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.8 mg/m^2 내지 16 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 0.9 mg/m^2 내지 18 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 1 mg/m^2 내지 20 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 2 mg/m^2 내지 40 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 3 mg/m^2 내지 60 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신은 약 4 mg/m^2 내지 80 mg/m^2 의 용량으로 투여된다. 일부

실시양태에서, 라파마이신은 약 5 mg/m² 내지 100 mg/m² 의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신의 용량은 24시간 기간 내의 총 용량이다.

[0681] 일부 실시양태에서, 라파마이신의 용량은 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신 용량은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14일마다 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신 용량은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10주마다 투여된다. 일부 실시양태에서, 라파마이신 용량은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개월마다 투여된다.

[0682] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 1차 투여 후, 라파마이신의 1차 용량은 바이러스 입자의 1차 투여 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 1차 투여 후, 라파마이신의 1차 용량은 바이러스 입자의 1차 투여 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14주 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 1차 투여 후, 라파마이신의 1차 용량은 바이러스 입자의 1차 투여 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개월 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 1차 투여 후, 라파마이신의 1차 용량은 바이러스 입자의 1차 투여 후 약 1-3일, 약 2-6일, 약 3-9일, 약 4-12일, 약 5-15일, 약 1-3주, 약 2-4주, 약 3-6주, 또는 약 4-8주 후에 투여된다.

[0683] 일부 실시양태에서, 라파마이신의 투여는 대상체에서, 또는 대상체의 특정 기관/영역에서 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포(예를 들어, CAR T 세포)의 수를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 대상체의 기관/영역은 혈액이다. 일부 실시양태에서, 대상체의 기관/영역은 비장이다. 일부 실시양태에서, 대상체의 기관/영역은 골수이다. 일부 실시양태에서, 라파마이신의 투여는 대상체에서 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포(예를 들어, CAR T 세포)의 수를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 5배, 적어도 7배, 또는 적어도 10배 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 증가는 라파마이신의 1차 용량 후(일단 바이러스 입자가 투여된 후) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12주 후에 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 수에 의해 평가되며, 여기서 기준 숫자는 라파마이신의 1차 용량의 투여일에서의 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 수이다. 일부 실시양태에서, 증가는 라파마이신의 1차 용량 후(일단 바이러스 입자가 투여된 후) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 후에 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 수에 의해 평가되고, 기준 숫자는 라파마이신의 1차 용량의 투여일에서의 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 수이다.

[0684] 일부 실시양태에서, 라파마이신의 투여는 대상체에서, 또는 대상체의 특정 기관/영역에서 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포(예를 들어, CAR T 세포)의 백분율을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 대상체의 기관/영역은 혈액이다. 일부 실시양태에서, 대상체의 기관/영역은 비장이다. 일부 실시양태에서, 대상체의 기관/영역은 골수이다. 일부 실시양태에서, 라파마이신의 투여는 대상체에서 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포(예를 들어, CAR T 세포)의 백분율을 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 5%, 적어도 7%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 증가는 라파마이신의 1차 용량 후(일단 바이러스 입자가 투여된 후) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12주에 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 백분율에 의해 평가되고, 여기서 기준 백분율은 라파마이신의 1차 용량의 투여일에서의 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 백분율이다. 일부 실시양태에서, 증가는 라파마이신의 1차 용량 후(일단 바이러스 입자가 투여된 후) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월에 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 백분율에 의해 평가되고, 여기서 기준 백분율은 라파마이신의 1차 용량의 투여일에 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 백분율이다. 일부 실시양태에서, 백분율은 대상체 또는 대상체의 특정 기관/영역에서 총 면역 세포 중 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 백분율이다. 일부 실시양태에서, 백분율은 대상체 또는 대상체의 특정 기관/영역에서 동일한 유형의 면역 세포(예를 들어, T 세포)에서의 바이러스 입자 형질도입된 면역 세포의 백분율이다.

[0685] ***약제학적 조성물 및 제형***

[0686] 본 개시내용의 제형 및 조성물은 세포, 조직, 기관 또는 동물에게 단독으로 또는 하나 이상의 다른 양식의 치료법과 조합으로 투여하기 위한 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 조성물로 제형화된, 임의의 수의 바이러스 입자의 조합 및 선택적으로 하나 이상의 추가 약제(폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 화합물 등)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 약제는 벡터의 형질도입 효율을 추가로 증가시킨다.

[0687] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된, 본원에 기술된 바와 같은 치료 유효량의 바이러스 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태

에서, 조성물은 예를 들어 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 소분자 또는 다양한 약제학적 활성 작용제와 같은 다른 작용제를 추가로 포함한다.

[0688] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 사용되는 바이러스 입자의 조성물 및 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 바이러스 입자를 선택적인 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 혼합함으로써, 동결건조 제형 또는 수성 용액의 형태로 저장하기 위해 제조될 수 있다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 표면 활성제(계면활성제), 완충액, 등장화제, 염, 아미노산, 당, 안정화제 및/또는 산화방지제가 제형에 사용된다.

[0689] 적합한 약제학적으로 허용되는 계면활성제는 폴리에틸렌-소르비탄-지방산 에스테르, 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌-스테아레이트 및 소듐 도데실 설페이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 완충액은 히스티딘-완충액, 시트레이트-완충액, 숙시네이트-완충액, 아세테이트-완충액 및 포스페이트-완충액을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0690] 등장화제는 등장성 제형을 제공하기 위해 사용된다. 등장성 제형은 액체이거나 고체 형태, 예를 들어 동결건조된 형태로부터 재구성된 액체이고, 생리식염수 및 혈청과 같은 비교되는 일부 다른 용액과 동일한 장성을 갖는 용액을 의미한다. 적합한 등장화제는 염화나트륨(NaCl) 또는 염화칼륨을 포함하나 이에 제한되지 않는 염, 글루코스, 수크로스, 트레할로스를 포함하나 이에 제한되지 않는 당, 또는 및 아미노산, 당, 염의 그룹으로부터의 임의의 성분 및 이의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 등장화제는 일반적으로 약 5mM 내지 약 350mM의 총량으로 사용된다.

[0691] 염의 비제한적 예는 양이온인 나트륨 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘과 음이온인 클로라이드, 포스페이트, 시트레이트, 숙시네이트, 설페이트 또는 이들의 혼합물과의 임의의 조합의 염을 포함한다. 아미노산의 비제한적 예는 아르기닌, 글리신, 오르니틴, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파라긴산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 프롤린을 포함한다. 본 발명에 따른 당의 비제한적 예로는 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 락토스, 글루코스, 만노스, 말토스, 갈락토스, 프럭토스, 소르보스, 라피노스, 글루코사민, N-메틸글루코사민("메글루민"이라고도 함), 갈락토사민 및 뉴라민산 및 이들의 조합을 포함한다. 안정화제의 비제한적 예는 상기 기재된 바와 같은 아미노산 및 당 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 임의의 종류 및 분자량의 상업적으로 입수가능한 사이클로덱스트린 및 덱스트란을 포함한다. 산화방지제의 비제한적 예로는 메티오닌, 벤질알코올 또는 산화를 최소화하기 위해 사용되는 임의의 다른 부형제와 같은 부형제를 포함한다.

[0692] "약제학적으로 허용되는"이라는 어구는 인간에게 투여될 때 알레르기 반응 또는 이와 유사한 원치 않는 반응을 일으키지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 제제는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 전형적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서 주사제로서 제조되며; 주입 전에 액체에 용해 또는 현탁하기에 적합한 고체 형태로도 제조될 수 있다. 제제는 또한 유화될 수 있다.

[0693] 본원에서 사용되는 "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제는 활성 성분과 비화합성인 경우를 제외하고, 치료 조성물에 이의 사용이 고려된다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 혼입될 수도 있다.

[0694] 본원에 사용된 "약제학적으로 허용되는 담체"는 약제학적으로 허용되는 세포 배양 배지를 포함하여 생리학적으로 화합성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 담체를 포함하는 조성물은 비경구 투여, 예를 들어 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여에 적합하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 주사 용액 또는 분산액 및 멸균 수용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 형질도입된 세포와 비화합성인 경우를 제외하고, 본 개시내용의 약제학적 조성물에 그의 사용이 고려된다.

[0695] 조성물은 세포 또는 동물에 대한 투여를 위해 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 양식의 치료법과 조합으로 약제학적 허용성 또는 생리학적 허용성 용액에 제형화된, 하나 이상의 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 이를 포함하는 벡터, 벡터의 형질도입 효율을 증가시키는 화합물을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 원한다면, 본 개시내

용의 조성물은 예를 들어 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 소분자 또는 다양한 약제학적 활성 작용제와 같은 다른 작용제와 조합으로 투여될 수 있음을 이해할 것이다. 추가 작용제가 의도된 치료법을 전달하는 조성물의 능력에 악영향을 미치지 않는 한, 조성물에 또한 포함될 수 있는 다른 성분에는 사실상 제한이 없다.

[0696] 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 발현 카세트 또는 벡터(예를 들어, 치료용 벡터) 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 본원에 개시된 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 포함하고, 예를 들어 발현 카세트는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR) 및 이의 변이체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0697] 발현 카세트 또는 벡터를 함유하는 약제학적 조성물은 선택된 투여 방식, 예를 들어 심실내, 심근내, 관상동맥내, 정맥내, 동맥내, 신장내, 요도내, 경막외, 척수강내, 복강내 또는 근육내 투여에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 벡터는 단독 활성제로서, 또는 다른 활성제와 조합으로, 단위 투여 형태로, 통상적인 약제학적 지지체와의 혼합물로서 동물 및 인간에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약제학적 조성물은 본 개시내용에 따른 임의의 벡터로 생체외 형질도입된 세포를 포함한다.

[0698] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자), 또는 해당 바이러스 입자를 포함하는 약제학적 조성물은 전신으로 투여될 때 효과적이다. 예를 들어, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 일부 경우에 대상체(예를 들어, 비-인간 영장류 또는 인간과 같은 영장류)에게 정맥내로 투여될 때 효능을 입증한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 전신 투여시 다양한 면역 세포(예를 들어, T-세포, 수지상 세포, NK 세포에서)에서 CAR의 발현을 유도할 수 있다.

[0699] 다양한 실시양태에서, 약제학적 조성물은 주사될 수 있는 제형에 대해 약제학적으로 허용되는 비히클(예를 들어, 담체, 희석제 및 부형제)을 함유한다. 예시적인 부형제는 폴록사머를 포함한다. 바이러스 벡터용 제형 완충액은 일반적으로 응집을 방지하기 위한 염 및 바이러스 입자의 점착성을 줄이기 위한 기타 부형제(예를 들어, 폴록사머)를 함유한다. 이들은 특히 등장성, 멸균, 식염수(인산일나트륨 또는 인산이나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 또는 염화마그네슘 등 또는 이러한 염의 혼합물), 또는 건조, 특히 동결 건조된 조성물일 수 있으며, 이는 경우에 따라 멸균수 또는 생리식염수의 첨가 시 주사 용액의 구성을 허용한다. 일부 실시양태에서, 제형은 동결 시(예를 들어, 0℃ 미만, 약 -60℃ 또는 약 -72℃) 저장 및 사용에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제형은 동결보존 용액이다.

[0700] 본 개시내용의 약제학적 조성물, 약제학적으로 허용되는 부형제 및 담체 용액의 제형화는 예를 들어 경구, 비경구, 정맥내, 비강내, 복강내 및 근육내 투여 및 제형화를 포함하는 다양한 치료 요법에 본원에 기술된 특정 조성물을 사용하기에 적합한 투약 및 치료 요법의 개발과 마찬가지로, 관련 기술분야의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0701] 특정 상황에서, 예를 들어, 미국 특허 제5,543,158호; 제5,641,515호 및 제5,399,363호(각각 전체 내용이 본 명세서에 참고로 특별하게 포함됨)에서와 같이, 본원에 개시된 조성물은 비경구적으로, 정맥내로, 근육내로, 또는 복강내로 전달하는 것이 바람직할 것이다. 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로오스와 같은 계면활성제와 적절하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건에서 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위해 보존제를 함유한다.

[0702] 주사용으로 적합한 약제학적 형태로는 멸균 주사가능 용액 또는 분산액, 및 멸균 수성 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다(미국 특허 제5,466,468호, 특히 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨). 모든 경우에 형태는 무균성이어야 하고 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동적이어야 한다. 제조 및 저장 조건 하에 안정적이어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존적이어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 촉진될 수 있다. 일부 실시양태에서, 등장화제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨이 첨가된다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 사용함으로써 야기될 수 있다.

[0703] 수성 용액으로의 비경구 투여를 위해, 예를 들어 용액은 필요한 경우 적절하게 완충되어야 하고 액체 희석제는 먼저 충분한 식염수 또는 포도당으로 등장성이 되게 했다. 이들 특정 수성 용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 개시내용에 비추어 관련 기술 분야의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들어, 하나의 투여량은 1ml의 등장성 NaCl 용액에 용해되고 1000ml의 피하주사액에 첨가될 수 있거나, 또는 제안된 주입 부위에 주사될 수 있다(예를 들어, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins, 2005). 투여량의 약간의 변동은 치료 대상체의 상태에 따라 필연적으로 발생할 것이다. 투여 책임자는 어떤 경우에도 개별 대상체에게 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여의 경우 제제는 FDA 생물의약품국 표준에서 요구하는 멸균성, 발열성 및 일반 안전 및 순도 표준을 충족해야 한다.

[0704] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 비제한적으로 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스) 벡터를 포함하는 바이러스 벡터 시스템(즉, 바이러스-매개 형질도입)의 전달에 적합한 제형 또는 조성물을 제공한다.

[0705] *조합 요법*

[0706] 본 개시내용은 바이러스 입자의 형질도입 효율을 개선시키는 하나 이상의 추가 작용제가 사용될 수 있음을 추가로 고려한다.

[0707] 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 하나 이상의 항암 요법을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0708] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 항암 요법은 자가 줄기 세포 이식(ASCT), 방사선, 수술, 화학요법제, 면역조절제 및 표적 암 요법으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0709] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 항암 요법은 레날리도마이드, 탈리도마이드, 포말리도마이드, 보르테조밉, 카르필조밉, 엘로토주맙, 익사조밉, 멜팔란, 덱사메타손, 빈크리스틴, 사이클로포스파미드, 하이드록시 다우노루비신, 프레드니손, 리툭시맙, 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 보수티닙, 포나티닙, 바페티닙, 사라카티닙, 토자세르팁 또는 다누세르팁, 시타라빈, 다우노루비신, 이다루비신, 미톡산트론, 하이드록시우레아, 데시타빈, 클라드리빈, 플루다라빈, 토포테칸, 에토포사이드 6-티오구아닌, 코르티코스테로이드, 메토트렉세이트, 6-머캅토퓨린, 아자시티딘, 삼산화비소 및 모두-트랜스 레틴산, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0710] ***질환***

[0711] 본 개시내용은 또한 질환, 장애 또는 병태의 치료에 사용될 수 있는 바이러스 입자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액학적 악성종양 또는 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 이전의 항암 치료제를 사용한 치료에 대해 재발하거나 불응성이다.

[0712] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바이러스 입자의 치료 적용예는 다른 비-CAR T-세포 치료 옵션에 실패한 CD19-발현 B-세포 악성종양을 치료하는 것이다.

[0713] *혈액학적 악성종양*

[0714] 일부 실시양태에서, 암은 혈액학적 악성종양이다.

[0715] 일부 실시양태에서, 혈액학적 악성종양은 림프종, B 세포 악성종양, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, DLBLC, FL, MCL, 변연부 B 세포 림프종(MZL), 점막-연관 림프 조직 림프종(MALT), CLL, ALL, AML, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 또는 T-세포 림프종이다.

[0716] 일부 실시양태에서, 고형 종양은 폐암, 간암, 자궁경부암, 결장암, 유방암, 난소암, 췌장암, 흑색종, 교모세포종, 전립선암, 식도암 또는 위암이다. WO2019057124A1은 CD19에 결합하는 T 세포 전향성 치료제로 치료할 수 있는 암을 개시한다.

[0717] 일부 실시양태에서, 혈액학적 악성종양은 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 미결정된 유의성의 단클론성 감마병증(MGUS), 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 버킷 림프종(BL), 여포성 림프종(FL), 외투 세포 림프종(MCL), 발덴스트롬 마크로글로불린종, 형질 세포 백혈병, 경쇄 아밀로이드증(AL), 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병, 전구체 B-세포 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 골수이형성 증후군(MDS), 만성 림프구성 백혈병(CLL), B 세포 악성종양, 만성 골수성 백혈병(CML), 털상 세포 백혈병(HCL), 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 변연부 B 세포 림프종(MZL), 점막-연

관 림프 조직 림프종(MALT), 형질 세포 백혈병, 역형성 대세포 림프종(ALCL), 백혈병 또는 림프종이다.

[0718] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 유전자 이상은 염색체 8과 21 사이의 전위, 염색체 16의 전위 또는 역위, 염색체 15와 17 사이의 전위, 염색체 11의 변화, 또는 fins-관련 티로신 키나아제 3(FLT3)의 돌연변이, 뉴클레오포스민(NPM1), 이소시트레이트 탈수소효소 1(IDH1), 이소시트레이트 탈수소효소 2(IDH2), DNA(시토신-5)-메틸전이효소 3(DNMT3A), CCAAT/인핸서 결합 단백질 알파(CEBPA), U2 작은 핵 RNA 보조 인자 1(U2AF1), zeste 2 폴리콤 억제 복합체 2 서브유닛의 인핸서(EZH2), 염색체 1A의 구조적 유지(SMC1A) 또는 염색체 3의 구조적 유지(SMC3)이다.

[0719] 일부 실시양태에서, 혈액학적 악성종양은 ALL이다.

[0720] 일부 실시양태에서, ALL은 B-세포 계통 ALL, T-세포 계통 ALL, 성인 ALL 또는 소아 ALL이다.

[0721] 일부 실시양태에서, ALL을 갖는 대상체는 필라델피아 염색체를 갖거나, BCR-ABL 키나제 저해제를 사용한 치료에 대한 내성이 있거나 후천적 내성을 갖는다.

[0722] Ph 염색체는 ALL이 있는 성인의 약 20%와 ALL이 있는 소아의 작은 비율에 존재하며 불량한 예후와 연관이 있다. 재발 시 Ph+ 양성 ALL 환자는 티로신 키나제 저해제(TKI) 요법을 받고 있을 수 있으므로 TKI에 내성이 생겼을 수 있다. 따라서 본원에 기술된 방법은 선택적 또는 부분 선택적 BCR-ABL 저해제에 내성이 생긴 대상체에게 투여될 수 있다. 예시적인 BCR-ABL 저해제는 예를 들어 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 보수티닙, 포나티닙, 바페티닙, 사라카티닙, 토자세르팁 또는 다누세팁이다.

[0723] 일부 실시양태에서, 대상체는 t(v;11q23)(MLL 재배열됨), t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1(E2A-PBX1), t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1(TEL-AML1) 또는 t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH 염색체 재배열이 있는 ALL을 갖는다.

[0724] 염색체 재배열은 잘 알려진 방법, 예를 들어 형광 동일계내 혼성화, 핵형 분석, 펄스 필드 겔 전기영동 또는 시퀀싱을 사용하여 식별할 수 있다.

[0725] 일부 실시양태에서, 혈액학적 악성종양은 무증상 다발성 골수종, MGUS, ALL, DLBLC, BL, FL, MCL, 발덴스트롬 마크로글로불린종, 형질 세포 백혈병, AL, 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병, 전구체 B 세포 림프모구성 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS), CLL, B 세포 악성종양, CML, HCL, 모구성 형질세포양 수지상 세포 신생물, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, MZL, MALT, 형질 세포 백혈병, ALCL, 백혈병 또는 림프종이다.

[0726] 일부 실시양태에서, 암은 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)이다. 일부 실시양태에서, 암은 버킷형 거대 B 세포 림프종(B-LBL)이다. 일부 실시양태에서, 암은 여포성 림프종(FL)이다. 일부 실시양태에서, 암은 만성 림프구성 백혈병(CLL)이다. 일부 실시양태에서, 암은 급성 림프구성 백혈병(ALL)이다. 일부 실시양태에서, 암은 외투 세포 림프종(MCL)이다.

[0727] *고형 종양*

[0728] 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다.

[0729] 일부 실시양태에서, 고형 종양은 전립선암, 폐암, 비소세포 폐암(NSCLC), 간암, 자궁경부암, 결장암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 췌장암, 흑색종, 식도암, 위암(gastric cancer), 위암(stomach cancer), 신장 암종, 방광암, 간세포 암종, 신장세포 암종, 요로상피 암종, 두경부암, 신경교종, 교모세포종, 결장직장암, 갑상선암, 상피암 또는 선암종이다.

[0730] 일부 실시양태에서, 전립선암은 재발된 전립선암이다. 일부 실시양태에서, 전립선암은 난치성 전립선암이다. 일부 실시양태에서, 전립선암은 악성 전립선암이다. 일부 실시양태에서, 전립선암은 거세 저항성 전립선암이다.

[0731] ***정의***

[0732] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 용어(기술적 및 과학적 용어 포함)는 본 개시내용이 속하는 관련 기술 분야의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의된 용어와 같은 용어는 본 출원 및 관련 기술분야의 정황에서 그 의미와 일관되는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며 본원에 명백하게 이와 같이 정의되지 않는 한 이상적인 또는 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않아야 한다는 것이 또한 이해될 것이다. 본 명세서에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 설명하기 위해 사용된 것으로, 제한하려는 의도는 아니다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전체가

참고로 포함된다. 용어에 충돌이 있는 경우, 본 명세서가 우선한다.

[0733] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 정황에서 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 다음 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하거나, 또는 수동 정렬 및 육안 조사에 의해 측정했을 때 비교 창, 또는 지정된 영역 상에서 최대 상응도로 비교 및 정렬되는 경우, 특정 영역 상에서 기준 서열과 동일한(즉, 적어도 약 80% 동일성, 예를 들어, 적어도 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 공유함) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 특정 백분율을 갖거나 동일한 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 이러한 서열은 그 다음 "실질적으로 동일한" 것이라고 한다. 이 정의는 또한 테스트 서열의 보체를 지칭하기도 한다. 일부 실시양태에서, 동일성은 길이가 적어도 약 25개 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역 상에, 예를 들어 길이가 50, 100, 200, 300, 400개 아미노산 또는 뉴클레오타이드인 영역 상에, 또는 기준 서열의 전체 길이 상에 존재한다.

[0734] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 테스트 서열이 비교되는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 테스트 및 기준 서열이 컴퓨터에 입력되고 필요한 경우 하위서열 좌표가 지정되고 서열 알고리즘 프로그램 매개변수가 지정된다. 디폴트 프로그램 매개변수가 사용될 수 잇거나, 또는 대체 매개변수가 지정될 수 있다. 그런 다음 서열 비교 알고리즘은 프로그램 매개변수에 기초하여 기준 서열에 대비하여 테스트 서열에 대한 서열 동일성 백분율을 계산한다. 일부 실시양태에서, BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘 및 디폴트 매개변수가 사용된다.

[0735] 본원에 사용된 "비교 창"은 2개의 서열을 최적으로 정렬한 후 근접한 위치의 동일한 수의 기준 서열과 서열이 비교될 수 있는 20개 내지 600개, 일반적으로 약 50개 내지 약 200개, 보다 일반적으로 약 100개 내지 약 150개로 이루어지는 군으로부터 선택되는 근접한 위치의 수 중 어느 하나의 분절에 대한 언급을 포함한다. 비교하기 위해 서열을 정렬하는 방법은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어, 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 검색 방법에 의해, 이들 알고리즘의 전산 구현예(미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575에 소재하는 Genetics Computer Group의 Wisconsin Genetics Software Package 중의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA)에 의해, 또는 수동 정렬 및 육안 조사에 의해(예를 들어, Ausubel 등, eds., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement) 참조) 수행될 수 있다. 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 문헌[Altschul 등, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)] 및 [Altschul 등, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1977)]에 각각 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립생물공학 정보센터(ncbi.nlm.nih.gov/의 월드와이드 웹)를 통해 공개적으로 사용할 수 있다.

[0736] 2개의 핵산 서열 또는 폴리펩타이드가 실질적으로 동일하다는 지표는 제1 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드가 하기에 기재된 바와 같이 제2 핵산에 의해 암호화된 폴리펩타이드에 대해 유발된 항체와 면역학적으로 교차 반응성이라는 것이다. 따라서, 예를 들어 2개의 펩타이드가 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우, 폴리펩타이드는 전형적으로 제2 폴리펩타이드와 실질적으로 동일하다. 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 지표는 2개의 분자 또는 이들의 보체가 엄격한 조건 하에서 서로 혼성화한다는 것이다. 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 또 다른 지표는 동일한 프라이머가 서열을 증폭시키는 데 사용될 수 있다는 것이다.

[0737] 본 발명의 설명 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 다르게 나타내지 않는 한 복수형도 포함하는 것으로 의도된다.

[0738] 또한, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "및/또는"은 연관된 나열된 항목 중 하나 이상의 임의의 및 모든 가능한 조합뿐만 아니라 대안(또는)으로 해석되는 경우 조합의 결여를 지칭하고 포괄한다.

[0739] 본원에서 사용되는 바와 같이, "투여하는"은 국소 및 전신 투여, 예를 들어 장관, 비경구, 폐 및 국소/경피 투여를 포함하는 것을 지칭한다. 본원에 기술된 방법에서 사용되는 약제학적 성분(예를 들어, 벡터)의 투여 경로는 예를 들어 경구(per os(P.O.)) 투여, 비강 또는 흡입 투여, 좌약으로서의 투여, 국소 접촉, 경피 전달(예를 들어, 경피 패치를 통해), 척수강내(IT) 투여, 정맥내("iv") 투여, 복강내("ip") 투여, 근육내("im") 투여, 병소내 투여 또는 피하("sc") 투여, 또는 대상체에 저속 방출 장치, 예를 들어 소형 삼투압 펌프, 데포 제형 등의 이식을 포함한다. 투여는 비경구 및 경점막을 포함하는 임의의 경로(예를 들어, 경구, 비강, 질, 직장 또는 경피)를 포함하는 임의의 경로에 의한 것일 수 있다. 비경구 투여는 예를 들어, 정맥내, 근육내, 동맥내, 신장내, 요도내, 심장내, 관상동맥내, 심근내, 피내, 경막외, 피하, 복강내, 심실내, 이온영동 및 두개내 투여를 포함한

다. 다른 전달 방식은 리포솜 제형, 정맥내 주입, 경피 패치 등의 사용을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0740] 용어 "전신 투여" 및 "전신으로 투여된"은 약제학적 성분 또는 조성물이 순환계를 통해 약제 작용의 표적 부위를 포함하는 신체 부위로 전달되도록 약제학적 성분 또는 조성물을 포유동물에게 투여하는 방법을 지칭한다. 전신 투여는 경구, 비강내, 직장 및 비경구(예를 들어, 근육내, 정맥내, 동맥내, 경피 및 피하와 같이 소화관 외로) 투여를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0741] 용어 "공동투여" 또는 "동시 투여"는 예를 들어 약제학적 성분(예를 들어, 벡터) 및/또는 이의 유사체와 또 다른 활성 작용제(예를 들어, 다중특이적 항체)와 관련하여 사용되는 경우, 둘 모두가 생리학적 효과를 동시에 달성할 수 있도록 약제학적 성분 및/또는 유사체와 활성 작용제의 투여를 지칭한다. 그러나, 두 작용제는 함께 투여될 필요는 없다. 일부 실시양태에서, 하나의 작용제의 투여는 다른 작용제의 투여에 선행할 수 있다. 동시 생리학적 효과는 반드시 동시에 순환계에 두 작용제의 존재를 필요로 하지는 않는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 공동투여는 전형적으로 두 작용제가 임의의 주어진 용량에서 최대 혈청 농도의 상당한 분율(예를 들어, 20% 이상, 예를 들어, 30% 또는 40% 이상, 예를 들어, 50% 또는 60% 이상, 예를 들어, 70% 또는 80% 또는 90% 이상)로 체내(예를 들어, 혈장)에 동시에 존재하는 것을 초래한다.

[0742] 용어 "유효량" 또는 "약제학적 유효량"은 원하는 결과를 야기하는 데 필요한 하나 이상의 약제학적 성분(예: 벡터)의 양 및/또는 투여량, 및/또는 투여 요법을 지칭한다.

[0743] "투여되도록 하는"이라는 어구는 대상체에게 문제가 되는 작용제(들)/화합물(들)의 투여를 제어 및/또는 허용하는, 의료 전문가(예를 들어, 의사) 또는 대상체의 의료 관리를 제어하는 사람이 취하는 조치를 지칭한다. 투여되도록 하는 것은 적절한 치료 또는 예방 요법의 진단 및/또는 결정, 및/또는 대상체에 대한 특정 작용제(들)/화합물 처방을 수반할 수 있다. 이러한 처방에는 예를 들어 처방전 작성, 의료 기록에 주석 달기 등이 포함될 수 있다.

[0744] 본원에 사용된 용어 "치료하는" 및 "치료"는 이 용어가 적용되는 질환 또는 병태, 또는 이러한 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 개시를 지체시키거나, 진행을 지연시키거나 역전시키거나, 중증도를 감소시키거나, 완화시키거나 예방하는 것을 지칭한다. 용어 "치료하는" 및 "치료"는 또한 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 예방, 경감, 호전, 감소, 저해, 제거 및/또는 역전시키는 것을 포함한다.

[0745] 용어 "경감"은 해당 병리 또는 질환의 하나 이상의 증상의 감소 또는 제거, 및/또는 해당 병리 또는 질환의 하나 이상의 증상의 개시 또는 중증도의 속도 또는 지연의 감소, 및/또는 해당 병리 또는 질환의 예방을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 병리 또는 질환의 하나 이상의 증상의 감소 또는 제거는 예를 들어 종양 부피의 측정가능하고 지속적인 감소를 포함할 수 있다.

[0746] 본원에 사용된 바와 같이, "본질적으로 이루어진"이라는 어구는 방법 또는 조성물에서 언급된 활성 약제의 속 또는 종을 지칭하고, 추가로 그 자체로는 언급된 적응증 또는 목적에 대해 실질적인 활성을 갖지 않는 다른 작용제를 포함할 수 있다.

[0747] "대상체", "개체" 및 "환자"라는 용어는 포유동물, 바람직하게는 인간 또는 비인간 영장류를 상호교환적으로 지칭하지만, 길들여진 포유동물(예를 들어, 개 또는 고양이과), 실험실 포유동물 및 농업용 포유동물도 지칭한다. 다양한 실시양태에서, 대상체는 인간(예를 들어, 성인 남성, 성인 여성, 청소년기 남성, 청소년기 여성, 남아, 여아)일 수 있다.

[0748] 본원에서 사용되는 용어 "바이러스 입자"는 외래 핵산 분자를 다른 작용제와 독립적으로 세포로 전달할 수 있는 거대분자 복합체를 지칭한다. 입자는 바이러스 입자 또는 비바이러스 입자일 수 있다. 바이러스 입자는 레트로바이러스 입자 및 렌티바이러스 입자를 포함한다. 비바이러스 입자는 폴리뉴클레오타이드를 세포로 전달하기 위한 리포솜, 나노입자 및 기타 캡슐화 시스템에 제한된다.

[0749] 유전자 이름 앞의 약어 "α" 또는 "항-"은 표적에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편(예컨대, scFv)을 지칭한다. 예를 들어, αCD19는 항-CD19 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭하고 αCD3은 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0750] 본원에 사용된 용어 "발현 카세트" 또는 "벡터 게놈"은 상기 발현 카세트에 혼입된 폴리펩타이드(예를 들어, 키메라 항원 수용체)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드("전이유전자" 또는 "페이로드")의 발현을 적절한 환경에서 유도할 수 있는 DNA 분절을 지칭한다. 숙주 세포로 도입될 때, 발현 카세트는 특히 전이유전자를 RNA로 전사시키는 세포의 기구를 유도할 수 있고, 그 다음 일반적으로 추가 프로세싱되고 마지막으로 폴리펩타이드로 해독된

다. 발현 카세트는 입자(예를 들어, 바이러스 입자)에 포함될 수 있다. 일반적으로, 발현 카세트라는 용어는 폴리뉴클레오타이드 서열 5'에서 5' ITR까지 및 3'에서 3' ITR까지를 배제한다.

[0751] 용어 "전이유전자" 또는 "페이로드"는 전달된 핵산 자체를 지칭한다. 전이유전자는 네이키드 핵산 분자(예컨대, 플라스미드) 또는 RNA일 수 있다. 전이유전자는 하나 이상의 폴리펩타이드(예를 들어, 키메라 항원 수용체)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 전이유전자는 하나 이상의 이종 단백질(예를 들어, 키메라 항원 수용체), 하나 이상의 캡시드 단백질, 및 표적 세포로의 폴리뉴클레오타이드의 형질도입에 필요한 다른 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0752] "유래된"이라는 용어는 세포가 이들의 생물학적 공급원으로부터 수득되어 시험관내에서 성장되거나 그렇지 않으면 조작되었음을 나타내기 위해 사용된다(예를 들어, 성장 배지에서 배양되어 집단을 확장하고/하거나 세포주를 생산함).

[0753] 용어 "형질도입"은 입자(예를 들어, 렌티바이러스 입자)를 통해 핵산 또는 숙주 유기체 내로 핵산을 도입하는 것을 지칭한다. 따라서, 바이러스 입자에 의한 세포 내 전이유전자의 도입은 세포의 "형질도입"이라고 지칭될 수 있다. 전이유전자는 형질도입된 세포의 게놈 핵산에 통합되거나 통합되지 않을 수 있다. 도입된 전이유전자는 수용자 세포 또는 유기체의 핵산(게놈 DNA) 내로 통합된다면, 해당 세포에서 안정적으로 유지될 수 있다. 대안적으로, 도입된 전이유전자는 수용자 세포 또는 숙주 유기체에 염색체외에 또는 단지 일시적으로 존재할 수 있다. 따라서 "형질도입된 세포"는 전이유전자가 형질도입에 의해 도입된 세포이다. 따라서, "형질도입된" 세포는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 세포이다.

[0754] 용어 "형질도입 효율"은 세포 배양물이 입자와 접촉할 때 전이유전자를 발현하거나 형질도입하는 세포의 비율을 표현한 것이다. 일부 실시양태에서, 효율은 주어진 수의 세포가 주어진 수의 입자와 접촉할 때 전이유전자를 발현하는 세포의 수로 표현될 수 있다. 일부 실시양태에서, "상대적 형질도입 효율"은 동일한 세포 유형의 세포의 유사한 수를 포함하는 또 다른 조건에서 동일한 수의 입자에 의해 형질도입된 세포의 비율에 상대적인, 하나의 조건에서 주어진 수의 바이러스 입자에 의해 형질도입된 세포의 비율이다. 상대적 형질도입 효율은 해당 조절인자에 의해 처리되거나 처리되지 않은 세포 및/또는 동물에 대한 형질도입 효율의 조절인자에 의한 효과를 비교하기 위해 가장 종종 사용된다.

[0755] ****

[0756] 본원에 언급된 모든 간행물 및 특허는 각각의 개별 간행물 또는 특허가 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 표시된 것처럼 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다. 상충하는 경우, 본원의 임의의 정의를 포함하는 본 출원이 우선할 것이다. 그러나 본원에 인용된 임의의 참고문헌, 논문, 간행물, 특허, 특허 간행물 및 특허 출원에 대한 언급은 이들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 세계의 모든 나라에서 공통적인 일반 지식의 일부를 구성한다는 것을 인정하거나 암시의 임의의 형태가 아니며 인정하거나 암시의 임의의 형태로서 간주되어서는 안된다.

[0757] 본원에 사용된 섹션 제목은 조직적인 목적만을 위한 것이며 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0758] 예시적인 실시형태가 예시되고 설명되었지만, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0759] **실시예**

[0760] 다음 실시예는 본원에 기술된 조성물 및 방법이 어떻게 사용되고, 제조되고, 평가될 수 있는지에 대한 설명을 관련 기술분야의 기술자에게 제공하기 위해 제시되며, 본 발명을 순전히 예시하기 위한 것이지, 본 발명으로 간주되는 것의 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

[0761] ***실시예 1: 렌티바이러스 입자 생산 및 시험관내 형질도입***

[0762] 렌티바이러스 입자를 생성하기 위해, 키메라 항원 수용체(CAR) 대신 mCherry(디스코소마(Discosoma)에서 유래된 적색 형광 단백질)를 발현하고 라파마이신 활성화 사이토카인 수용체(RACR)를 함유하는 VT103 전이유전자 플라스미드를 Cocal G 단백질을 암호화하는 외피 플라스미드 및 막에 묶인 항-CD3 항체와 함께 293 세포 내로 공동형질감염시켰다.

[0763] **바이러스 생산**

[0764] 1.2e6 293T 세포를 총 부피 2.5ml의 완전 DMEM 배지에서 TC-처리된 6웰 플레이트에 파종했다. 24시간 후, 세포를 형질감염시켰다. (6웰 플레이트 중 1웰에 대해 작성된 프로토콜; 모든 시약은 실온이어야 함)

[0765] 다음 DNA를 500ul 무혈청 OptiMEM™ 배지에 첨가했다: 2ug 전달 플라스미드, 1ug Gag/pol 플라스미드, 1ug REV 플라스미드, 1ug Cocal 외피 플라스미드. 그런 다음 15ul(15ug) PEI를 배지/DNA 혼합물에 첨가했다. 혼합물을 잘 혼합하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 배지/DNA/PEI 혼합물을 2.5ml의 신선한 완전 DMEM 배지에 첨가했다. 293T-함유 웰의 파종 배지를 제거하고 형질감염 시약을 함유하는 신선한 배지로 교체하고 37℃ 가습 인큐베이터에 넣었다. 48시간 후 상청액을 수집하고 0.45um PVDF 필터를 통해 여과했다. 상청액을 Amicon-Ultra 15 100K 컬럼을 사용하여 농축하고 3000xg에서 30분 동안 4℃에서 원심분리했다. 그런 다음 바이러스를 사용할 때까지 4℃에서 저장했다.

[0766] **293T 형질도입 역가**

[0767] 1e5 293T 세포를 1ml 완전 DMEM 배지에서 TC-처리된 12웰 플레이트에 파종했다. 24시간 후, 역가를 계산하기 위해 빈 웰을 3X 계수했다. 그런 다음 웰당 바이러스 2ul, 1ul, 0.5ul, 0.2ul, 0.1ul, 0.05ul의 양으로 웰에 바이러스를 첨가한다. 바이러스를 293T 세포에 첨가하기 전에 1:100으로 희석했다. 3일 후, 유세포분석에 의한 분석을 위해 293T 세포를 수확했다. 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 세척한 다음, 세포를 트립신으로 세척하고 37℃ 인큐베이터에서 약 3-5분 동안 인큐베이션했다. 세포를 1ml FACS 완충액에 재현탁하고 약 100-200ul를 96웰 V 바닥 플레이트에 첨가했다. 유세포 분석은 mCherry 발현에 대해 수행했다.

[0768] 293T 역가 계산:

[0769] TU/ml = (형질도입 시 세포 수 x %mCherry+ x 100)/(벡터 부피 ul x 1000)

[0770] **유세포분석을 위한 PBMC 형질도입 및 염색**

[0771] PBMC를 해동하고, 10ml RPMI 완전 배지에 재현탁하고, PBMC를 완전 RPMI 배지에 1e6 세포/ml로 희석했다. IL-2를 50U/ml의 최종 농도로 첨가했다. PBMC는 다양한 자극을 위해 각각 15ml의 3x 그룹으로 분리했다.

[0772] 그룹 #1 - 1 ng/ml의 최종 농도로 첨가된 블리나투모맙

[0773] 그룹 #2 - 15e6 αCD3/αCD28 Dynabeads 첨가됨

[0774] 그룹 #3 - IL-2 단독

[0775] 각 그룹에 대해 5ml의 자극 용액을 비-TC 처리된 6웰 플레이트의 3x 웰에 첨가하고 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션했다. 적용가능한 웰로부터 비드를 제거하고, 세포를 계수하고 펠릿화했다. 이어서, 50U/ml 최종 농도의 IL-2와 함께 세포를 1e6 세포/ml로 신선한 완전 RPMI 배지에 재현탁했다. 1ml(1e6 세포)를 비-TC-처리된 12웰 플레이트의 웰에 첨가했다. 5ul 및 25ul의 Amicon 농축 제조물을 플레이트에 첨가한 후 37℃ 인큐베이터에 넣었다.

[0776] 5ul = 감염 다중도(MOI) 약 0.25

[0777] 25ul = MOI 약 1

[0778] 4일 후, 세포를 96웰 V-바닥 플레이트의 웰에 200ul로 재현탁시켰다. 이어서 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척했다. 세포 펠릿을 Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁하고 4℃에서 20분 동안 인큐베이션한 다음, 200ul FACS 완충액으로 추가 세척했다. 세포를 50ul의 표면 항체 칵테일(항-CD3-PerCP, 항-CD19-FITC, 항-CD56-APC 및 항-CD25-BV421)에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척했고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0779] **결과 및 결론**

[0780] 도 1에 나타낸 바와 같이, αCD3-Cocal 외피 플라스미드(서열번호 129)로 패키징된 렌티바이러스 입자는 성공적으로 패키징되었고 정규 Cocal 외피로 생성된 벡터와 비교하여 유사한 293T 역가를 나타낸다. R354Q 돌연변이를 함유하는 "블라인드" Cocal 외피로 위형화된 벡터에 의해 최소 형질도입이 관찰되었다. 이는 R354Q 돌연변이가 저밀도 지단백 수용체에 대한 VSV-G(Cocal과 약 70% 상동성) 외피 단백질의 결합을 제한하는 것으로 관찰되었을 때 예측되었다.

[0781] 벡터 유도 활성화 및 형질도입을 평가하기 위해, 전술한 바와 같은 IL-2 단독, 블리나투모맙+IL-2 또는 항-CD3/

항-CD28 비드+IL-2에 의해 자극된 인간 PBMC에 농축 벡터 제조물을 첨가했다. 4일 후 PBMC를 수확하고 상기 기재된 바와 같이 유세포분석을 위해 염색했다. αCD3-Cocal-위형화된 벡터는 자극되지 않은 인간 PBMC를 활성화하고 형질도입시켰다.

[0782] T 세포를 CD25 발현에 대해 분석했다(도 2). 블리나투모맙 및 αCD3/αCD28 비드는 크게 증가된 CD25 발현에 의해 입증되는 바와 같이 T 세포를 강력하게 활성화시켰다. 정규 Cocal-위형화된 벡터는 아니지만 αCD3-Cocal(도 2b)은 또한 자극되지 않은 PBMC를 블리나투모맙 단독과 유사한 정도로 활성화할 수 있었다(도 2c). αCD3-Cocal 외피에 의해 유도된 증가된 수준의 활성화는 자극되지 않은 PBMC에서 mCherry 전이유전자 발현의 증가된 수준에 상응했다. 블라인드 Cocal 외피에 의해 자극된 T 세포에 대한 활성화의 유사한 수준이 검출되었지만, mCherry 전이유전자 발현의 높은 수준은 검출되지 않았다(도 2d). αCD3-Cocal-위형화된 렌티바이러스 벡터는 자극되지 않은 PBMC를 활성화하고 성공적으로 형질도입 및 전이유전자 발현을 초래한다.

[0783] NK 세포(생, CD3-, CD19-, CD56+) 및 B 세포(생, CD3-, CD56-, CD19+)에서 mCherry 발현을 통해 배양물 중의 표적외 형질도입을 조사했다(데이터는 제시되지 않음). NK 세포와 B 세포 모두에서 극히 최소 수준의 mCherry 발현이 관찰되었으며, 이는 표적외 형질도입이 이들 배양물에서 매우 드문 이벤트임을 암시한다.

[0784] 이 데이터는 αCD3-Cocal 벡터가 정규 Cocal 외피를 발현하는 벡터와 유사한 293T 역가로 성공적으로 패키징될 수 있음을 보여준다. 자극되지 않은 인간 PBMC에 첨가된 경우, 벡터는 증가된 CD25 발현 및 형질도입에 의해 나타난 바와 같이 T 세포 활성화를 유도했다. 형질도입 수준은 αCD3-Cocal 벡터에 의해 형질도입된 자극되지 않은 PBMC에서 가장 컸다. 데이터는 바이러스 벡터 입자를 발현하는 αCD3-Cocal이 자극되지 않은 PBMC를 강력하게 활성화하고 형질도입한다는 것을 보여준다.

[0785] Cocal 암호 서열(R345Q)에 "블라인딩" 돌연변이를 함유하는 αCD3-Cocal-위형화된 벡터는 자극되지 않은 PBMC를 형질도입하는 능력에 대해 분석했다. 이러한 입자에 의해 활성화가 유도되었지만, mCherry 발현은 극히 소량이었고, 이는 이 벡터가 T 세포를 낮은 수준으로 형질도입시켰음을 나타낸다.

[0786] PBMC 배양물 내의 다른 세포는 벡터로부터 표적외 형질도입의 지표로서 mCherry의 발현에 대해 분석했다. NK 세포 또는 B 세포의 형질도입은 관찰되지 않았다.

[0787] 데이터는 αCD3-Cocal 외피를 함유하는 입자가 시험관내에서 자극되지 않은 PBMC를 활성화하고 형질도입하며, 따라서 이러한 입자는 생체내 CAR T 세포 제조에 적합한 후보임을 보여준다.

[0788] ***실시예 2: Cocal 대 αCD3-Cocal 대 αCD3-Cocal(블라인드) 바이러스 입자 외피 비교 및 T 세포의 시험관내 형질도입***

[0789] 이 연구는 Cocal 당단백질에 의해 조작된 렌티바이러스 입자 표면에 의한 T 세포의 시험관내 형질도입을 평가했고 RACR 구성요소에 더하여 αCD19 CAR을 함유하는 전이유전자를 패키징했다. 실험 판독값은 유세포분석에 의해 CAR+ T 세포에 대해 측정된 자극되지 않은 PBMC의 형질도입이었다. 이 연구는 또한 벡터 전이유전자에서 2A 절단 펩타이드에 특이적인 항-2A 유동 시약에 의한 염색도 포함했다.

[0790] 이 연구의 또 다른 목적은 2개의 외피 플라스미드 백본을 사용하여 벡터 입자 생산을 조사하는 것이었다. 하나는 CMV 프로모터를 사용했고 다른 하나는 MND 프로모터를 사용했다. MND 프로모터-함유 플라스미드는 또한 우드척(Woodchuck) 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE) 서열도 갖고 있었다. WPRE 서열은 바이러스 입자 페이로드의 전사를 향상시키기 위해 포함된다.

[0791] %CAR+ T 세포를 조사하는 것 외에, CD19+ Raji 세포로 자극 후 사이토카인을 분비하는 능력에 의해 바이러스 입자를 분석했다.

[0792] **PBMC 형질도입 및 CAR+ 세포 유세포분석을 위한 염색**

[0793] PBMC를 해동하고, 10ml RPMI 완전 배지에 재현탁하고, PBMC를 완전 RPMI 배지에서 1e6 세포/ml로 희석했다. IL-2를 50U/ml의 최종 농도로 첨가했다. PBMC는 다양한 자극을 위해 2x 그룹으로 분리했다.

[0794] 그룹 #1 - 1 ng/ml의 최종 농도로 첨가된 블리나투모맙

[0795] 그룹 #2 - IL-2 단독

[0796] 각 그룹에 대해 5ml의 자극 용액을 비-TC 처리된 6웰 플레이트에 첨가하고 37℃에서 3일 동안 인큐베이션했다. 세포를 계수하고 펠릿화했다. 이어서, 세포를 1e6 세포/ml로 신선한 완전 RPMI 배지에 최종 농도 50U/ml의 IL-2

와 함께 재현탁시켰다. 비-TC-처리된 24웰 플레이트의 웰에 1ml(1e6 세포)를 첨가했다. 100ul의 Amicon-농축된 제조물을 플레이트에 첨가하고 혼합한 후 37℃ 인큐베이터에 넣었다.

[0797] 4일 후, 라파마이신을 10nM의 최종 농도로 첨가했다. 11일 후, (바이러스 15일 후) 세포를 혼합하고 96웰 V-바닥 플레이트의 웰에 200ul를 첨가했다. 이어서 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척했다. 세포 펠릿을 Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁시키고 4℃에서 20분 동안 인큐베이션한 다음, 200ul FACS 완충액에서 추가 세척했다. 세포를 50ul의 FACS 완충액 + CD19-FITC 접합체(2ug/ml)에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척하고, 100ul BD Cytofix/Cytoperm™에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션했다.

[0798] 이어서, 세포를 1x BD Perm/Wash™ 완충액("Perm Wash") 완충액으로 세척하고, 항-2A-af647(1:100)을 함유한 50ul 1x Perm Wash 중에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0799] **사이토카인 생산을 위한 Raji 자극**

[0800] 형질도입 13일 후, 250ul의 PBMC를 96웰 V-바닥 플레이트에서 100,000개의 Raji 세포에 첨가했다. 세포를 펠릿화하고 골지 저해제 브렐딘(Breldin) A(1:1000) 및 모넨신(1:1000)을 함유하는 100ul 세포 자극 배지에 재현탁시켰다. 세포를 펠릿으로 간단히 원심분리하고, 5시간 동안 인큐베이션하고, 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척하고, Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척하고, FACS 완충액에 희석된 표면 항체 칵테일 50ul에 재현탁하고 4℃에서 20분 동안 인큐베이션했다.

[0801] 사용된 희석된 표면 항체 칵테일:

[0802] a. 항 CD3-Percp 1:100

[0803] b. 항 CD4-BV650

[0804] c. 항 CD8-BV605

[0805] 인큐베이션 후, 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척하고, 100ul BD Cytofix/Cytoperm™에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 1x Perm Wash에 희석된 50ul 세포내 항체 칵테일에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션했다.

[0806] 사용된 희석된 세포내 항체 칵테일:

[0807] a. 항-2A-af647

[0808] b. 항-IL-2-PEcy7

[0809] c. 항-IFNg-BV421

[0810] d. 항-GzmB-FITC

[0811] e. 항-TNFα-PE

[0812] 인큐베이션 후, 세포를 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0813] **결과 및 결론**

[0814] 세포는 다음 플라스미드로 형질도입시켰다:

[0815] 1. MND 프로모터 및 Cocal 표면 외피(서열번호 10) 단백질과 함께 항-CD19 scFv CAR 대신 mCherry를 발현하는 VT103 전이유전자 플라스미드(VT103 MND-Cocal)

[0816] 2. MND 프로모터 및 Cocal 표면 외피(서열번호 10) 단백질과 함께 RACR 구성요소에 더하여 αCD19 CAR을 함유하는 전이유전자 플라스미드(RACR-αCD19 MND-Cocal)

[0817] 3. CMV 프로모터 및 Cocal 표면 외피(서열번호 10) 단백질과 함께 RACR 구성요소에 더하여 αCD19 CAR을 함유하는 전이유전자 플라스미드(RACR-αCD19 CMV-Cocal)

[0818] 4. CMV 프로모터 및 αCD3-Cocal 표면 외피 단백질(서열번호 129)과 함께 RACR 구성요소에 더하여 αCD19 CAR을

함유하는 전이유전자 플라스미드(RACR-αCD19 CMV-αCD3-Cocal)

[0819] 5. CMV 프로모터 및 αCD3-블라인드 Cocal 변이체 표면 외피 단백질과 함께 RACR 구성요소 외에 αCD19 CAR을 함유하는 전이유전자 플라스미드(RACR-αCD19 CMV-αCD3-(B)Cocal)

[0820] 라파마이신 첨가 11일 후(최종 농도 10nM), PBMC를 수확하고 αCD19 CAR 및 세포내 2A 발현에 대해 유세포분석으로 분석했다. 라파마이신과 함께 배양한 후, 자극되지 않은(도 3) 및 블리나투모맙-자극된(도 4) PBMC 세포 모두는 αCD19 CAR의 향상된 발현을 보여주었다. 항-2A 시약을 사용한 염색은 성공적이었고 CD19-FITC 시약보다 양성 및 음성 세포의 더 나은 분리를 제공했다(도 3 및 도 4, 하단 패널). 데이터는 2A 펩타이드에 대한 염색이 CAR의 표면 발현에 대한 염색의 실행 가능한 대안임을 보여준다.

[0821] CAR T 세포 기능성을 결정하기 위한 자극 검정을 수행했다. 자극되지 않은 RACR-αCD19 CAR/αCD3-Cocal-형질도입된 웰의 100,000개 PBMC를 골지 저해제 브레펠딘 A 및 모넨신의 존재 하에 100,000개의 Raji 세포와 함께 5시간 동안 공동배양했다. 그런 다음 세포를 수확하고 표면 마커 및 세포내 사이토카인에 대해 염색하고 유세포분석으로 분석했다. Raji 자극 시, CD8(도 5) 및 CD4(도 6) CAR+ T 세포 둘 모두는 PMA+이오노마이신-자극된 대조군과 유사한 수준으로 IFNg, IL-2 및 TNFa를 쉽게 생성했다. 추가 대조군으로서, PBMC만의 음성 대조군 웰에서는 사이토카인 생성이 없었다. 이러한 데이터는 RACR-αCD19 CAR 페이로드를 암호화하는 αCD3-Cocal-위형 벡터 입자가 자극되지 않은 PBMC를 성공적으로 형질도입할 수 있음을 보여준다. 또한, 약 2주 동안 라파마이신을 사용한 배양물은 αCD19 CAR의 표면 발현을 크게 향상시켰다. CAR+ 세포는 Raji 자극 시 IFNg, IL-2 및 TNFa의 생산에 의해 입증된 바와 같이 라파마이신 배양 후에도 여전히 고도로 기능적이었다. 따라서, RACR-αCD19/αCD3-Cocal 벡터에 의해 형질도입되고 라파마이신에서 배양된 자극되지 않은 PBMC는 기능적이며 Raji 세포 자극 시 IFNg, IL-2 및 TNFa를 생산한다.

[0822] αCD3-Cocal-위형화된 바이러스 입자는 RACR-αCD19 CAR 페이로드에 의해 패키징될 수 있다. 라파마이신에서 연장된 배양 후, 입자는 자극되지 않은 PBMC를 형질도입할 수 있었다. CD19+ Raji 세포로 자극하면 αCD19 CAR-형질도입된 T 세포는 IFNg, IL-2 및 TNFa 사이토카인을 강력하게 생산하여 강력한 Th1-유사 표현형 및 높은 수준의 기능성을 나타낸다.

[0823] 이 연구는 또한 MND 프로모터 백본에서 발현된 외피를 사용한 벡터 패키징 및 293T 형질도입이 CMV-유도 외피 플라스미드를 사용한 경우보다 더 크다는 것을 보여주었다.

[0824] ***실시예 3: αCD19 CAR-TGFβ 페이로드를 갖는 Cocal 대 αCD3-Cocal 바이러스 입자 외피 비교 및 T 세포의 시험관내 형질도입***

[0825] 이 연구의 목적은 다음 페이로드 벡터를 포함하는 렌티바이러스 입자의 검출 가능성 및 기능에 대한 αCD3-Cocal-위형화된 바이러스 입자 페이로드의 효과를 결정하는 것이었다: αCD19 CAR-TGFβ 페이로드 및 RACR-αCD19 CAR 페이로드. 동일한 페이로드를 포함하는 정규 Cocal-위형화된 벡터 바이러스 입자와 비교하여 자극되지 않은 인간 PBMC를 활성화하고 형질도입시키는 능력에 대해 2개의 페이로드 설계를 평가했다.

[0826] **바이러스 생산**

[0827] 28e6 293T 세포를 총 부피 25ml의 완전 DMEM 배지에 각각 28e6 293T 세포를 갖는 16x T175 플라스크(벡터당 8x)에 파종했다. 24시간 후, 세포를 형질감염시켰다. (1x T175 플라스크 스케일용으로 작성된 프로토콜; 모든 시약은 37℃여야 함)

[0828] 다음 DNA를 1ml 무혈청 OptiMEM™ 배지(첨가제 없음)에 첨가했다: 12ug 전달 플라스미드, 6ug Gag/pol 플라스미드, 6ug REV 플라스미드, 6ug 외피 플라스미드. 그런 다음 90ul(90ug) PEI를 배지/DNA 혼합물에 첨가했다. 혼합물을 잘 혼합하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 배지/DNA/PEI 혼합물을 25ml의 신선한 완전 DMEM 배지에 첨가했다. 293T-함유 웰의 파종 배지를 제거하고 형질감염 시약을 함유하는 신선한 배지로 교체하고 37℃ 가습 인큐베이터에 넣었다. 48시간 후, 상청액을 수집하여 냉장고에 저장하고 신선한 DMEM 배지로 교체했다. 다음날, (72시간) 상청액을 수집하고 0.45um PVDF 필터를 통해 여과했다. 상청액을 Amicon-Ultra 15 100K 컬럼을 사용하여 농축하고 3000xg에서 30분 동안 4℃에서 원심분리했다. 그런 다음 바이러스를 사용할 때까지 4℃에서 저장했다.

[0829] 연구를 위해 만든 바이러스 제조물 목록:

[0830] 1. αCD19 CAR-TGFbDN/MND-Cocal, 역가 = 4e7 TU/ml

[0831] 2. αCD19 CAR-TGFbDN/CMV-αCD3-Cocal, 역가 = 1.8e7 TU/ml

[0832] **PBMC 형질도입 및 유세포 분석을 위한 염색**

[0833] 50e6 PBMC를 해동하고 완전 RPMI 배지에서 1e6 세포/ml로 희석했다. IL-2를 50U/ml의 최종 농도로 첨가했다. PBMC는 다양한 자극을 위해 2x 그룹으로 분리했다.

[0834] 그룹 #1 - IL-2 단독(50U/ml)

[0835] 그룹 #2 - αCD3/αCD28 Dynabeads 첨가됨

[0836] 각 그룹을 37℃에서 밤새 인큐베이션했다. 적용가능한 웰로부터 비드를 제거하고, 세포를 계수하고 펠릿화했다. 이어서, 세포를 1e6 세포/ml로 신선한 완전 RPMI 배지에 50U/ml 최종 농도의 IL-2와 함께 재현탁시켰다. 비-TC-처리된 48웰 플레이트의 웰에 500ul(5e5 세포)을 첨가했다. MOI=2, 1, 0.5(293T 역가 기준)의 Amicon 농축 제조물을 플레이트에 첨가한 후 37℃ 인큐베이터에 넣었다.

[0837] a. αCD19 CAR-TGFb/αCD3-Cocal(50ul, 25ul 및 12.5ul)

[0838] b. αCD19 CAR-TGFb/Cocal (25ul, 12.5ul, 6.25ul)

[0839] 3일 후, 벡터를 세척하고 500ul 신선한 RPMI 배지 + IL-2(50U/ml)로 교체했다. 세포를 혼합하고 활성화 유세포 분석을 위해 96웰 V-바닥 플레이트의 웰에 100ul를 첨가했다. 이어서 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척했다. 세포 펠릿을 Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁하고 4℃에서 20분 동안 인큐베이션한 다음, 200ul FACS 완충액으로 추가 세척했다. 세포를 50ul의 FACS 완충액 + 표면 염색 칵테일에 재현탁하고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척했다.

[0840] 사용된 희석된 표면 염색 칵테일:

[0841] a. CD19-FITC 1:50

[0842] b. 항-CD3-Percp 1:100

[0843] c. 항-CD4-BV650 1:200

[0844] d. 항-CD8-BV605 1:200

[0845] e. 항-CD25-PECy7 1:100

[0846] 이어서, 세포 펠릿을 100ul의 BD Cytofix/Cytoperm™에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 항-2A-af647(1:100)을 함유한 50ul 1x Perm Wash에 재현탁시키고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0847] 3일 후, CD25 분석 후, 형질도입 유세포 분석을 위해 세포를 혼합하고 96웰 V-바닥 플레이트의 웰에 100ul를 첨가했다. 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척하고, Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척하고, 50ul FACS 완충액 + 표면 염색 칵테일에 재현탁하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션했다.

[0848] 사용된 희석된 표면 염색 칵테일:

[0849] a. CD19-FITC 1:50

[0850] b. 항-CD3-Percp 1:100

[0851] c. 항-CD4-BV650 1:200

[0852] d. 항-CD8-BV605 1:200

[0853] 인큐베이션 후, 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척하고, 100ul BD Cytofix/Cytoperm™에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 항-2A-af647 함유 1x Perm Wash 50ul에 재현탁하고(1:100), 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0854] **결과 및 결론**

[0855] αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 바이러스 벡터 입자가 인간 T 세포를 활성화할 수 있는지 평가하기 위해, 벡터 입자를 여러 MOI로 인간 PBMC에 첨가했다. 3일 후, 바이러스를 제거하고 세포에 신선한 배지를 제공하고 활성화 마커 CD25에 대해 분석했다. αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 입자는 CD4 및 CD8 T 세포 모두를 강력하게 활성화시켰다(도 7a 및 7b). 또한, CD25 상향조절은 용량 의존적이었다(도 7b). 정규 Cocal 외피에 의해 위형화된 바이러스 입자는 αCD3-Cocal 입자와 비교하여 최소 수준의 CD25를 유도했다(도 7a).

[0856] 형질도입을 조사하기 위해, 벡터 첨가 총 6일 후에 샘플을 αCD19 CAR 및 2A 발현에 대해 분석했다. 3일째 CD25 발현을 반영해보면, αCD3-Cocal-위형화된 입자는 자극되지 않은 PBMC를 형질도입할 수 있는 반면, Cocal-위형화된 입자는 그렇지 않았다(도 8a). 또한, 형질도입은 CD4 및 CD8 T 세포 모두에서 용량 의존적 방식으로 일어났다(도 8b). 데이터는 αCD19 CAR-TGFβDN/αCD3-Cocal 입자가 시험관내에서 자극되지 않은 PBMC를 효율적으로 활성화하고 형질도입시킨다는 것을 보여준다.

[0857] 형질도입 후 6일째 자극되지 않은 PBMC에서 αCD19 CAR 발현을 분석하는 것 외에도, 3일째(활성화가 분석된 경우) 및 다시 12일째에 CAR 발현을 분석하여 CAR 발현 분석을 위한 최적 타이밍을 결정했다. 테스트된 모든 MOI에 걸쳐 CD4(도> 9a) 및 CD8(도 9b) T 세포 모두에 대해, αCD19 CAR을 발현하는 T 세포의 백분율은 6일째에 정점에 달했고 12일까지 비교적 안정하게 유지되는 것으로 밝혀졌다(도 9). 이러한 데이터는 유세포분석에 의해 CAR 표면 발현이 측정된 것으로서 형질도입 효율을 조사하는 것이 형질도입 후 대략 1주째에 최적임을 나타낸다.

[0858] 이 연구는 αCD19 CAR로 이루어진 페이로드를 시험관내에서 자극되지 않은 PBMC로 전달하는 αCD3-Cocal 외피 작제물의 능력을 입증했다. αCD3-Cocal 외피는 CD25 발현에 의해 측정된 바와 같이 T 세포의 활성화를 유도했고, 이러한 활성화는 αCD19 CAR 및 2A 펩타이드를 발현하는 T 세포의 %에 의해 측정된 형질도입과 상관관계가 있었다. 또한, 활성화 및 형질도입은 용량 의존적 방식으로 일어났다. 이 연구에서 αCD19 CAR 표면 발현은 유세포분석에 의해 분석된 바와 같이 대략 6일째에 정점에 달했고 12일째에 유사했다. 이 데이터는 CAR 페이로드를 시험관내 및 생체내에서 자극되지 않은 PBMC로 전달하는 αCD3-Cocal-위형화된 벡터의 용도를 지지한다.

[0859] ***실시예 4: αCD19 CAR-RACR 배향 비교 및 T 세포의 시험관내 형질도입***

[0860] 이 연구의 목적은 형질도입 후 가장 높은 αCD19 CAR 발현을 갖는 작제물 배열을 평가하는 것이었다.

[0861] 작제물 배향 A) FRB-P2A-RACR-P2A-αCD19 CAR(서열번호 81)

[0862] 작제물 배향 B): αCD19 CAR-P2A-FRB-P2A-RACR(서열번호 61)

[0863] **바이러스 생산**

[0864] 28e6 293T 세포를 각각 총 부피 25ml의 완전 DMEM 배지에서 28e6 293T 세포를 갖는 6x T175 플라스크(벡터당 1x)에 파종했다. 24시간 후, 세포를 형질감염시켰다. (1x T175 플라스크 스케일용으로 작성된 프로토콜; 모든 시약은 37℃여야 함)

[0865] 2.5ml 무혈청 DMEM 배지(첨가제 없음)에 다음 DNA를 첨가했다: 30ug 전달 플라스미드, 15ug Gag/pol 플라스미드, 15ug REV 플라스미드 및 15ug 외피 플라스미드(서열번호 130 또는 128). 그런 다음 225ul(225ug) PEI를 배지/DNA 혼합물에 첨가했다. 혼합물을 잘 혼합하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션했다. 그런 다음 배지/DNA/PEI 혼합물을 25ml의 신선한 완전 DMEM 배지에 첨가했다. 293T 함유 웰의 파종 배지를 제거하고 형질감염 시약을 함유하는 신선한 배지로 교체하고 37℃ 가습 인큐베이터에 넣었다. 48시간 후, 상청액을 수집하여 냉장고에 보관하고 신선한 DMEM 배지로 교체했다. 다음날, (72시간) 상청액을 수집하고 0.45um PVDF 필터를 통해 여과했다. 상청액을 Amicon-Ultra 15 100K 컬럼을 사용하여 농축하고 3000xg에서 30분 동안 4℃에서 원심분리했다. 그런 다음 바이러스를 사용할 때까지 4℃에서 저장했다.

[0866] 연구에 사용된 바이러스 벡터 입자:

[0867] 1. αCD19 CAR-TGFbDN/Cocal(서열번호 92), 역가 = 5.7e7 TU/ml

[0868] 2. αCD19 CAR-TGFbDN/αCD3-Cocal(서열번호 92), 역가 = 4.1e7 TU/ml

[0869] 3. RACR-αCD19 CAR/Cocal, 역가 = 1.3e7 TU/ml

[0870] 4. RACR-αCD19 CAR/αCD3-Cocal, 역가 = 4.5e6 TU/ml

[0871] 5. αCD19 CAR-RACR/Cocal, 역가 = 2.8e7 TU/ml

[0872] 6. αCD19 CAR-RACR/αCD3-Cocal, 역가 = 1e7 TU/ml

[0873] **PBMC 형질도입 및 유세포 분석을 위한 염색**

[0874] PBMC를 해동하고 완전 RPMI 배지에서 1e6 세포/ml로 희석했다. IL-2를 50U/ml의 최종 농도로 첨가했다. PBMC는 다양한 자극을 위해 2x 그룹으로 분리했다.

[0875] 그룹 #1 - IL-2 단독(50 U/ml)

[0876] 그룹 #2 - +αCD3/αCD28 Dynabeads 첨가됨

[0877] 각 그룹을 37℃에서 밤새 인큐베이션했다. 적용가능한 웰로부터 비드를 제거하고, 세포를 계수하고 펠릿화했다. 이어서, 세포를 1e6 세포/ml로 신선한 완전 RPMI 배지에서 50U/ml 최종 농도의 IL-2와 재현탁시켰다. 500ul(5e5 세포)을 비-TC-처리된 48웰 플레이트의 웰에 첨가했다. MOI=1.5(293T 역가 기준)의 Amicon-농축 제조물을 플레이트에 첨가한 후 37℃ 인큐베이터에 넣었다. 전이유전자, 외피 단백질, 293 역가 및 1.5 MOI에 도달하는 데 필요한 ul는 표 1에 제시된다.

표 1

[0878]

그룹	전이유전자	외피	293T 역가	MOI = 1.5 에 필요한 ul
1	αCD19 CAR TGFb	Cocal	5.70E+07	13.2
2	αCD19 CAR TGFb	αCD3-Cocal	4.10E+07	18.3
3	RACR-αCD19 CAR	Cocal	1.30E+07	57.7
4	RACR-αCD19 CAR	αCD3-Cocal	4.50E+06	166.7
5	αCD19 CAR-RACR	Cocal	2.80E+07	26.8
6	αCD19 CAR-RACR	αCD3-Cocal	1.00E+07	75.0

[0879] 3일 후, 벡터를 세척하고 500ul 신선한 RPMI 배지 + IL-2(50U/ml)로 교체했다. 세포를 혼합하고 활성화 유세포분석을 위해 96웰 V-바닥 플레이트의 웰에 100ul를 첨가했다. 그 다음, 세포는 200ul FACS 완충액으로 세척했다. 세포 펠릿을 Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁하고 4℃에서 20분 동안 인큐베이션한 다음, 200ul FACS 완충액으로 추가 세척했다. 세포를 50ul의 FACS 완충액 + 표면 염색 칵테일(아래 참조)에 재현탁하고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척했다.

[0880] 사용된 희석된 표면 염색 칵테일:

[0881] a. CD19-FITC 1:50

[0882] b. 항-CD3-Percp 1:100

[0883] c. 항-CD4-BV650 1:200

[0884] d. 항 CD8-BV605 1:200

[0885] e. 항-CD25-PECy7 1:100

[0886] 그 다음, 세포 펠릿을 100ul의 BD Cytofix/Cytoperm™에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 항-2A-af647을 함유하는 50ul 1x Perm Wash에 재현탁하고(1:100), 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0887] CD25 분석 5일 후(벡터 첨가 8일 후), 세포를 혼합하고 형질도입 유세포분석을 위해 96웰 V-바닥 플레이트의 웰에 100ul를 첨가했다. 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척하고, Live/Dead™ Stain(1:1000)을 함유하는 100ul PBS에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 200ul FACS 완충액으로 세척하고, 50ul FACS 완충액 + 표면 염색 칵테일(아래 참조)에 재현탁하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션했다.

[0888] 사용된 희석된 표면 염색 칵테일:

[0889] a. CD19-FITC 1:50

[0890] b. 항-CD3-Percp 1:100

[0891] c. 항-CD4-BV650 1:200

[0892] d. 항 CD8-BV605 1:200

[0893] 인큐베이션 후, 세포를 200ul FACS 완충액으로 세척하고, 100ul BD Cytofix/Cytoperm™에 재현탁하고, 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 항-2A-af647을 갖는 50ul 1x Perm Wash에 재현탁하고(1:100), 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 1x Perm Wash 완충액으로 세척하고, 100ul FACS 완충액에 재현탁하고 유세포분석으로 분석했다.

[0894] **결과 및 결론**

[0895] 상기 기재된 3개의 전이유전자 플라스미드를 함유하는 바이러스 벡터 입자를 Cocal 또는 αCD3-Cocal 외피 단백질로 패키징하고 제조물을 293T 세포에 대해 적정했다(도 10). αCD19 CAR-TGFbDN 전이유전자를 함유하는 바이러스 벡터 입자는 어느 배향으로든지 αCD19 CAR-RACR을 함유하는 제조물보다 더 높은 역가를 나타냈다. 2개의 RACR-함유 작제물을 비교했을 때, αCD19 CAR을 RACR 구성요소 앞에 배향시킬 때(작제물 배향 B) 더 높은 역가가 달성되었다. 이것은 Cocal 위형화된(도 10a) 및 αCD3-Cocal-위형화된(도 10b) 바이러스 입자 모두에 대해서도 마찬가지였다.

[0896] 분석된 배향: αCD3-Cocal 외피에 의해 위형화된 αCD19 CAR-RACR 및 RACR-αCD19 CAR 입자는 둘 모두가 자극되지 않은 T 세포를 활성화한다(데이터는 제시되지 않음). 항-CD3/항-CD28 dynabeads+IL-2 또는 IL-2 단독의 존재 하에 PBMC에, 농축된 바이러스 벡터 입자를 첨가했다. 3일 후 PBMC를 세척하고, 비드를 제거하고, PBMC를 IL-2를 함유하는 신선한 배지에 재현탁시켰다. 그 다음, CD25 발현에 의한 활성화를 유세포분석으로 분석했다. Cocal-위형화된 벡터는 CD25의 유의미한 상향조절을 유도하지 않았다. 대조적으로, CD8 및 CD4 T 세포 모두에서 강력한 CD25 상향조절이 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음). 유사한 수준의 CD25가 RACR-αCD19 CAR 및 αCD19 CAR-RACR 배향 작제물 모두에서 관찰되었다. 데이터는 RACR-αCD19 CAR 및 αCD3-Cocal로 위형화된 αCD19 CAR-RACR 배향된 벡터 입자가 자극되지 않은 T 세포를 강력하게 활성화한다는 것을 보여준다.

[0897] 벡터 형질도입 8일 후(활성화 검출 5일 후) T 세포에서의 αCD19 CAR 및 2A 발현을 분석하여 T 세포 형질도입을 평가했다. αCD19 CAR 표면 발현은 αCD19 CAR-TGFbDN-형질도입된 세포에서 검출되었다(도 11a). αCD19 CAR 표면 발현 및 2A 펩타이드의 세포내 발현은 RACR-αCD19 CAR 작제물로 형질도입된 T 세포에서 검출되지 않았다(도 11b). 대조적으로, αCD19 CAR 표면 발현 및 2A 펩타이드의 세포내 발현은 αCD19 CAR-RACR 작제물에 의해 형질도입된 T 세포에서 검출되었다(도 11c). RACR-αCD19 CAR 작제물 입자를 사용할 때 나타나는 형질도입의 결여는 바이러스 형질도입 전에 항-CD3/항-CD28 자극 비드의 첨가에 의해 구제되지 않았다(데이터는 제시되지 않음). CD4 T 세포에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었다(데이터는 제시되지 않음). 데이터는 αCD19 CAR 및 RACR 배향이 중요한 고려 사항이며 αCD19-RACR 배향이 더 높은 검출가능성과 제조가능성을 산출한다는 것을 보여준다.

[0898] 놀랍게도, 이 데이터는 CAR 5' 및 RACR 3'를 갖는 작제물 둘 모두가 바이러스 입자의 293T 역가를 증가시키고 형질도입된 T 세포 상의 CAR을 유세포분석에 의해 검출하는 능력을 증가시킨다는 것을 보여주었다. αCD19-RACR 전이유전자는 αCD3-Cocal 외피로 효과적으로 패키징되었으며 이 입자는 시험관내에서 자극되지 않은 PBMC를 형질도입시켰다.

[0899] ***실시예 5: 바이러스 입자 페이로드 유전자 순서 비교 및 T 세포의 시험관내 형질도입***

[0900] 이 연구의 목적은 Frb-RACR 및 αCD19-CAR과 같은 기능적 요소로 구성된 렌티바이러스 페이로드의 검출 가능성 및 기능에 대한 순서의 효과를 결정하는 것이었다. Frb-RACR 요소는 라파마이신이 배양물에 첨가될 때 세포에 선택적 이점을 제공한다. αCD19-CAR 요소는 T 세포를 CD19+ 표적 세포로 표적화한다. 두 요소는 함께 라파마이신이 풍부하고 CD19+ 표적 세포에 세포독성인 CAR-T 세포를 생성한다. 평가된 2개의 페이로드 설계는 폴리시스트론 전사체에서 요소들이 발현되는 순서만이 다르다. 이 연구는 발현의 차이가 1) 유세포분석에 의한 페이로드 검출(2A 항체), 2) CAR-T 세포 라파마이신 반응, 및 3) CAR-T 세포 CD19+ 세포 세포독성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 두 배향 모두에서 페이로드의 기능적 측면을 테스트했다.

[0901] 2개의 페이로드 설계가 평가되었다:

[0902] 1. MND 프로모터 - FRB -- P2A - RACRβ - P2A - RACRɣ - P2A - CAR(서열번호 81)

[0903] 2. MND 프로모터 - CAR - P2A--FRB -- P2A - RACRβ - P2A - RACRɣ(서열번호 61)

[0904] **연구 프로토콜**

표 2

시간표	활성
0 일	• PBMC 공여자 6094BW 를 해동하고 비드-활성화함
	• 48 웰 플레이트에서 0, 0.75, 및 1.5 MOI 로 세포를 형질도입시킴
8 일	• 다음 웰로부터 75,000 세포/웰 (96-웰 플레이트) 를 플레이트함: o 비드-활성화된 PBMC, MOI 1.5 αCD3-cocal RACR-αCD19-CAR o 비드-활성화된 PBMC, MOI 1.5 αCD3-cocal αCD19-CAR-RACR • 비드-활성화된 PBMC, MOI 0 음성 대조군 웰 • 웰에 다음 처리를 2 반복으로 적용함: o 무처리 o 10nM 라파마이신 o 5,000 Raji 세포 o 5,000 Rajis + 10nM 라파마이신 • 추가로, 반복 웰 +/- Rapa 처리의 초과 1 세트에게 웰당 28,000 개의 카운팅 비드를 투여함.
	• 대표적인 웰의 유동 분석 (이하 유동 프로토콜 참조)
15 일	• Vi-Cell Blu 로 세포 계수 • 피펫으로 웰 부피 추정 • 유동 분석
22 일	• Vi-Cell Blu 로 세포 계수 • 피펫으로 웰 부피 추정 • 유동 분석

* 필요한 경우 웰에 새 배지를 첨가했고, 라파마이신 처리된 웰에 10nM 의 라파마이신을 첨가했음. d10, d14, d15, 및 d20 에 배지를 첨가했음.

[0905]

[0906] **결과 및 결론**

[0907] PBMC를 동량의 RACR-αCD19-CAR 및 αCD19-CAR-RACR 벡터 각각으로 처리했다. 동일한 양의 감염 단위로 형질도입되었음에도 불구하고, 형질도입 후 8일차에 αCD19-CAR-RACR 작제물에서만 식별 가능한 2A+ 집단을 볼 수 있었다(도 13c, d8: 검은색 화살표). 라파마이신 선택(10nM)은 15일 및 22일차에 RACR-αCD19-CAR 벡터로 형질감염된 세포에서 2A+ 세포 집단을 드러냈다(도 13b, 빨간색 화살표, 도 14, 빨간색 화살표). 대조적으로, αCD19-CAR-RACR T 세포는 라파마이신 처리와 무관하게 명확한 2A+ 집단을 형성했다(도 13c, 검은색 화살표).

[0908] αCD19-RACR-CAR-T 세포에 대한 라파마이신 농축은 d15에서 쉽게 검출할 수 있었고 22일까지 계속 농축했다. 이러한 농축은 라파마이신에 더하여 Raji 세포를 첨가했을 때 크게 향상되었다(데이터는 제시되지 않음). 농축은 시간이 지남에 따라 CAR-T 세포의 백분율 증가로 정의된다. 농축은 비 CAR-T 세포의 풍부함 감소 및/또는 CAR-T 세포의 풍부함 증가를 통해 일어날 수 있다.

[0909] CAR-T 세포의 확장은 총 CAR-T 세포를 추정하기 위해 세포 수, 배양 부피 및 유세포분석 집단 빈도를 사용하여 측정했다. 게이팅 요구사항은 d15와 22에서 달랐다; 하지만, 각 경우에 형질도입되지 않은 세포는 생물학적 음성 대조군으로 사용했다. 15일차에, 라파마이신-유도 세포 확장은 거의 없었다; 하지만, 22일경에 유의미한 라파마이신-유도 세포 확장이 있었다(도 15). Raji 세포의 첨가를 통한 CAR을 통한 활성화는 라파마이신-유도 확장보다 더 큰 확장을 생산했고, 가장 큰 확장은 라파마이신 첨가 및 Raji 세포 첨가 둘 모두에 의해 일어났다(도 15). 이것은 라파마이신이 세포 확장에 필수적이라는 것을 보여준다.

[0910] CD19 양성 세포에 대한 RACR-αCD19 CAR 및 αCD19 CAR-RACR 벡터의 세포독성을 평가하기 위해, 5,000개의 Raji GFP::ffluc 세포를 형질도입 후 8일차에 라파마이신 유무에 관계없이 배양물에 첨가했다. 5,000개의 Raji

세포 스파이크-인(spike-in)은 αCD19 CAR-RACR에 대한 1.3:1(이펙터:T 세포) 비율에 상응한다. RACR-αCD19 CAR은 d8에 검출할 수 없었기 때문에 정확한 E:T는 해당 샘플에 대해 알 수 없었지만, 약 1.3:1일 가능성이 높다. Raji 세포 공동배양 1주 후, Raji 세포는 라파마이신 첨가와 무관하게 두 αCD19 CAR 벡터에 의해 근절되었다(도 16b 및 16c). 라파마이신의 존재 하에, Raji 세포는 αCD19-CAR의 존재 없이도 축소되었으며, 이는 라파마이신 단독이 Raji 세포 생물학에 중대한 영향을 미친다는 것을 나타낸다(도 16a).

[0911] 이들 데이터는 유세포분석에 의한 페이로드의 검출이 배향에 따라 변동적임을 보여주었다. αCD19 CAR-RACR은 여러 조건과 시점을 따라 검출할 수 있었다. RACR-αCD19 CAR은 형질도입 후 8일차에 검출할 수 없었고 벡터는 형질도입/활성화 후 15일차에 라파마이신 처리에 의해 가장 잘 검출할 수 있었다. 5' 항-CD19 CAR 및 3' RACR로 정렬된 벡터 게놈은 우수한 세포 확장을 생성하며 이의 유세포분석에 의한 검출가능성은 더욱 강력하고 예측가능하다. 놀랍게도, 벡터 게놈이 5'에서 3' 순서로 항-CD19 키메라 항원 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 그 다음 수용체(RACR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 바이러스 입자는 벡터 게놈이 다른 순서로 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해 위치하는 바이러스 입자(항-CD19 CAR에 대해 5'에 수용체)보다 T 세포의 우수한 형질도입 효율을 초래한다.

[0912] 데이터는 또한 라파마이신이 두 배향의 페이로드를 함유하는 CAR-T 세포를 농축시킨다는 것을 보여주었다. 라파마이신 확장은 연구 15일 및 22일 사이에 가장 두드러졌다. 비-라파마이신 처리된 αCD19-CAR-T 세포는 22일경에 비-라파마이신-처리된 세포보다 4.3배 확장되었다(데이터는 제시되지 않음). 가장 큰 T 세포 확장은 Raji 세포 및 라파마이신으로 처리된 CAR-T 세포에서 관찰되었다. 데이터는 또한 αCD19 CAR-RACR 및 RACR-αCD19 CAR 페이로드 배향 둘 모두가 10nM 라파마이신에 의해 성장이 부정적인 영향을 받은 CD19 양성 Raji 세포에 대해 세포독성임을 보여주었다.

[0913] ***실시예 6: 항-CD19 TGFβ-DN CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터에 의한 T 세포의 생체내 형질도입***

[0914] 이 연구는 실시예 1에 기술된 바와 같이 Cocal 당단백질 및 항-CD3 scFv(서열번호 129)로 조작된 렌티바이러스 입자 표면에 의한 T 세포의 생체내 형질도입을 평가했다. 렌티바이러스 입자는 TGFβ 신호전달에 대한 저항성을 제공하도록 설계된 우성-음성 TGFβ 수용체를 갖는 항-CD19 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 렌티바이러스 입자는 CD34+ 인간화 마우스에게 복강내 또는 피하 주사를 통해 전달했다. 연구에 사용된 마우스는 면역-타협되었고, 순환성 인간 T 세포와 B 세포를 생성하는 이식된 인간 조혈 줄기 세포를 함유한다.

[0915] **연구 설계**

[0916] *바이러스 제조, 동물 계통, 세포주*

[0917] 항-CD19 TGFβ-DN CAR 페이로드(서열번호 92)를 운반하는 정규 Cocal 및 조작된 αCD3-Cocal 외피 렌티바이러스 입자는 부착성 293T 세포의 PEI-매개 일시적 형질감염을 사용하여 Umoja Biopharma에 의해 제조되었다. 이러한 제조물은 Amicon 필터를 사용하여 농축했다. 이식 후 19주차에 19마리의 암컷 CD34+ HSC 인간화 마우스(Jackson 실험실)는 기관 지침(Fred Hutchinson Cancer Research Center)에 따라 수용했다.

[0918] **연구 프로토콜**

[0919] 19마리의 암컷 CD34+ 인간화 마우스는 수용 후 1주 동안 적응시켰다. -7일차에, 인간화 정도를 정량화하기 위해 유세포분석을 위해 모든 마우스로부터 혈액을 수집했다. 마우스는 그들의 총 인간 CD3 수준에 따라 표 3에 기술된 치료 부문(arm)으로 무작위 배정했다.

표 3: 연구 치료 그룹

그룹	N	바이러스 유형	투여 경로*	바이러스 용량 (역가 단위)	바이러스 용량 부피
1	4	Cocal	IP	9100 만 TU 0 일	500μL
2	4	Cocal	SC	9100 만 TU 0 일	500μL
3	3	αCD3 Cocal	IP	9100 만 TU 0 일	500 μL
4	4	αCD3 Cocal	SC	9100 만 TU 0 일	500μL
5	3	비히클	SC	비히클 0 일	500μL

[0920]

[0921] **연구 시간표**

[0922] 연구 0일차(SD0)에 상기 표에 따라 마우스에게 바이러스 입자를 투여하고 연구 기간 동안 유세포분석에 의한 분석을 위해 주 1회 말초 혈액을 수집했다.

[0923] SD28에 마우스를 희생시키고, 유세포 분석 및 조직학을 위해 각 마우스로부터 말초 혈액, 비장 및 골수를 수집했다.

[0924] **결과 및 결론**

[0925] 유세포분석에 의한 혈액 분석을 사용하여 마우스를 인간 CD3+ 세포의 풍부도에 의해 치료 부문으로 무작위로 배정했다. 말초 혈액에서 인간 CD3+ 세포의 빈도를 정량화하기 위해 다음 게이팅 전략을 사용했다: hCD3+의 분획에 인간화 분획(hCD45+)을 곱하여 hCD3+의 상대적 풍부도를 수득했다. 인간 B 세포, T 세포 및 CAR+ 세포는 카운팅 비드를 사용하여 유세포분석으로 정량화했다.

[0926] 연구 내내 약간의 체중 감소가 발생했지만 모든 그룹이 대체로 회복되었고 유의미한 추세는 관찰되지 않았다. 연구 종료 시 비장 무게는 그룹 간에 유사했다.

[0927] T 세포, B 세포, CD71+ T 세포(활성화 마커) 및 CAR+ 세포는 연구 내내 말초 혈액에서 정량화했다. T 세포 수는 유의미한 추세가 관찰됨이 없이 활성화 수준과 마찬가지로 연구 전반에 걸쳐 변동되었다(데이터는 제시되지 않음). 인간 B 세포의 풍부도는 CD34-인간화 마우스 모델에서의 이동으로 인해 모든 그룹에서 연구 동안 점차적으로 떨어졌지만, 총 B 세포 고갈은 7일경에 αCD3-Cocal 및 cocal IP-투여 그룹에서 관찰되었다(데이터는 제시되지 않음). 14일차에, CAR+ T 세포는 IP 경로를 통해 αCD3-Cocal로 처리된 마우스의 혈액에서만 배경 수준 이상으로 검출되었다(데이터는 제시되지 않음).

[0928] CAR+ 세포는 αCD3-Cocal IP-투여된 마우스(도 17a)의 CD3+ T 세포에서만 유세포분석에 의해 검출되었고, 임의의 비-CD3+ 세포(도 17b)에서는 검출되지 않았으며, 이는 CD3+ T 세포에 대한 CAR 형질도입의 선택성을 시사한다. 말초 혈액의 14일차 유세포분석 데이터는 αCD3-Cocal IP 투여 그룹에서 T 세포의 CAR+ 집단이 CD8+ 세포에 대해 강력하게 농축된 반면, 비-CAR+ 집단은 CD4 및 CD8의 비율이 대략 동일함을 보여주었다(데이터는 제시되지 않음).

[0929] 연구 14일차에, 혈액 펠릿에서 WPRE에 대한 ddPCR은 CAR이 αCD3-Cocal IP-투여된 마우스에서만 검출되었음을 확인시켜 주었다(데이터는 제시되지 않음). 연구 종료 시, B 세포(도 18a) 및 T 세포(도 18b)는 마우스의 말초 혈액, 골수 및 비장에서 유세포분석에 의해 평가했다. 완전한 B 세포 고갈은 IP 경로를 통해 αCD3-cocal 입자로 처리된 마우스에서 관찰되었으며, 이는 αCD3-Cocal 조작된 렌티바이러스 입자 형질도입된 T 세포의 강력한 사멸 효능을 시사한다. 대조적으로, B 세포의 불완전한 고갈은 IP 경로를 통해 Cocal 입자(비-αCD3)로 처리된 마우스에서 관찰되었고, 이는 골수에서 가장 두드러졌다.

[0930] 요약하면, 복강내로 전달되었을 때, 900만 TU의 αCD3-Cocal 조작된 렌티바이러스 입자는 생체내에서 T 세포를 성공적으로 형질도입시켰고 분석된 모든 조직에서 신속하고 완전한 B 세포 고갈을 유발했다.

[0931] 요약: 표적외 형질도입은 관찰되지 않았다(도 17). IP에 의해 αCD3-Cocal 조작 입자를 투여받은 마우스에서 B 세포는 주입 후 7일차부터 혈액에서 전혀 검출되지 않았다. 혈액, 골수 및 비장에서 B 세포는 연구가 종료된 4주 후에 검출되지 않았다. 주사 후 14일차에 IP를 통해 αCD3-Cocal 조작된 입자로 처리된 마우스의 혈액으로부터의 CAR 양성 세포는 CAR 음성에 비해 CD8+ 세포가 농축되었으며, 이는 세포독성 이펙터 세포의 확장 및 농축을 나타낸다. IP에 의해 αCD3-Cocal 입자로 처리된 마우스의 혈액에서 CD3+ T 세포의 생체내 형질도입은 WPRE 서열을 검출하기 위해 ddPCR에 의해 확인되었다. IP를 통해 Cocal 입자를 투여받은 마우스에서도 말초 혈액 B 세포 고갈이 관찰되었지만(도 3a), CAR+ 세포는 유세포분석 또는 ddPCR에 의해 검출되지 않았다.

[0932] ***실시예 7: 항-CD19 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터에 의한 T 세포의 생체내 형질도입 및 항-B 세포 활성***

[0933] 이 연구의 목표는 gag/pol(서열번호 131) 및 Rev 단백질(서열번호 132)을 포함하는 헬퍼 플라스미드와 함께 αCD3-Cocal 외피(서열번호 128)에 패키징된 αCD19 CAR-RACR 페이로드(서열번호 121)를 사용하여 CD34 인간화 NSG 마우스에서 항-CD19 CAR T 세포의 생체내 형질도입을 평가하는 것이었다. 이 연구에서 αCD19 CAR-RACR αCD3-Cocal 렌티바이러스 입자는 CD34 인간화 모델에서 B 세포를 고갈시키는 능력에 대해 평가했다. 또 다른 연구 목표는 라파마이신 투여가 B 세포 고갈 과정 또는 CAR T 세포 확장 과정을 변경했는지 결정하는 것이었다.

[0934] *바이러스 제조 및 QC 데이터*

[0935] 렌티바이러스는 초원심분리에 의해 농축시켰고, 293T 세포에 대해 적정하고, 동결보존하고, 사용할 때까지 -80℃에 저장했다. 동물 연구에 사용된 모든 제조물은 마이코플라스마에 대해 테스트했고 오염에 대해 음성으로 인증되었다. 내독소 활성은 모든 로트(lot)에 대해 1 EU/mL 미만이었다.

[0936] 역가가 1.6x10^8/mL인 αCD19 CAR-TGFB αCD3-Cocal 바이러스 입자는 실온에서 또는 수동으로 해동시켰다. 바이러스 290uL를 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution) 1mL로 희석하고 얼음에 보관했다. 각 마우스에게 주사당 250uL를 복강내로 제공했다(총 4마리 마우스). 역가가 4x10^7 TU/mL인 4.7mL αCD19 CAR-RACR αCD3-Cocal 바이러스 입자를 해동시켰고 0.5mL HBSS로 희석하고 얼음에 보관했다. 각각의 마우스에게 주사당 250uL를 복강내로 제공했다(총 16마리의 마우스).

[0937] **연구 프로토콜**

[0938] CD34+ HSC 이식 후 21주령 및 16주령의 암컷 HuNSG 마우스를 본 연구에 사용했다. 마우스는 연구를 시작하기 전에 시설에 도착한 후 1주일 동안 휴식을 취했다. 마우스에게서 채혈하고 생착 매개변수에 기초하여 표 4에 기술된 처리군으로 무작위로 배정했다:

표 4

[0939]

그룹	N	바이러스 (900 만 TU IP 0 일)	라파마이신 1mg/kg IP 월요일/수요일/금요일 2 일차에 시작
1	6	비히클	비히클
2	6	비히클	라파마이신
3	8	αCD19 CAR-RACR 전이유전자, 항-CD3 Cocal 외피	비히클
4	8	αCD19 CAR-RACR 전이유전자, 항-CD3 Cocal 외피	라파마이신
5	4	αCD19 CAR-TGFB DNRII 전이유전자, 항-CD3 cocal	비히클

[0940] *치료 일정:*

[0941] 모든 연구 부문의 마우스는 동일한 일정으로 바이러스 또는 비히클로 처리(연구 0일)한 후 연구 2일부터 라파마이신 또는 비히클을 주사했다.

[0942] *조직 수집 일정:*

[0943] 연구 부문 1-4의 마우스는 2개의 동일한 엔드포인트 그룹 A 및 B로 나누어 보다 빈번한 채혈 및 2가지 최종 수

확물을 얻었다. 연구 부문 5의 마우스는 "B" 엔드포인트 그룹과 동일한 엔드포인트 일정을 할당받았다.

[0944] *그룹 A 엔드포인트 일정:*

[0945] 연구 3일차에 A 엔드포인트 그룹으로부터 혈액을 수집하고 연구 10일차에 마우스를 안락사시켰다. 모든 마우스로부터 대략 75%의 비장 및 1개의 대퇴골을 수집하고 조직의 약 20배 부피의 10% 중성 완충 포르말린(NBF)에 72시간 동안 고정시키고, 프로세싱 및 파라핀 매립을 위해 4℃에서 유지시켰다. 최종 혈액, 비장의 작은 절편 및 대퇴골 1개를 유세포분석을 위해 얼음 위의 PBS에 두었다.

[0946] *그룹 B 엔드포인트 일정:*

[0947] B 엔드포인트 그룹에서는 혈액을 주 1회 수집했다. 체중은 연구 기간 동안 주 2회 측정했다. 그룹 B 마우스는 29일차에 수확했다. 모든 마우스에서 약 75%의 비장 및 1개의 대퇴골을 수집하고 조직의 약 20x 부피의 10% 중성 완충 포르말린(NBF)에 72시간 동안 고정시키고, 70% 에탄올로 옮기고, 프로세싱 및 파라핀 매립을 위해 4℃에 보관했다. 최종 혈액, 비장의 작은 절편 및 대퇴골 1개를 유세포분석을 위해 얼음 위의 PBS에 두었다. 연구 일정은 표 5에 제시된다.

표 5

[0948]

그룹	N	900 만 TU 바이러스 IP (0 일)	라파마이신 IP (2 일차에 시작한 MWF 일정)	혈액	수확
1A	3	무첨가	무첨가	3 일	10 일
1B	3	무첨가	무첨가	7, 14, 23 일	29 일
2A	3	무첨가	1mg/kg	3 일	10 일
2B	3	무첨가	1mg/kg	7, 14, 23 일	29 일
3A	4	αCD19-CAR RACR	무첨가	3 일	10 일
3B	4	αCD19-CAR RACR	무첨가	7, 14, 23 일	29 일
4A	4	αCD19-CAR RACR	1mg/kg	3 일	10 일
4B	4	αCD19-CAR RACR	1mg/kg	7, 14, 23 일	29 일
5	5	αCD19 CAR TGFβ	무첨가	7, 14, 23 일	29 일

[0949] **결과 및 결론**

[0950] 유세포분석에 의한 분석을 위해, 모든 세포는 잔해 배제, 단세포(singlet) 구별, 생세포 구별, 및 인간 CD45의 발현에 의해 게이팅했다. B 세포는 인간 CD20+CD3-로 정의되었다. T 세포는 인간 CD3+CD20-으로 정의되었다. CAR+ 이벤트는 CD19-FITC 양성 또는 항-2A 펩타이드 APC 양성으로 정의되었다. 음성 게이트는 어떤 바이러스도 투여받지 않은 마우스로부터의 염색된 샘플에 의해 설정되었다. 양성 염색은 배양된 CAR T 세포를 사용하여 검증했다. 활성화를 위한 1차 마커로서 CD71의 발현에 대해 T 세포를 추가로 분석했다.

[0951] 놀랍게도, αCD19 CAR-RACR 및 αCD19 CAR-TGFβ로 처리된 마우스는 바이러스 투여 7일 후부터 시작해서 연구 종료시 거의 검출할 수 없는 B 세포의 최저점에 도달하는 심각한 B 세포 고갈을 나타냈다. 대조적으로, 비히클로 처리된 마우스는 CD34-인간화 모델에서 보고된 바와 같이, 시간 경과에 따라 순환 B 세포의 점진적인 감소를 나타냈다(도 19a). 비장(도 19b) 및 골수(도 19c)는 연구 10일 및 29일째에 마우스로부터 채취하고 B 세포 집단을 평가했다. 연구 10일째에, 렌티바이러스로 처리된 마우스의 비장에서 B 세포 집단은 비히클로 처리된 마우스와 비교하여 대략 70% 감소했다(도 19b, 외쪽 패널). 연구 29일째에, 렌티바이러스-처리된 마우스의 비장 B 세포 집단은 비히클로 처리된 마우스의 것과 비교하여 >95% 감소했다(도 19b, 오른쪽 패널). 골수에서 B 세포 집단은 10일째 모든 연구 부문 사이에서 동일했고, 연구 29일째에 렌티바이러스-처리된 부문에서 70%까지 감소했

다(도 19c, 오른쪽 패널). B 세포는 7일째부터 먼저 혈액에서, 그 다음에는 10일째에 비장에서, 29일째에는 골수에서 현저하게 고갈되었다. B 세포 고갈은 항-CD19 CAR 활성과 일치했다. 라파마이신은 렌티바이러스 처리된 마우스 또는 비히클 처리된 마우스에서 B 세포 고갈 과정에 영향을 미치지 않았다.

[0952] 인간화율(humanization rate)은 연구 기간 동안 상대적으로 일정하게 유지되었고 연구 부문 간에 차이가 없었다. 연구 전반에 걸쳐 모든 그룹의 CD4 및 CD8 T 세포 수에는 거의 변화가 관찰되지 않았다(데이터는 표시되지 않음). T 세포 활성화는 CD71 발현에 의해 연구 과정에 걸쳐 평가되었다(데이터는 나타내지 않음). 라파마이신으로 처리된 마우스의 CD4 T 세포는 연구 10일 및 14일에 라파마이신으로 처리되지 않은 마우스보다 더 낮은 CD71 발현을 나타냈다. 렌티바이러스 투여는 CD4 T 세포에서 CD71 발현에 영향을 미치지 않았다. CD71 발현은 비히클로 처리된 마우스와 비교하여 렌티바이러스 투여 후 3일에 렌티바이러스로 처리된 마우스의 CD8 T 세포에서 증가했으며, 이는 αCD3-Cocal 의존성 T 세포 활성화와 일치한다.

[0953] 혈장은 표시된 시점에서 마우스로부터 원심분리에 의해 수집하고 인간 사이토카인 생성을 분석하여 T 세포 활성화 및 B 세포 고갈이 사이토카인 방출과 연관이 있는지를 결정했다. 검출 임계값에 가까운 낮은 수준의 인간 사이토카인이 관찰되었으며 연구 부문 사이에 차이가 없었다. 사이토카인 IL-13, IL-1β 및 IL-4는 검출 임계값 미만이었다. 사이토카인 IFNɣ, IL-10, IL-12p70, IL-2, IL-6, IL-8 및 TNFα는 낮은 수준에서 검출 가능했고 그룹 간에 동등했다(데이터는 제시되지 않음).

[0954] T 세포에서의 CAR 발현은 연구 3일, 7일, 10일, 14일, 23일 및 29일에 혈액에서, 그리고 연구 10일 및 29일에 비장 및 골수에서 평가되었다. CAR+ 집단은 혈액, 비장 및 골수의 CD8+ 분획에서 연구 29일에만 관찰되었다. 비히클 처리된 마우스의 평균값을 기준선으로 사용하여 P2A+CAR+의 배경 소음을 공제시켰다. 배경 공제로, CD8 T 세포의 5-10%는 혈액에서 CAR+였고, 5-20%는 비장에서 CAR+였으며, 10-40%는 골수에서 CAR+였다(도 20). 추정되는 CAR 집단은 모든 렌티바이러스-처리된 부문에서 다른 시점에 관찰되었지만, 진정한 CAR T 세포로 나타내기에는 배경 이벤트와 충분히 구별되지 않았다.

[0955] WPRE 서열을 표적화함으로써 인간 게놈에 상대적인 벡터 통합에 대해 혈액, 비장 및 골수 집단을 평가하기 위해 디지털 액적 PCR(ddPCR)을 사용했다. 검출 가능한 수준의 벡터는 3일, 10일, 14일 및 21일에 혈액에서 발견되었다(도 21a). 벡터 통합은 골수에서 10일 및 29일에 검출가능했다(도 21b). T 세포는 혈액에서 인간 백혈구의 대부분을 구성하지만 골수에서는 인간 백혈구의 극소량을 구성하기 때문에, 벡터 카피수는 골수와 비교하여 혈액에서 대략 10배 더 높았다.

[0956] 데이터는 항원의 유일한 공급원으로서 내인성 B 세포를 사용하는 CD34 인간화 모델에서, 복강내로 투여된 αCD19 CAR αCD3-Cocal 외피 렌티바이러스의 900만 형질도입 단위(TU)가 신속하고 완전한 B 세포 고갈을 유발했음을 보여준다. B 세포 고갈은 αCD19-TGFβ αCD3-Cocal 렌티바이러스로 처리된 마우스와 비교하여 αCD19 CAR αCD3-Cocal 외피 렌티바이러스 처리된 마우스에서 유사했다.

[0957] ***실시예 8: 안전성, 효능 및 약동학에 대한 임상 연구***

[0958] 연구 목적

[0959] 연구의 1차 목적은 B-ALL 및 B-계통 림프종을 가진 성인 및 소아 환자에서 의약품 및 라파마이신의 내약성 및 안전성 프로필을 평가 및 특성화하고 의약품의 항종양 활성을 평가하고 B-계통 혈액 악성종양을 가진 성인 및 소아 환자의 의약품 및 라파마이신의 항종양 활성을 평가하는 것이었다.

[0960] 본 연구의 2차 목적은 B-ALL 및 공격적 B-계통 림프종에서 의약품의 완전 반응률 및 반응 지속성을 평가하고, 의약품으로 처리된 B-계통 혈액 악성종양을 가진 성인 및 소아 환자의 무진행 및 전체 생존율을 평가하고, 의약품의 약동학을 평가하는 것이었다.

[0961] 본 연구의 탐색 목적은 의약품에 대한 반응 및 독성의 바이오마커를 탐색하고, 의약품의 면역원성을 탐색하고, 의약품의 약력학을 탐색하고, 의약품의 안전성/효능/PK 속성에 대한 삽입 부위 및 빈도를 평가하고, 항종양 활성 및 PK/PD에 대한 종양 미세환경의 영향을 평가하는 것이었다.

[0962] 의약품(DP)에서 기능적 비리온을 측정하기 위한 적격 강도 테스트는 용량 결정을 위해 수행될 것이다. 의약품의 강도는 HOS 세포(인간 골육종 세포주)의 형질도입에서 유래된 밀리리터당 형질도입 단위(TU/mL)로 보고되고, 페이로드 구성요소(예를 들어, 바이러스 패키징 서열)의 통합을 정량하기 위해 게놈 DNA에 수행된 PCR을 통해 측정될 것이다. 민감한 수용자 세포주로의 바이러스 통합에 대한 분자 판독값을 사용한 TU/mL("기능적 역가"라고 함)의 측정은 제조물에 존재하는 바이러스의 기능적 단위의 농도를 결정할 때, 바이러스 제품의 강도에 대해 일

상적으로 사용되는 측정이다. 의약품 개발의 이 단계에서 가장 정확하고 정량적인 강도 측정은 형질도입이 기능적 바이러스 입자를 암시하므로, 인간 세포를 형질도입시키는 바이러스 입자의 능력(제안된 검정으로 측정 시)이다.

[0963] 의약품의 생물학적 효과를 이해하기 위해, 의약품의 각 로트는 이 제품의 생물학적 활성에 기여하는 모든 요소의 발현 및/또는 기능성을 측정하기 위해 정성적으로 평가될 것이다. 제안된 의약품 특성화 계획으로는 αCD3-cocal 표면 조작, 항-CD19 CAR 및 RACR-FRB 시스템의 발현 및/또는 기능성의 측정을 포함한다. 특히, 이 제품 특성화 노력은 시험관내에서 1차 인간 비자극 PBMC의 형질도입, 및 T 세포 활성화, CAR 발현, RACR 발현 및/또는 RACR 기능, 항원에 대한 반응으로 CAR 활성의 측정을 수반할 것이다. 이러한 기능성 판독값과 정량화된 용량, TU의 관계는 비임상 약리학 연구 및 임상 개발 중에 모두 평가될 것이다.

표 6: 1상 임상 연구 일람표

프로토콜 제목	재발성/R/R \ B 세포 백혈병 및 림프종 환자에서 의약품 및 라파마이신에 대한 I/II 상, 공개 라벨, 다기관 연구
조사 단계	I/II
치료 제품	• 냉동 바이알로서 제공된, 주사용 의약품, 및 • 라파마이신 정제 (0.5 – 2 mg) 또는 경구 용액 (1 mg/mL)- 예를 들어, Rapamune® (시롤리무스)
연구 장소	미국의 다기관
연구 기간	각 대상체는 다음과 같이 적어도 15 년 동안 참여할 것으로 예상됨: • 스크리닝: 최대 4 주 • 치료 및 후속 조치: o 치료 o DLT 평가 (용량 증량 중) o 치료후 후속 조치: 예비 효능에 대해, 질환 진행, 허용할 수 없는 독성, 사망 또는 연구 종료까지 o 장기간 후속 조치: 의약품 투여 후 최대 15 년
연구 집단	미만성 거대 B-세포 림프종, 예컨대 버킷형(B-LBL), 여포성 림프종(FL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 급성 림프구성 백혈병(ALL) 및/또는 외투세포 림프종(MCL)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는 재발성/난치성 CD19-발현 악성종양을 가진 성인(및 잠재적으로 최종 적응증 연구 대기 중인 소아 환자)
연구 설계	이것은 R/R B-계통 혈액학적 악성 종양을 가진 성인(그리고 아마도 소아) 환자에서 라파마이신과 조합으로 의약품의 안전성, 효능 및 PK 에 대한 공개-라벨, 다기관, I/II 상 연구이다. 시험에 포함될 특정 조직학은 결정되어야 하지만, 질병별 코호트(예: B-LBL, CLL 등)에서 연구될 것이다. 본 연구의 용량-찾기 (DF) 그룹은 다양한 용량 수준에서 의약품의 안전성 프로필을 평가할 것이며, 이들 그룹은 용량 확장 (DE) 그룹과 함께 질환 코호트에서 안전성 프로필 및 예비 효능을 추가로 정의할 것이다. 본 연구는 적절한 안전성 매개변수를 유지하면서 치료이하 용량 수준에 대한 노출을 최소화하기 위해 다양한 용량 수준에 환자를 할당하는 수정된 독성 확률 간격 (mTPI) 방법을 사용할 것이다. 환자는 시험을 위해 스크리닝될 것이며, 모든 포함/배제 기준을 충족하면 서면 동의를 받고 시험에 등록될 것이다.

[0964]

	대상체는 연구 1 일차(1 일차)에 할당된 용량 수준으로 용량을 받을 것이다. 전임상 데이터를 기반으로, 상업적으로 승인된 혈액 수준을 대상으로 안전성 문제를 최소화하면서 활성을 최적화하는 시간에 상업적으로 이용 가능한 라파마이신을 시작할 것이다. 최대 지속 기간은 임의의 관찰된 독성을 제한하여 반응 크기 및 기간을 최적화하기 위한 추가 비임상 연구를 기반으로 결정될 것이다. mTPI 방법에 따르면 DLT 확률(p[DLT])과 완전 반응 확률(p[CR])이 확립된 후, 각 질병별 코호트(DSC)에 대해 최소 6 명의 대상체가 각 용량 그룹에 등록되어, 다음 용량 그룹이 각 DSC 에 대해 공개될 수 있는지 여부를 평가하도록 결정한다. 각 용량 그룹이 완전히 등록된 후, 모든 대상체는 DLT 에 대해 평가될 것이고 CR 은 다음으로 높은 용량 그룹이 DF 에 대해 공개될 수 있는지 여부를 결정한다. 더 높은 용량 수준을 DF 에 등록하는 것은 환자를 "오버플로우"하게 하고 해당 용량 수준에서 더 많은 데이터를 수집하도록 하는 용량 확장을 위해 공개된 상태에 있을, 이미 테스트된 것보다 우선시된다. mTPI 알고리즘과 스폰서의 최종 결정에 따라 권고된 2 상 용량에 도달할 때까지 후속 투약 수준/그룹에 대해 동일한 절차를 따를 것이다. 독성, 효능 및 PK 프로필은 각각 다를 수 있으므로 이 과정은 DSC 마다 독립적으로 완료될 것이다. 안전성은 적어도 의료 모니터, 스폰서 및 연구 조사자로 이루어지는 안전성 모니터링 위원회(SMC)에 의해 연구 전반에 걸쳐 모니터링될 것이다. SMC 는 정기적이고 임시적으로 회의를 열어 새로운 데이터를 검토하고 용량 증량 및 용량 확장에 관한 권장 사항을 스폰서에게 제공할 것이다. 또한, 안전성 이벤트에 대한 시험 수행을 모니터링하기 위해 독립적인 데이터 안전 모니터링 위원회(DSMB)가 소집될 것이다.
치료 제품, 용량, 투여 방식	의약품, 사이질/결절내 주사에 의해, 평가할 의약품의 용량 수준(TU/kg 으로 제공). 라파마이신은 승인된 USPI 에 따라 경구 투여됨

[0965]

연구 엔드포인트	
안전성	• 안전성 모니터링 기간에는 다음을 포함할 것이다: ○ 사전 동의부터 의약품 투여까지 ○ 의약품 투여부터 라파마이신 투여까지 ○ 90 일 동안 의약품 또는 라파마이신 중 어느 하나의 투여 ○ 90 일부터 연구 종료 또는 추가 항암 요법의 투여까지 • 이상 사례 (AE), 심각한 이상 사례 (SAE), 특별 관심 이상 사례 (AESI)가 특정 실험실 값과 함께 수집될 것이다. • 비임상 시험관내/생체내 데이터 평가 후 임상 발달 동안 결정되어야 하는 DLT 정의 • 재조합 렌티바이러스(RCL) 테스트는 기준선에서, 그리고 의약품 투여 후 정기적인 간격으로 수행될 것이다.
효능	효능 평가는 적절한 양식/시기에 따라, 연구되는 최종 적응증(들)에 따라 달라질 것이다.
PK/PD/ 면역원성	말초혈액은 PK/PD, 예를 들어 말초 혈액 최대 CAR T-세포 농도(Cmax), 최대 농도 시간(Tmax), 1 일차부터 29 일차까지 곡선하 총 면적(AUC_{0-28})에 의해 측정된 총 노출, 및 1 일차(의약품 투여 전), 2, 4, 8, 15, 22, 및 29 일차, 뿐만 아니라 지속성 분석을 위한 모든 후속 연구 방문 시에 B-세포 형성증을 평가하기 위해 수득될 것이다. 골수 및 림프절 샘플은 또한 해당 조직에서 PK/PD 를 평가하기 위한 다른 임상적 이유를 위해 수득된다면 요청될 수 있다. 면역원성 평가는 기준선으로서 투여 전, 뿐만 아니라 의약품 및 이의 단백질 생성물에 대한 항체를 평가하기 위한 규정된 모든 임상 평가에서 수득될 것이다.
포함 기준	특정 포함 기준은 추후 프로토콜 초안에서 제공될 것이다.
제외 기준	특정 제외 기준은 추후 프로토콜 초안에서 제공될 것이다.

[0966]

[0967] *의약품*

[0968] *의약품의 설명 및 제안된 작용 메커니즘*

[0969] 의약품은 항-CD19 CAR을 발현하고 CD19-발현 종양 세포를 표적화하기 위해 생체내에서 T 세포를 형질도입하도록 설계된, 연구용 복제 불능 자가-불활성화(SIN) 렌티바이러스 벡터(LVV)이다.

[0970] 의약품은 다음과 같은 다단계 작용 메커니즘을 갖고 있다:

[0971] - LVV는 T 세포를 활성화하고 Cocal 당단백질과의 상호작용을 통해 렌티바이러스 내재화를 촉진하는 항-CD3 scFv를 통해 생체내에서 T 세포에 결합함

[0972] - 페이로드 RNA 게놈인 αCD19 CAR-FRB-RACR은 DNA로 역전사되어 핵으로 이동한 후 게놈에 통합됨

[0973] - 형질도입된 T 세포는 항-CD19 CAR을 발현하고 CD19 발현 세포를 표적화지만, 라파마이신-제어된 사이토카인 신호전달을 위한 FRB 및 RACR 시스템도 발현함.

[0974] 의약품 LVV의 제조에 사용되는 5개의 플라스미드로는 다음을 포함한다:

[0975] 1) Gag-Pol 헬퍼 플라스미드: 바이러스 *gag* 및 *pol* 유전자의 발현(서열번호 124). 이들은 바이러스 구조 단백질 및 역전사와 표적 게놈 내로의 통합에 필요한 단백질을 암호화한다.

[0976] 2) Rev 헬퍼 플라스미드: 생산자 세포주에서 스플라이싱되지 않은 패키징 가능한 RNA 게놈의 핵 수출에 필요한 바이러스 단백질 Rev를 암호화함(서열번호 125).

[0977] 3) αCD3 scFv 플라스미드: 항-CD3 scFv를 암호화함(서열번호 127)

[0978] 4) Cocal 헬퍼 플라스미드: Cocal 외피 당단백질을 암호화함(서열번호 123).

[0979] 5) αCD19 CAR-FRB-RACR: 활성화된 T 세포로 전달될 전이유전자를 암호화하며, 여기에는 2개의 키메라 수용체 시스템이 포함된다: 1) 4-1BB 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인에 융합된 FMC63 scFv를 포함하는 2세대 항-CD19 CAR, 및 2) RACR-FRB 시스템(서열번호 122)(도 25).

[0980] *렌티바이러스 입자 전달 및 생체내 T 세포 상호작용*

[0981] 렌티바이러스 입자는 결절내 주사 또는 사이질 공간으로의 전달(예를 들어, SC 또는 IP 주사)에 의해 T 세포에

유전자 페이로드를 전달하며, 이는 국소 림프절로 배출된다. 다른 LVV와 마찬가지로 의약품 바이러스 입자는 크기가 80-120 nm일 것으로 예상되므로 투여 후 사이질액으로부터 림프로 흡수되어 이차 림프 조직(즉, 림프관 및 림프절)으로 직접 이송되도록 한다. 투여 경로 중 어느 것이든 의약품이 림프절에서 CD3+ T-세포에 체결하여 형질도입하는 결과를 가져올 것으로 예상된다.

[0982] 유전자 페이로드를 생체내 T-세포에 효율적으로 전달하는 의약품의 능력은 렌티바이러스 입자의 표면 조작을 통해 가능하며, 이는 항 CD3 scFv 및 Cocal 당단백질의 발현을 포함한다. 구체적으로:

[0983] - LVV 입자 표면의 항-CD3 scFv는 CD3를 통해 T 세포를 결합하고 활성화하도록 설계된다. CD3 자극은 세포 내에서 신호 캐스케이드를 개시시켜 T 세포를 활성화함으로써 활성화와 연관된 세포 주기 진행 및 전사/대사 변화를 초래한다. 이 상태는 T 세포가 LVV 형질도입을 허용하도록 한다.

[0984] - Cocal은 수용체 결합 및 바이러스 입자 내재화 후 엔도솜의 산성화 후 바이러스 막을 엔도솜 막에 융합시키는 역할을 하는 융합 당단백질로서, 바이러스 캡시드를 시토졸로 방출시킨다. 따라서, Cocal은 CD3-매개 T 세포 활성화가 Cocal 수용체 중 하나인 저밀도 지단백질 수용체(LDLR)의 상향조절을 유도하고 LVV의 내재화를 지원하므로 CD3의 작용을 보완한다.

[0985] *생체내 형질도입*

[0986] T-세포 세포질로의 캡시드 전달 후:

[0987] 1) 렌티바이러스 입자 캡시드는 T 세포 핵 외피/막으로 이동한다. 이 수송 동안 바이러스 게놈의 역전사 및 사전-통합 복합체(PIC)의 형성이 캡시드 내에서 일어난다. CD3에 대한 결합을 통해 의약품-매개 T 세포 활성화에 의해 생성된 세포 뉴클레오타이드 풀의 증가는 바이러스 입자 페이로드의 효율적인 역전사를 가능하게 한다. 핵막 통과 과정에서 캡시드의 분해가 일어나 PIC를 유리시켜 숙주 세포 편재성 내인성 세포 염색질 조절인자인 LEDGF에 결합하게 한다.

[0988] 2) LEDGF에 대한 PIC의 결합은 PIC를 숙주 세포 활성 염색질 영역에 묶이게 하고 바이러스 긴 말단 반복(LTR) 서열에서 렌티바이러스 INT 단백질의 활성을 통해 형질도입된 세포의 게놈 내로 역전사된 페이로드 카세트가 통합되도록 한다. 통합에 영향을 미치는 렌티바이러스 기구의 사용은 활성 유전자를 향하는 경향이 있으므로 일반적으로 다른 비-지향성 통합 방법보다 더 안전하다.

[0989] *페이로드의 표면 발현*

[0990] 의약품 페이로드는 약물-조절 면역 세포 활성화, 확장 및 신호 표적화를 제공하는 αCD19 CAR, FRB 및 RACR 구성요소의 발현을 유도하기 위해 유전자 발현 카세트 내로 역전사되는 약 7kb RNA 게놈을 포함한다(도 23).

[0991] 폴리시스트론성 전이유전자 페이로드의 발현은 MND 프로모터(서열번호 35)에 의해 유도된다. MND 프로모터(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 제어 영역 결실됨, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환됨)는 골수증식성 육종 바이러스 인핸서13을 가진 변형된 Moloney 뮤린 백혈병 바이러스(MoMuLV) LTR의 U3 영역을 함유하고 인간 CD34+ 줄기 세포, 림프구 및 다른 조직에서 높은 발현을 보이는 바이러스 유래 합성 프로모터이다. 해독 중에 리보솜 스키핑 및 절단을 유도하는 2A 펩타이드 서열에 의해 분리된, 4개의 분리된 단백질이 발현된다. CAR은 4-1BB 공동자극 도메인 및 CD3제타 세포내 신호전달 도메인에 연결된 FMC63 마우스 항-인간 CD19 scFv를 포함하는 2세대 CAR이다.

[0992] 의약품 전이유전자(도 23)가 세포 게놈 내로 통합된 후, 전이유전자 프로모터(MND)는 페이로드 개방 판독 프레임의 발현을 유도하며, 이는 2A 리보솜 스킵 펩타이드 서열에 의해 분리된 4개의 별개의 단백질을 암호화한다.

[0993] CAR 및 RACR 수용체는 T-세포 생존, 증식 및 항종양 이펙터 특성의 "활성화"를 조절하는 상보적 신호의 전달을 유도한다(도 24). 림프 조직 및 말초 혈액에서 정상 및 악성 B 세포 상의 CD19에 대한 항-CD19 CAR의 발현 및 결합은 TCR 및 공동자극 수용체 체결을 복제하는 신호를 생성할 것이다. 이는 CD3ζ("신호 1") 및 4-1BB("신호 2") 공동자극 신호전달 도메인 둘 모두를 포함하는 CAR 작제물로 인한 것이며, 이는 T 세포 면역 반응에 필수적이다.

[0994] 의약품에 독특하게, 라파마이신의 투여는 RACR 서브유닛에 대한 리간드로 작용하여 이량체화하고 IL-2/15 사이토카인-유사 생존/증식 촉진 신호("신호 3")를 바이러스 입자 형질도입된 T 세포에 제공한다. CAR 및 RACR 수용체에 의해 매개된 신호는 함께 CD19-표적화 CAR T-세포 집단의 생체내 확장 및 유지를 향상시킨다.

[0995] *RACR 기능*

[0996] RACR 구성요소인, RACR 감마 및 RACR 베타는 막 스패닝 수용체 단백질로서 발현되는 별개의 융합 단백질이다. RACR 감마는 세포외에 위치한 FK 결합 단백질(FKBP)과 일반적인 사이토카인 수용체 감마 서브유닛 막관통 및 세포질 꼬리 사이의 융합체를 포함하고, RACR 베타는 세포외에 위치한 FKBP 라파마이신 결합(FRB) 도메인과 IL2RB 막관통 및 세포질 꼬리 사이의 융합체를 포함한다.

[0997] 라파마이신은 다수의 임상 환경에서 사용하기 위한 FDA 승인 mTOR 저해제 면역억제제이다. 라파마이신은 2개의 RACR 구성요소의 이량체화를 유도하여 형질도입된 세포에서 IL-2/IL-15 유사 신호전달을 촉발한다. 전이유전자는 mTOR 단백질 키나아제로부터 추출된 약 100개의 아미노산 도메인인 네이키드 FRB 도메인을 포함한다. 이는 시토졸에서 자유롭게 확산 가능한 가용성 단백질로서 발현된다. FRB 도메인의 목적은 형질도입된 세포에서 mTOR에 대한 라파마이신의 저해 효과를 감소시키는 것이며, 이는 형질도입된 T 세포의 일관된 활성화를 가능하게 하고 이들에게 천연 T 세포에 비해 증식 이점을 제공한다(도 25). 따라서, RACR 시스템은 형질도입되지 않은 T 세포가 라파마이신 mTOR 저해의 저해 효과를 받는 반면, 형질도입된 T 세포에게는 IL2/15 신호전달을 제공함으로써 생존/증식 이점을 제공한다.

[0998] *생체내 약리학*

[0999] 생체내에서 T 세포를 형질도입시키는 의약품 LVV의 능력을 평가하기 위해, 인간화 마우스 모델을 사용했다. 인간 제대혈 CD34+ 줄기 세포가 생착된 NSG 마우스가 수득되었다. 이들 마우스는 순환계에 대략 25-50%의 인간 CD45+ 면역 세포를 가질뿐만 아니라 골수로부터 인간 B 및 T 세포의 활성적인 생성을 갖는다. 생착 약 20주 후, 이러한 인간화 마우스의 인간 CD45+ 분획은 전형적으로 약 60-80% B 세포 및 20-40% T 세포를 함유하고; 따라서, 이들 마우스는 항-CD19 CAR 활성에 대한 판독값으로서 B 세포의 고갈을 갖는, 생체내 인간 T 세포의 형질도입에 적절한 모델로서 간주되었다.

[1000] 도 30에 도시된 바와 같이, 생체내 의약품의 기능을 평가하기 위해, 암컷 CD34 인간화 마우스(그룹당 n=3 또는 4마리)를 복강내 주사를 통해 약 1000만 TU의 의약품으로 처리하고 연속적인 채혈을 통해 B 세포 집단을 유세포분석으로 정량화했다. 말초 혈액에서 B 세포의 급속한 고갈이 관찰되었고, 주사 후 14일째에 사실상 검출할 수 없는 B 세포의 최저점에 도달했고, 이는 항-CD19 CAR 활성을 암시한다. 의약품 투여 후 29일째에 희생된 마우스는 유세포분석에 의해 고갈된 비장 및 골수 B 세포 집단을 전시했다. 의약품 페이로드 통합은 말초 혈액으로부터 수집된 백혈구에서 ddPCR 분석에 의해 검출되었고, 유세포 분석에 의해 항-CD19 CAR의 발현이 검출되었다.

[1001] 이들 생체내 약리학 연구는 의약품 LVV가 생체내에서 검출가능한 CAR T 세포 집단을 형질도입시킬 수 있고 B 세포의 거의 완전한 제거를 야기할 수 있음을 입증했다.

[1002] ***실시예 9: CD34+ 인간화 마우스 연구 개요에서 항-CD19 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터에 대한 용량 탐색***

[1003] 렌티바이러스는 부착 생산을 사용하여 제조했고 293T 세포에 대해 유세포분석으로 적정했다. 루시퍼라제 및 GFP를 발현하는 Raji GFP FFLUC 세포는 SCRI의 Jensen 연구실로부터 얻었고, Umoja Biopharma에 의해 배양되었으며, PBS에서 얼음 상에 넣어 주사를 위해 Fred Hutch로 전달했다.

[1004] 20 마리의 인간-NSG CD34+ 암컷은 이들의 인간 B 세포 수준에 따라 5개 그룹으로 무작위로 배정했다. 연구 D0에서 여러 용량의 UB-VV100 바이러스 입자, 대조군 또는 비히클로서 FITC RACR 입자를 이하 표 7에 따라 IP 주사했다.

표 7: 연구 그룹

[1005]

그룹	N	용량 (IP)	바이러스 IP	라파마이신 IP	Raji 세포 SC
1	4	1000 만	UB-VV100	1mg/kg	200 만
2	4	200 만	UB-VV100	1mg/kg	200 만
3	4	40 만	UB-VV100	1mg/kg	200 만
4	4	1000 만	FITC RACR	1mg/kg	200 만
5	4	0	비히클	n/a	200 만

[1006] UB-VV100 바이러스 입자는 서열번호 121, 128, 131 및 132를 포함했다.

[1007] D4부터 시작하여 D53까지 주 1회 안와뒤로 마우스로부터 채혈했고, 이들의 혈액을 유세포분석으로 분석했다. 26일째 비히클 그룹을 제외한 모든 그룹에게 주 3회 라파마이신 1 mg/kg의 용량을 투여하기 시작했다. 40일째 모

든 마우스에게 1:1 비율의 200만 RAJI GFP ffLUC과 Matrigel의 혼합물 100ul를 피하 이식했다. 종양의 성장을 모니터링하기 위해 주 3회 디지털 캘리퍼스로 종양을 측정했으며, 공식 (W^2 × L)/2을 사용하여 종양 부피를 계산했다. 59일부터 70일까지 종양을 주 2회 측정했다. 59일부터 70일까지 마우스를 주 2회 라파마이신 일정으로 전환한 다음, 73일부터 77일에 마지막 용량을 투여받을 때까지 다시 주 3회로 전환했다. 모든 마우스는 연구 81일에 희생시켰다. 골수, 비장, 말초 혈액 및 종양을 수집하고 단일 세포 현탁액으로 가공하고 유세포분석으로 분석했다. 연구 시간표의 개략도는 도 31a에 도시된다.

[1008] **결과**

[1009] 혈액 B 세포 집단은 항-CD19 CAR T 세포 활성에 대한 대용물로서 유세포분석에 의해 모니터링했다. 1,000만 TU의 UB-VV100으로 처리된 동물은 연구 11일 정도에 비히클-처리된 대조군에 비해 95%의 B 세포 고갈을 나타냈고, 연구 25일까지 해당 고갈 수준을 지속했고, 이후 B 세포는 순환 B 세포가 유세포분석에 의해 사실상 검출되지 않는 경우까지 추가로 감소했다. 이러한 B 세포 감소의 제2 단계는 연구 26일에 시작된 라파마이신 투약과 상관관계가 있었다. 200만 TU의 UB-VV100으로 처리된 동물은 연구 18일까지 비히클 처리된 대조군에 비해 약 75% B 세포 고갈을 나타냈고, 이는 연구 25일째에 지속되었고, 그 다음 연구 32일경까지 거의 검출할 수 없는 수준까지 감소했다. 이러한 B 세포 감소의 제2 단계도 라파마이신 투약과 상관관계가 있었다.

[1010] 비히클로 처리된 동물은 순환 B 세포의 점진적 감소만을 나타냈고, 이는 CD34-인간화 마우스에서 시간이 지남에 따라 전형적으로 보이는 것이며 본 발명자들의 이전 연구에서 관찰되었다. 비히클 처리된 마우스에서는 연구 32일째에 B 세포의 급격한 감소가 관찰되었으며, 이는 라파마이신 투약과 상관관계가 있다. 그러나, 비히클-처리된 마우스는 라파마이신을 투여받지 않았고, 따라서 이러한 감소는 라파마이신 효과로 설명될 수 없으며, 연구 32일까지 비히클 처리된 마우스의 B 세포 수준이 한 번 더 상승했기 때문에 이러한 감소는 유의미하지 않다. 40만 TU의 UB-VV100으로 처리된 동물은 초기 시점에 B 세포 고갈을 나타내지 않았지만, 비히클 처리된 동물과 비교하여 후기 시점에 B 세포 감소 쪽으로의 추세를 보였다. 항-FITC CAR을 암호화하는 항-CD3 scFv 표면 조작된 cocal-위형화된 렌티바이러스 입자로 처리된 동물은 비히클에 비해 B 세포 고갈을 나타내지 않았으며, 이는 B 세포 고갈이 항-CD19 CAR의 발현에 의존적임을 시사한다(도 31b).

[1011] 순환 CAR T 세포는 연구 전반에 걸쳐 유세포분석에 의해 측정되었다. 순환 CAR T 세포는 40만 TU UB-VV100 입자 또는 항-FITC CAR을 암호화하는 1000만 TU의 렌티바이러스 입자로 처리된 동물에서 관찰되지 않았다. 순환 CAR T 세포는 1000만 TU UB-VV100으로 처리된 동물에서 18일부터 시작하여 46일까지 증가하는 것으로 관찰되었으며, 그 후 총 CAR T 세포 수의 점진적인 감소가 일어났다. 200만 TU 투여된 마우스에서 CAR T 세포는 라파마이신 투약 후에만 검출할 수 있었고; 숫자는 39일째에 정점을 찍고 53일째에 거의 기준선까지 다시 감소했다(도 31c).

[1012] 내인성 B 세포의 완전한 고갈은 200만 및 1000만 TU의 UB-VV100으로 처리된 동물에서 관찰되었으므로, 동물에게 피하 Raji 종양을 이식하여 악성 CD19-발현 세포를 제거하는 잠재적인 순환 CAR T 세포의 능력을 평가했다. 종양 성장은 공식 (W^2 × L)/2를 사용하여 모니터링했고, $10E^6$ 또는 $2E^6$ 용량의 UB-VV100을 투여받은 그룹이 비히클 또는 항-FITC CAR을 암호화하는 렌티바이러스 입자로 처리된 동물과 비교하여 감소된 종양 생착 및 증식을 보이는 것으로 발견되었다(도 32a).

[1013] 연구 종료 시, 종양 내로 종양 CAR T 세포 침윤을 유세포분석으로 평가했고, CAR T 세포는 $10E^6$ UB-VV100 입자로 처리된 마우스로부터의 종양에서 더욱 풍부한 것으로 발견되었다(도 32b).

[1014] 81일째에 연구 중인 모든 마우스를 희생시켰고, 이들의 골수 및 비장을 유세포분석으로 분석했으며, 골수 및 비장의 인간 T 세포 집단에 존재하는 CAR T 양성 세포의 백분율을 측정했다. 골수에서 부분적인 B 세포 고갈 및 1,000만 TU UB-VV100이 투여된 마우스의 비장에서 비히클로 처리된 마우스와 비교하여 유의미한 B 세포 고갈이 관찰되었다(도 33).

[1015] 본 발명자들은 연구 내내 주 1회 모든 마우스의 체중을 측정했고, 도착 시의 체중과 비교하여 체중 변화의 백분율을 계산했다. 본 발명자들은 UB-VV100 처리 후, 라파마이신 투약 내내 및 모든 다른 처리 그룹에서 Raji 종양 이식 후 체중 감소를 관찰하지 못했다(데이터는 제시되지 않음).

[1016] 형질도입 이벤트는 혈액, 골수, 비장, 간, 난소 및 신장에서 ddPCR에 의해 분석했다. VV100 투여 81일 후 200만 또는 1000만 TU로 처리된 마우스의 골수 및 비장에서 전이유전자 통합이 검출되었지만, 40만 TU로 처리된 동물의 골수 또는 비장에서는 전이유전자가 검출되지 않았고, 이는 40만 TU가 현재 연구 설계 모델에서 최소 유효 용량 미만임을 암시한다(도 33c). VV100 전이유전자는 연구 81일째에 희생된 1000만 TU로 처리된 마우스의 간,

신장 및 아마도 난소에서 검출되었다.

[1017] 비-T 세포 형질도입 이벤트도 본 연구에서 평가되었다. 유세포분석을 사용하여 CD3- 인간 분획에서 FMC63+ 집단을 검출했고, 비장, 혈액 및 골수에서 마우스 CD45+ 분획, 및 인간 CD45- 마우스 CD45- 분획을 FMC63 발현에 대해 평가했다. 아마도 비장의 마우스 CD45+ 분획을 제외하고는 분석된 기관에서 결정적인 비-T-세포 형질도입된 집단은 관찰되지 않았다(데이터는 제시되지 않음).

[1018] **결론**

[1019] UB-VV100 처리된 CD34-인간화 마우스의 말초 혈액에서는 용량 의존적 B 세포 고갈이 관찰되었다. 이 B 세포 고갈은 81일 동안 지속되었고 골수와 비장에서는 부분적으로 지속되었다.

[1020] 비히클 또는 항-FITC CAR을 운반하는 대조군 입자로 처리된 마우스(전형적으로 CD34+ 모델에서 경시적으로 나타남)에서 단지 점진적인 B 세포 고갈만이 일어난 것과 비교하여, 1000만 TU UB-VV100 또는 200만 TU UB-VV100으로 처리된 마우스에서는 B 세포의 급격한 감소가 일어났고, 이는 B 세포 고갈이 CAR 매개이며 CD19 항원에 특이적임을 확인시켜준다(도 31).

[1021] 라파마이신의 첨가는 UB-VV100 매개의 B-세포 고갈을 향상시켰고 CAR-T 세포 집단을 확장시켰다. 라파마이신을 첨가하기 전에 CAR T 세포는 1000만 TU UB-VV100 그룹에서만 분명했고, 반면 라파마이신 첨가 후에는 200만 TU UB-VV100으로 처리된 마우스의 혈액에서 CAR T 세포의 분명한 집단이 나타났다(도 31c).

[1022] 결과는 다수의 CAR T 세포의 순환이 항-B 세포 이펙터 활성에 필수적이지 않으며 VV100으로의 처리가 SC Raji 종양 성장을 용량 의존적 방식으로 저해하였음을 추가로 보여준다(도 32).

[1023] 혈액, 골수 또는 비장에서 명백한 비-표적 이벤트는 유세포분석에 의해 검출되지 않았다.

[1024] ***실시예 10: PBMC-인간화 마우스의 Nalm-6 전신 종양 모델에서 항-CD19 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터의 효능***

[1025] 본 연구의 목적은 PBMC-인간화 마우스의 Nalm-6 전신 종양 모델에서 UB-VV100의 효능 및 UB-VV100 투여 후 라파마이신 투약 효과를 평가하는 것이다. UB-VV100 바이러스 입자는 서열번호 121, 128, 131 및 132를 포함했다.

[1026] **연구 개요**

[1027] 렌티바이러스는 부착 생산을 사용하여 제조했고, 유세포분석에 의해 293T 세포에 대해 적정했다. 루시퍼라제 및 GFP를 발현하는 Nalm-6 GFP FFLUC 세포는 SCRI의 Jensen 연구실에서 입수했고, Umoja Biopharma에서 배양했으며, 주사를 위해 PBS에서 전달했다.

[1028] 24 마리의 MHC I/II KO NSG 암컷 마우스를 본 연구에 사용했다. 연구 -5일(D-5)째, 안와후 주사를 통해 50만 개의 Nalm-6 세포를 마우스에 이식했다.

[1029] 연구 -1일째 IP 주사를 통해 1000만 PBMC로 마우스를 인간화했다. 같은 날 모든 마우스는 Nalm-6 질환 부하를 검출하기 위해 d-루시페린 주사(15mg/kg) 후 15분에 IVIS 이미저로 이미지화했다. 각 종양 그룹의 모든 마우스는 이들의 종양 생물발광(총 플럭스) 수준에 따라 하기 표 8에 따른 4개의 코호트로 무작위로 배정했다.

표 8: 연구 그룹

[1030]

그룹	N	종양 (-5일 RO) 50만	인간화(-1일)	UB-VV100 (2000만 TU IP) 0일	라파마이신 (4일)
1	6	NALM-6	1000만 PBMC IP	비히클	없음
2	6	NALM-6	1000만 PBMC IP	비히클	1mg/kg MWF
3	6	NALM-6	1000만 PBMC IP	UB-VV100	없음
4	6	NALM-6	1000만 PBMC IP	UB-VV100	1mg/kg MWF

[1031] 연구 0일에 그룹 3 및 4의 마우스를 500ul의 PBS에서 UB-VV100의 2000만 바이러스 입자로 IP 처리했다. 그룹 1 및 2는 비히클(PBS) IP 주사를 받았다. 연구 3일째부터 나머지 연구 기간 동안 주 2회(화요일, 금요일) 모든 마우스를 이미지화했다. 연구 4일째에 그룹 2 및 4의 마우스는 주 3회(월요일, 수요일, 금요일) IP 주사를 통해 1 mg/kg 라파마이신 처리를 받기 시작했다. 연구 시간표는 도 34a에 도시되어 있다. 연구일 10, 13, 17 및 20일에

질환 부하가 높은 마우스는 체중 감소 및 고통의 징후로 인해 안락사해야만 했다.

[1032] 연구 동안 체중 감소의 백분율을 모니터링했다(도 34b). 비히클 및 비히클 + 라파마이신 그룹의 마우스만이 종양 세포의 급속한 확장으로 인해 상당한 체중 감소를 보였다. 연구가 끝날 때까지 살아남은 모든 마우스는 연구 41일째에 희생시켰다. 골수, 비장, 말초 혈액 및 종양을 수집하여 단일 세포 현탁액으로 가공하고 유세포분석으로 분석했다.

[1033] **결과**

[1034] UB-VV100 처리는 Nalm-6 종양 모델에서 종양 생물발광(광자/초)(도 35a) 및 증가된 생존(도 35b)에 의해 측정된 종양 부하를 유의미하게 감소시켰다. UB-VV100 처리를 받은 마우스는 연구 41일까지 생존을 연장했다. 대조적으로, 비히클 및 비히클 + 라파마이신 그룹의 모든 마우스는 연구 17일과 20일 사이에 질환으로 쓰러졌다.

[1035] 도 36에 도시된 바와 같이, 비히클 그룹(왼쪽 상단) 및 비히클+라파마이신(오른쪽 상단) 그룹의 마우스는 연구 10일부터 상승된 질환 부하를 가졌다. 이 그룹의 마우스는 17일경에 안락사시켜야 했다. UB-VV100 그룹의 마우스(하단 왼쪽) 17일부터 질환 부하가 감소했다; 하지만, 이 그룹에서 UB-VV100의 효과는 일시적이었다. UB-VV100 + 라파마이신 그룹(오른쪽 아래)의 모든 마우스는 17일째부터 질환 부하가 유의미하게 감소했고, 2마리의 마우스에서는 낮은 질환 부하가 남아 있었다. 이 그룹의 단 1마리의 마우스만이 초기 회귀 후 종양 부하의 증가를 가졌다.

[1036] 도 37에 도시된 바와 같이, 비히클 그룹의 마우스는 17일에 Nalm-6 질환으로 쓰러졌고; 비히클 + 라파마이신 그룹의 마우스는 20일경에 질환으로 쓰러졌다. UB-VV100 처리 그룹의 대부분의 마우스는 질환 부하의 일시적인 감소를 가졌고; UB-VV100 + 라파마이신 그룹의 마우스는 대부분의 마우스에서 검출할 수 없을 정도로 낮게 유지되는 질환 부하의 유의미한 감소를 가졌다(단 1마리의 마우스는 종양 부하의 부분적인 감소를 가졌고, 이후 증가했다).

[1037] 도 38에 도시된 바와 같이, CAR T 세포는 UB-VV100 + 라파마이신으로 처리된 마우스의 말초 혈액에서 시간이 지남에 따라 상당히 확장되었다. 이에 비해, UB-VV100으로만 처리된 마우스에서, CAR T 세포는 약간 증가하여 17일에 정점에 도달한 다음, 감소하여 나머지 연구 기간 동안 안정적으로 유지되었다.

[1038] 연구 17일에 VV100 그룹에서 종양 퇴행이 관찰되었지만, 20일 후에 종양 부하는 증가하기 시작했다. VV100 + 라파마이신 그룹의 마우스는 17일째에 시작하는 종양 퇴행을 가졌고, 2마리의 마우스는 종양 부하의 명백한 제거를 가졌고, 1마리는 일시적 감소 후 종양 부하의 증가가 생물발광 이미징에 의해 검출되었다(도 37). CAR T 세포는 VV100 + 라파마이신으로 처리된 마우스의 말초 혈액에서 시간이 지남에 따라 유의미하게 확장했다. VV100만으로 처리된 마우스에서, CAR T 세포는 작은 증가를 보였고, 이는 17일에 정점에 달한 후 감소하고 연구의 나머지 기간 동안 안정적으로 유지되었다(도 38).

[1039] 도 39에 도시된 바와 같이, 총 면역 세포 집단에서의 CAR T 세포 빈도는 41일째에 UB-VV100 + 라파마이신 처리군에서 더 높고 비장에서보다 골수에서 더 높다(도 39a). 또한, 골수 및 비장에서 T 세포 집단내 CAR T 세포의 빈도는 UB-VV100 처리군에서보다 UB-VV100 + 라파마이신 처리군에서 유의미하게 더 높았다(도 39b). 따라서, 본 연구에서 라파마이신 처리는 CAR+ T 세포의 농축을 초래한다.

[1040] 총 CAR T 집단은 비장보다 골수에서 더 높았고 총 T 세포 집단에 존재하는 CAR T 세포의 백분율은 VV100 단독 그룹보다 VV100 + 라파마이신 그룹에서 더 높았다(도 39).

[1041] P2A 및 CD19를 포함하는 패널로 염색된 골수는 Nalm-6 종양 세포가 UB-VV100 렌티바이러스 벡터에 의해 형질도입되지 않았음을 확인시켜 주었다(데이터는 제시되지 않음).

[1042] **결론**

[1043] 이 데이터는 VV100이 NALM-6 종양 부하를 유의미하게 감소시키고 생존을 연장한다는 것을 보여준다. 또한, 라파마이신은 NALM-6 그룹 마우스에서 CAR T 세포 집단을 확장시키고 이 확장은 종양 부하에 반비례한다.

[1044] ***실시예 11: 시험관내 약리학 연구***

[1045] 추가 시험관내 약리학 연구의 결과가 여기에 요약된다. UB-VV100 바이러스 입자는 서열번호 122, 123, 127, 101 및 103을 포함했다.

[1046] 도 40a 및 도 40b에 도시된 바와 같이, 3명의 공여자로부터의 PBMC를 UB-VV100 또는 항-CD3 scFv가 없는

Cocal-위형화된 렌티바이러스로 형질도입했다. CD25에 대한 유세포분석에 의해 3일 후에 활성화를 평가했다(도 40a). 형질도입은 CAR 발현에 대해 유세포분석에 의해 7일 후에 평가했다(도 40b). CD25에 대한 데이터를 보여주는 플롯은 측정된 모든 활성화 마커를 대표한다(즉, CD71 및 CD69; 데이터는 제시되지 않음). 플롯은 CD3+ 살아 있는 단세포에 대해 게이트화된, 감염 다중도(MOI) 5에서 유래한다. 요약된 플롯은 3명의 공여자로부터의 조합된 데이터이며, 오차 막대는 ±1 SEM을 나타낸다. 결과는 항-CD3 scFv가 T 세포의 활성화 및 형질도입을 촉진한다는 것을 입증한다.

[1047] 도 41a 및 도 41b에 도시된 바와 같이, PBMC는 10의 감염 다중도 10으로 UB-VV100에 의해 형질도입되었다. 3일째부터, 세포를 별도의 배양물로 분할하고 10nM 라파마이신으로 처리하거나 처리하지 않았다. CAR T 세포 형질도입 및 확장은 유세포분석 및 세포 계수에 의해 평가했다. 대표적인 유동 플롯은 살아있는 CD3+ 단세포에 대해 게이트화된다. 결과는 RACR 엔진과 라파마이신이 시험관내에서 CAR T 세포의 농축 및 증식을 유도한다는 것을 입증한다.

[1048] Raji 세포에 대해 형질도입된 CAR T 세포의 세포독성을 평가했다. UB-VV100으로 형질도입된 2명의 공여자의 PBMC를 CD19-녹아웃(KO) 또는 CD19-발현 Raji-GFP 종양 세포와 함께 5시간 동안 2mM 모넨신, 5mg/mL의 브레펠딘 A 및 2mg/mL의 CD107a Ab의 존재하에 공동배양했다. CD8 T 세포의 세포독성은 INFɣ(도 42a) 및 표면 CD107a(도 42b)의 세포내 염색에 의해 평가했다. 또 다른 실험 세트(도 42c)에서, UB-VV100-형질도입된 PBMC는 CD19-KO 또는 CD19-발현 Raji-GFP 종양 세포와 48시간 동안 공동배양했고, 사멸 효능은 (생존성 Raji-GFP/총 Raji-GFP)로 평가했다. 결과 분석을 위해, 대표적인 유동 플롯은 CD8+CD3+ 살아 있는 단세포에 대해 게이트화된다. **, *** 및 ****는 2원 ANOVA 다중 비교 테스트에 의한 <0.01, 0.001 및 0.0001의 p 값을 나타낸다. 결과는 UB-VV100 형질도입된 CAR T 세포가 시험관내에서 Raji 세포에 대해 CD19-의존적 세포독성을 전시한다는 것을 입증한다.

[1049] **환자로부터 T 세포의 형질도입**

[1050] B-ALL 환자(남성, 23세)로부터 PBMC 샘플은 진단 시 및 치료 개시 전에 수집했다. 혈액학 보고서에 따르면 환자는 혈액 내 62%의 모세포, 골수 내 95%의 모세포 및 $205.7x10^9$ 세포/L의 백혈구 수를 갖는 모세포 단계에 있었다. T 세포는 총 살아있는 PBMC의 <4%를 구성했다. (도 43a) 살아있는 PBMC당 2.5 UB-VV100 형질도입 단위를 매일 2회 처리하여 세포를 형질도입시켰다. T 세포 활성화 및 형질도입은 7일째 유세포분석으로 평가했다. (도 43b) 결과는 T 세포 분획이 총 PBMC의 <4%인 경우에도 UB-VV100이 T 세포를 효과적으로 형질도입시킨다는 것을 입증한다.

[1051] DLBCL 환자(남성, 70세)로부터 PBMC 샘플은 진단 시 및 치료 개시 전에 수집했다. 수집 당시 백혈구 수는 $11.3x10^9$ 세포/L였다(도 44a). 살아있는 PBMC당 2.5 UB-VV100 형질도입 단위(TU)를 매일 2회 처리하여 세포를 형질도입시켰다. T 세포 활성화 및 형질도입은 유세포분석에 의해 7일째에 평가했다(도 44b). 결과는 UB-VV100이 DLBCL 환자로부터 유래된 PBMC 집단에서 T 세포를 효과적으로 형질도입시킨다는 것을 입증한다.

[1052] **결론**

[1053] 이 실시예의 결과는 1) UB-VV100 바이러스 입자가 건강한 인간 PBMC로부터의 T 세포를 표면-조작 의존적 방식으로 활성화 및 형질도입시키고; 2) UB-VV100 바이러스 입자가 B 세포 악성종양 환자의 PBMC로부터의 T 세포를 형질도입시키며; 3) UB-VV100 형질도입된 CAR T 세포가 시험관내에서 CD19 특이적 항종양 활성을 전시한다는 것을 입증한다.

[1054] ***실시예 12: 마우스에서 UB-VV100의 안전성 및 생체분포***

[1055] 연구 개요

[1056] 본 연구의 목적은 UB-VV100 내약성을 평가하고 3가지 마우스 모델(야생형 C57BL/6J 마우스, NSG CD34-인간화 마우스[균종 NOD/SCID/IL2Rɣnull (NSG) - CD34+ 제대혈에 의해 인간화됨] 및 NSG MHCI/II DKO 마우스[균종 NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *H2-K1*^{tm1Bpe} *H2-Ab1*^{em1Mvw} *H2-D1*^{tm1Bpe} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ], PBMC 인간화됨)에서 벡터 생체분포에 대한 시간 및 용량의 효과를 비교하는 것이었다. NSG MHCI/II DKO 마우스에서는 NOD SCID-IL-2 수용체 감마가 결실되었다(성숙한 B, T 및 NK(자연 살해), 단핵구 세포 및 보체가 결여된 면역결핍 모델). 이 마우스는 또한 내인성 MHC I 및 II 발현도 결여되어 있다. CD34-NSG 마우스는 NOD SCID-IL-2 수용체 감마가 결실되었고(성숙한 B, T 및 NK(자연 살해), 단핵구 세포 및 보체가 결여된 면역결핍 모델), 인간 면역계의 재구성을 위해 CD34+ 세포가

생착되었다.

[1057] UB-VV100 바이러스 입자는 서열번호 122, 123, 126, 101 및 103을 포함했다. CD19-지시성 CAR+ T 세포의 존재 및 양은 유세포분석에 의해 말초 혈액, 비장 조직 및 골수에서 측정했다. UB-VV100 활성의 지표인자이며 CAR+ T 세포의 존재에 대한 초기 대용물 측정인 B 세포 무형성증은 유세포 분석에 의해 혈액에서 평가했다. 벡터 통합은 마우스 조직에서 추출한 게놈 DNA의 ddPCR 분석에 의해 결정되었다. 전이유전자 RNA 수준의 전반적인 발현을 평가하고 각 조직 내에서 형질도입된 세포의 정체를 결정하기 위해 다중체 RNA 동일계내 혼성화(ISH)를 수행했다.

[1058] 현탁액 HEK293T 클론 A3 세포를 사용하여 UB-VV100 벡터 입자를 제조했다. 바이러스 수확 후, Mustang Q XT5 시스템을 사용하여 물질을 정제하고, 농축하고, 0.22uM 필터를 통해 멸균 여과했다. 바이러스 제조물은 CTS™ OpTmizer™(ThermoFisher Scientific)에서 제형화했고 분취하여 1회용 부피로 -80℃에 저장했다. 모든 바이러스 제조물은 대상체에게 투여하기 전에 마이코플라즈마 및 내독소에 대해 테스트했다. 모든 동물에게 연구 5일에 시작하여 연구 종료 시까지 계속하여 주 3회(M, W, F) 라파마이신을 투여했다.

[1059] UB-VV100 및 라파마이신 투약 둘 모두를 위한 비히클 대조군으로서 초순수 등급 인산염 완충 식염수(PBS), USP, pH 7.4를 대상체에게 투여했다. 모든 마우스는 표 9에 제시된 연구 그룹에 따라 코호트로 무작위로 배정했다.

표 9: 연구 그룹

연구 설계							
그룹	마우스 균종	PBMC IP (-1 일)	UB-VV100 TU IP (0 일)	라파마이신 IP (M, W, F 5 일 시작)	부검 N (M/F)		
					1 주	4 주	12 주
1	C57BL/6J	N/A	비히클	1 mg/kg	0	2 (1/1)	2 (1/1)
2	C57BL/6J	N/A	2000 만	1 mg/kg	0	4 (2/2)	4 (2/2)
3	NSG MHC I/II DKO	2000 만	비히클	1 mg/kg	0	2 (1/1)	2 (1/1)
4	NSG MHC I/II DKO	2000 만	2000 만	1 mg/kg	0	4 (2/2)	4 (2/2)
5	NSG MHC I/II DKO	2000 만	2000 만	0 mg/kg	0	0	4 (2/2)
6	NSG MHC I/II DKO	PBS	2000 만	1 mg/kg	0	4 (2/2)	0
7	CD34-NSG	N/A	비히클	1 mg/kg	2 (0/2)	2 (0/2)	2 (0/2)
8	CD34-NSG	N/A	2000 만	1 mg/kg	4 (0/4)	4 (0/4)	4 (0/4)
9	CD34-NSG	N/A	2000 만	0 mg/kg	0	0	4 (0/4)
10	CD34-NSG	N/A	1 억	1 mg/kg	0	4 (0/4)	0
				합계	6 (0/6)	26 (8/18)	26 (8/18)
TU = 형질도입 단위; IP = 복강내; M = 수컷; F = 암컷; M = 월요일; W = 수요일; F = 금요일							

[1060]

[1061] **결과**

[1062] UB-V100은 인간 T 세포와 인간 B 세포를 모두 수용하는 CD34-인간화 NSG 마우스에 투여하여, 2가지 용량 범위에 걸쳐 생체 내에서 CD19 표적화 CAR-T 세포를 생성하는 능력을 평가했다: 저용량 2000만 TU/동물 및 고용량 1억 TU/동물. 마우스를 비히클 및 라파마이신(그룹 7), 저용량 UB-VV100(2000만 TU/마우스) 및 라파마이신(그룹 8), 라파마이신 없이 저용량 UB-VV100(2000만 TU/마우스)(그룹 9), 또는 고용량 UB-VV100(1억 TU/마우스) 및 라파마이신(그룹 10)으로 처리했다. 그 다음, 결과적으로 생성된 항-CD19 CAR-T 세포가 내인성 B 세포 고갈을 유발하는 능력을 평가하여 정확한 활성을 확인했다. UB-V100 투여 후 처음 4주 동안의 하위세트를 활성에 대해 분석

했는데, 이는 인간화 수준이 이 기간 이후에 크게 감소했기 때문이다.

[1063] UB-VV100은 비히클 처리된 대조군과 비교하여 저용량 또는 고용량 UB-VV100으로 처리된 CD34-NSG 마우스의 혈액에서 인간 CD20+ B 세포의 용량 의존적 고갈을 초래했다(도 45). B 세포 수준(단일 세포, 살아있는 세포 및 hCD45+에 게이트화된 hCD20+ 세포 집단)은 투약 전, 뿐만 아니라 연구 7일부터 시작하는 UB-VV100 투여 후 매주 채취한 혈액에서 시간 경과에 따라 측정했다. 인간 B 세포 수준은 비히클 처리된 마우스(그룹 7)에서 인간화 상실로 인해 시간이 지남에 따라 자연스럽게 고갈되었지만, 인간 B 세포 빈도의 유의미한 용량-의존적 고갈은 UB-VV100 처리된 마우스에서 일어났다(도 45).

[1064] 내인성 순환 마우스 B 세포의 고갈은 비히클 및 라파마이신 처리된 대조군(그룹 1)과 비교할 때 저용량 UB-VV100 및 라파마이신(2000만 TU/마우스; 그룹 2)에 의해 처리된 야생형 마우스에서 관찰되지 않았다(데이터는 제시되지 않음). 이러한 발견은 UB-VV100에 의해 발현된 항-인간 CD19 CAR 작제물 상의 FMC63 결합제가 마우스 CD19와 교차 반응할 것으로 예측되지 않는다는 사실과 일치한다.

[1065] UB-VV100-생성 항-CD19 CAR-T 세포의 검출은 인간 면역 세포 유세포 분석 패널에서 항-FMC63 항체를 사용하여 달성되었다. CAR-T 세포 수준(단일 세포, 살아있는 세포, hCD45+ 세포 및 hCD3+ 세포에 대해 게이트화된 CAR+ 집단)은 1주 내지 12주 동안 혈액에서, 그리고 예정된 부검 시점 동안 비장 및 골수에서 측정되었다. 항-FMC63 항체는 또한 마우스 면역 세포 유세포분석 패널과 함께 사용되어, 야생형 마우스(그룹 1-2) 및 예정된 부검 시점 동안 인간화 마우스의 비장 및 골수(그룹 3-10)에서 CAR+ 면역 세포 집단을 평가했다.

[1066] 비히클 대조군(그룹 7)과 비교하여 고용량(1억 TU/동물) UB-VV100 및 라파마이신(그룹 10)으로 처리된 CD34-NSG 마우스의 혈액에서는 CAR-T 세포의 유의미한 증가가 검출되었고, 최고 수준은 4주차에 일어났다(도 54a). CAR-T 세포 수준은 또한 고용량 UB-VV100 CD34-NSG 마우스의 비장에서 유의미하게 더 높았으며 저용량(2000만 TU/동물) UB-VV100 및 라파마이신(그룹 8)으로 처리된 일부 마우스의 비장에서 검출되었다.

[1067] 저용량(2000만 TU/동물)의 UB-VV100으로 처리된 야생형 C57BL/6J 마우스의 혈액, 골수 또는 비장에서는 어떠한 시점에서도, 비히클 처리된 동물의 수준 이상의 CAR+ 마우스 T 세포(mCD3+ 세포) 염색이 검출되지 않았다. 이러한 발견은 UB-VV100 바이러스 입자의 표면에 존재하는 αCD3 scFv 분자가 마우스 CD3에 결합하지 않으므로 마우스 T 세포를 활성화하거나 형질도입시키지 않을 것이라는 예측과 일치한다.

[1068] 각 ddPCR 양성 조직 내의 어떤 세포 유형이 UB-VV100 페이로드를 통합시켰는지를 결정하기 위해, 비장, 난소, 간, 신장 및 폐를 함유하는 다중 조직 어레이에서 RNAscope™ LS Multiplex Fluorescent ISH 검정을 수행했다. 검정은 CD34-NSG 마우스의 조직에 대해 수행했고; 1마리는 음성 대조군으로서 비히클 처리되었고(그룹 7), 4마리는 고용량 UB-VV100으로 처리되었다(그룹 10). 4-다중체 염색은 UB-VV100의 RACR 영역을 표적으로 하는 맞춤형 RNA ISH 프로브, 인간 T 세포(hCD3)를 표적으로 하는 RNA ISH 프로브, 마우스 대식세포/단핵구(mCD68)를 표적으로 하는 RNA ISH 프로브, 및 마우스 내피 세포(mPecam)를 표적으로 하는 RNA ISH 프로브를 함유했다. 이 평가에 사용된 세포 마커는 RACR RNA ISH 프로브의 초기 검정 개발 중에 테스트 조직의 RACR+ 세포 형태학에 대한 병리학자의 검토를 기반으로 하여 선택했다. 자격을 갖춘 과학자가 육안 채점을 수행하여 전체 샘플에 걸쳐 우세한 염색 패턴을 기반으로 각 샘플에 단일 점수를 할당했다. 각 마커에 대해 양성인 세포의 백분율, 뿐만 아니라 다른 세포 유형 마커에 대해 이중 양성인 RACR+ 세포의 백분율은 >1 점/세포인 세포의 수에 기초하여 육안으로 점수를 매기고 범주(0%, 1- 10% 등)에 처분되었다.

[1069] 모든 샘플은 품질 관리를 통과한 음성 대조 염색을 가졌고 비히클 처리된 마우스 조직(TOX001_39)은 모든 조직에서 RACR mRNA 발현에 대해 음성이었다. UB-VV100 고용량 그룹의 조직 전체에서 RACR 양성 염색은 비장(모든 마우스의 경우 11-20%) 및 CD80(모든 마우스의 경우 1-10%)에서 가장 높았다. RACR 양성 세포는 심장에서 관찰되지 않았다. 난소, 신장 및 폐에서 RACR 양성은 전혀 없거나 매우 드물게 발생했다(0%, <5개 세포 또는 <1%). 이러한 결과는 동일한 조직에서 ddPCR에 의해 검출된 벡터 게놈의 수준과 매우 밀접한 관련이 있다(데이터는 제시되지 않음).

[1070] 세포 유형을 분류하기 위해 각 조직에서 RACR+ 세포의 이중 양성 분석도 수행했다. 모든 마우스에서, 대다수의 RACR+ 세포는 mCD68 또는 hCD3에 대해 공동양성이었고, 이는 검출된 벡터 게놈이 면역 세포(대식세포 또는 T 세포)의 형질도입으로 인한 것임을 나타낸다(도 47). 비장에서, 3개의 세포 유형 마커의 염색 사이의 중첩이 주목되었고(아마도 조직의 높은 세포 밀도로 인함); CAR-T 세포는 모든 UB-VV100 처리된 마우스의 비장에서 검출되었지만 CAR+ 대식세포가 더 일반적이었다. 간에서, 대부분의 RACR+ 세포는 약간의 더 희귀한 RACR+ 내피 세포를 갖는 대식세포였지만, Pecam과 CD68 신호 사이의 중첩이 주목되었다(도 47). 희귀한 RACR+ 내피세포 형질도입도

일부 조직에서 관찰되었다. 모든 마커에 대해 음성인 1 내지 3개의 RACR+ 세포가, 일부 마우스의 외부 난소 내벽 또는 자궁 내벽에서 식별되었고, 이는 직접 노출로 이어지는 투여 경로(복강내)의 결과일 가능성이 높다. 자궁/난소를 감싸고 있는 세포와 마우스 1 마리의 신장에 있는 몇몇 세포를 제외하고 분류되지 않은 RACR 양성 세포 유형은 관찰되지 않았다.

[1071] UB-VV100 렌티바이러스 입자의 기능을 추가로 향상시키기 위해, T 세포 공동자극 리간드를 입자 표면에 혼입시켜 입자 결합, T 세포 활성화 및 형질도입과 연계하여 공동자극을 개시하도록 했다. 시험관내에서 입자 표면에 하나 이상의 공동자극 리간드의 혼입은 T 세포에 대한 렌티바이러스 입자의 결합 및 활성화를 향상시켜 형질도입된 CAR+ T 세포의 증식 및 활성화를 향상시켰다. 또한, 공동자극 리간드-전시성 UB-VV100 렌티바이러스 입자에 의해 생성된 CAR T 세포는 덜 분화된, 중심 기억-유사 표현형을 나타냈고, 공동자극 리간드 없이 생성된 CAR-T 세포와 비교하여 시험관내 CAR 매개 증식 및 종양 사멸을 향상시켰다. 공동자극 리간드 표면-조작된 UB-VV100 렌티바이러스 입자는 B 세포 악성종양의 인간화 NSG 마우스 모델에서 향상된 항종양 활성을 갖는 CAR T 세포를 생체내에서 생성하는 것으로 관찰되었다. 예를 들어, UB-VV100 렌티바이러스 입자는 T 세포 공동자극 리간드인 CD80을 혼입시켜 최적화되었고, 이는 T 세포 활성화 및 형질도입 동안 CD28 공동자극을 촉발한다. 입자 표면에 CD80의 존재는 T 세포에 대한 렌티바이러스 입자 결합 및 T 세포의 활성화를 향상시켜, 시험관내에서 CAR+ T 세포의 향상된 증식 및 활성화를 초래했다. CD80-함유 렌티바이러스 입자에 의해 생성된 CAR T 세포는 B 세포 악성종양의 인간화 NSG 마우스 모델에서 향상된 항종양 활성을 야기한다.

[1072] 결과는 항-종양 면역 반응을 개시하기 위한 UB-VV100 렌티바이러스 입자의 집합적 작용 메커니즘이 T 세포가 형질도입이 가능하게 하면서 이들의 면역표현형 및 기능을 최적화하는데 필수적인 T-세포 활성화 및 공동자극 경로를 체결시키는 표면 전시된 리간드의 조합을 발현시킴을 통해 증강될 수 있다는 것을 암시한다.

[1073] UB-VV100 독성학 연구는 개에 대한 결절내 투여를 사용하여 유리한 안전성 및 생체분포 프로필을 추가로 입증했다. 연구 설계는 표 10에 묘사되어 있다.

표 10: 연구 그룹

그룹 No.	테스트 물질	용량 수준 (TU/ 동물)	용량 부피 (uL/ 주사 부위)	용량 부피 (uL/ 동물)	용량 Conc. (TU/mL)	Adm.경로
1	비히클	0	300	600	0	양측서혜부 LN
2	αCD3-Cocal-EGFP	3.98e8	300	600	6.63e8	양측서혜부 LN
3	αCD3-Cocal-EGFP	3.98e9	6000	6000	6.63e8	IP
4	αCD3-Cocal-EGFP	3.98e8	300	600	6.63e8	양측서혜부LN

Conc. = 농도; No. = 번호; TU = 형질도입 단위; LN= 림프절; IP = 복강내; Adm = 투여

[1074]

[1075] 그룹 1의 대조군 동물의 모든 조직 및 혈액 샘플은 αCD3-Cocal-GFP에 대해 음성이었다. 그룹 2, 3 및 4는 뇌, 난소, 고환, 심장, 부신, 척수 흉부, 신장, 폐, 흉선, 주사 부위 및 간에서 음성이거나 정량화 하한치 미만이었다(도 66). αCD3-Cocal-EGFP를 림프절내 및 복강내로 각각 3.98e8 TU/mL 및 3.98e9 TU/mL로 1회 투여는 개과에서 내약성이 양호했다. 생물내 독성 엔드포인트(임상 징후, 체중, 음식 소비 및 임상 병리)에 대한 영향은 없었고 사후 육안 및 현미경적 소견도 없었다. qPCR에 의한 αCD3-Cocal-GFP의 정량화는 혈액(복강내를 통해), 표재성 서혜부, 내측 장골 및 요추 림프절(결절내를 통해) 및 비장(복강내 및 결절내 모두)에서 검출을 보여주었다.

[1076] 개에 대한 UB-VV100 렌티바이러스 입자의 결절내 투여는 내약성이 양호했고 주입된 림프절로 크게 제한되는 형질도입을 초래했으며, 하류 배액 림프절에서는 약 90% 더 낮은 형질도입을 보였고, 비-면역 기관에서는 형질도입을 보이지 않았다.

[1077] **결론**

[1078] 본 연구에서, 3가지 마우스 모델(야생형 C57BL/6J 마우스, CD34-인간화 NSG 마우스 및 PBMC 인간화를 갖는 NSG MHCI/II DKO 마우스)을 평가했다. UB-VV100은 3가지 마우스 모델 모두에서 동물당 2000만 TU 용량에서, 그리고 CD34-NSG 마우스에서 동물당 1억 TU의 용량에서 내약성이 양호했다. 중요한 것은 위원회-인증 병리학자에 의한 조직병리학적 조직 평가에서 UB-VV100 치료와 결정적으로 관련된 어떠한 현미경적 소견도 발견하지 못했다는 것이다.

[1079] UB-VV100 처리는 CD34 및 PBMC 인간화 NSG 마우스의 혈액 및 비장에서 인간 CAR-T 세포의 생체내 생성을 초래했다. UB-VV100의 표적인 인간 T 세포가 결여된 야생형 C57BL/6J 마우스에서는 UB-VV100 생물학적 활성(CAR-T 세포 생성, B 세포 고갈)의 어떠한 증거도 검출되지 않았다. 전체 UB-VV100 생물학적 활성은 PBMC 인간화 마우스에 바이러스 αCD19 CAR 페이로드의 표적인 인간 B 세포가 부족하므로, CD34-인간화 NSG 마우스에서만 평가할 수 있었다. CD34-NSG 마우스에 UB-VV100을 복강내 주사한 후 처음 28일 동안에는 시간이 지남에 따라 순환 B 세포의 유의미한 용량-의존적 고갈이 관찰되었다(도 45).

[1080] UB-VV100의 생체분포는 검정의 높은 민감도로 인해 조직-추출된 게놈 DNA에 대한 ddPCR을 사용하여 먼저 평가되었고, 그 다음 다중 RNA ISH를 통해 ddPCR 양성 조직 중 형질도입된 세포의 세포 유형을 식별했다. 2,000만 TU UB-VV100의 단일 복강내 주사로 투약된 3가지 마우스 모델 모두에서, 검출가능한 벡터 카피의 존재는 대체로 간 및 비장에 제한되었고(도 46c 및 46d), 관찰된 우세한 형질도입된 세포 유형은 인간 T 세포 및 마우스 대식세포였다. 조직 상피 세포의 드문 형질도입은 일부 조직에서 관찰되었다. 벡터 통합은 CD34-NSG 마우스(2가지 용량 수준으로 처리된 유일한 모델)에서 용량 의존 방식으로 발생했다. 2000만 TU UB-VV100 용량에서는 심장, 뇌, 신장 및 폐에서 비히클 대조군을 초과하는 형질도입이 관찰되지 않았다(도 46c).

[1081] 결론적으로, 본 연구에서 형질도입 이벤트가 검출된 우세한 조직은 간 및 비장이었고, 관찰된 우세한 형질도입된 세포 유형은 인간 T 세포 및 마우스 대식세포였다(도 47). 드물게 형질도입된 비-면역 세포는 이들 조직 및 IP 투여 경로에 기인한 외부 난소 내벽에서 식별 가능했다. 저용량에서는 심장, 뇌, 신장 및 폐에서 비히클 대조군 수준을 초과하는 형질도입이 측정되지 않았다. 중요한 것으로, UB-VV100 투여와 결정적으로 관련된 조직병리학적 소견이 관찰되지 않았다.

[1082] 데이터는 UB-V100으로 형질도입된 CD34-인간화 NSG 마우스 모델이 완전한 생물학적 활성(CAR-T 세포 생성 및 B 세포 무형성증)을 갖고 마우스가 더 높고 더 안정적인 인간화 수준을 전시한다는 것을 보여준다.

[1083] ***실시예 13: VV100에 의한 CD19+ B 세포의 형질도입***

[1084] VV100은 생체내에서 T 세포를 선택적으로 활성화하고 형질도입하도록 조작된 렌티바이러스 의약품이다. VV100 렌티바이러스 의약품은 서열번호 122, 123, 127, 124 및 125를 포함했다. 선택적 T 세포 활성화는 바이러스 외피에서 항-CD3-scFv의 발현에 의해 달성된다. 렌티바이러스는 FMC63 scFv, 짧은 IgG4 힌지(서열번호 95) 및 종양 표적화를 위한 4-1BB/CD3ζ 신호전달 도메인을 갖는 항-CD19-CAR을 암호화한다. 이는 또한 라파마이신의 존재 하에 CAR-T 세포 생존 및 증식을 촉진하기 위해 라파마이신 활성화 사이토카인 수용체 카세트(FRB-RACR)를 암호화한다(도 23b). 본 연구의 목적은 결절내 주사를 통해 CD19-발현 B 세포 악성종양을 치료하는 VV100의 치료적 적용을 평가하는 것이었다.

[1085] 에피토프 차폐는 종양 B 세포가 항-CD19 CAR을 발현하도록 의도하지 않게 형질도입된 경우에 일어나고, CAR의 발현은 CD19 에피토프를 보이지 않게 하거나, 또는 CAR T 세포에 의한 인식에 대해 '차폐'되도록 한다. 에피토프 은폐를 유도하는 기본 메커니즘은 종양 세포 표면 상의 CD19에 대한 시스(cis)로의 항-CD19 CAR 결합이다. 이 현상은 항-CD19 CAR T 세포 산물 CTL019로 처리된 소아 B-ALL 환자에서 처음으로 보고되었다(Ruella M, 등 *Nat Med*. 2018;24(10):1499-1503). CTL019는 45개 아미노산 길이의 CD8a 힌지를 암호화한다. CD8a 힌지의 길이가 길수록 CAR 결합 에피토프에 접근하는 데 필요한 유연성을 제공하여 에피토프 차폐를 가능하게 한다는 가설이 세워진다. VV100에 의한 에피토프 차폐의 위험을 최소화하기 위해 항-CD19 CAR은 짧은 IgG4 힌지(14개 아미노산)를 암호화하도록 의도적으로 설계했다. CD19의 구조 분석은 CAR 에피토프의 막 원위 위치를 입증하고, 따라서 짧은 힌지로는 CAR이 시스-결합을 위해 쉽게 접근할 수 없다. VV100에 의해 에피토프 차폐가 일어나는지를 평가하기 위해, B-ALL 종양 세포주인 Nalm6 세포를 VV100으로 형질도입시켜 형질도입된 CD19+ 종양 세포 시나리오를 모델링했다. 이 연구는 2가지 질문에 답하기 위한 것이었다: (1) CAR+ Nalm6 세포가 표면 CD19 검출의 명백한 상실을 유세포분석에 의해 나타내는가? 및 (2) 항-CD19 CAR-T 세포가 CAR+ Nalm6 세포를 사멸시킬 수 있는가?

[1086] **결과**

[1087] CD19+ B 세포를 VV100으로 형질도입한 효과를 결정하기 위해, B-ALL 종양 세포주인 Nalm6을 모델로 사용했다. MOI 1에서 VV100을 사용한 형질도입은 37.6% CAR+ Nalm6 세포를 생성한 반면, MOI 10 및 20에 의한 형질도입은 10일경에 70% CAR+ Nalm6 세포를 갖는 훨씬 더 높은 형질도입 효율을 야기했다. 다음으로, CAR+ Nalm6 세포는 항-CD19 항체(클론 HIB19)로 염색하여 표면 CD19 수준을 유세포분석에 의해 평가했다(도 48a). HIB19 항체는 항-CD19 CAR FMC63 scFv와 동일한 CD19 에피토프에 결합한다. 이 항체를 사용하여, CAR+ Nalm6 세포가 형질도입되지 않은 Nalm6 모 세포와 비교하여 감소된 표면 CD19 검출을 가졌고, 더 높은 MOI에 의한 형질도입이 더 낮은 표면 CD19 MFI를 야기한다는 것이 관찰되었다(도 56a). CAR+ Nalm6 세포가 세포내 CD19 에피토프(클론 EPR5906)를 인식하는 다른 항-CD19 항체로 염색되었을 때, 전체 CD19 단백질 수준은 형질도입되지 않은 Nalm6 세포와 유사한 것으로 관찰되었고, 이는 CD19 단백질이 여전히 CAR+ Nalm6 세포에서 발현된다는 것을 확인시켜준다. (도 48b). 이 데이터는 HIB19 항체에 의해 인식되는 CD19 에피토프가 CD19에 대한 항-CD19 CAR의 시스 결합에 의해 차단되기 때문에 CAR+ Nalm6 세포가 표면 CD19 검출을 감소시킨다는 것을 보여준다. 그러나, CAR+ Nalm6 세포 상의 표면 CD19 수준은 여전히 검출가능하고 CD19 녹아웃 Nalm6 세포 수준 이상이다.

[1088] 항-CD19 CAR-T 세포가 감소된 표면 CD19 검출을 갖는 CAR+ Nalm6 세포를 사멸시킬 수 있는지를 결정하기 위해, 시험관내 사멸 검정을 확립했다. Nalm6 GFP 세포는 MOI 10의 VV100으로 형질도입시켰고, 전술한 연구에서 관찰된 바와 같이 감소된 표면 CD19 검출을 갖는 88% CAR+ Nalm6 세포를 생성했다. 3명의 건강한 공여자의 PBMC는 VV100에 의해 형질도입되어, 7.8% 내지 19%의 CAR-T 세포를 생성했다. 그런 다음, 형질도입된 Nalm6 세포는 상이한 CAR-T 대 Nalm6 비율로 형질도입된 PBMC와 공동배양했다. 배경인 비특이적 사멸에 대해 정규화하기 위해, 형질도입된 Nalm6 세포를 모의 형질도입된 PBMC와 함께 공동배양했다. 24시간 후, 형질도입된 Nalm6 세포는 유세포분석에 의한 세포내 전이유전자 발현(항-P2A 항체에 의해 검출됨)에 기초하여 CAR+ Nalm6 세포로서 게이트화되었다. 용해의 백분율은 CAR-T 세포와 함께 공동배양되었을 때 죽은 CAR+ Nalm6 세포의 빈도에서 모의-형질도입된 PBMC와 공동배양되었을 때 죽은 CAR+ Nalm6 세포의 빈도를 뺀 값으로 계산되었다. 도 49에 도시된 바와 같이, 항-CD19 CAR-T 세포는 CAR+ Nalm6 세포를 사멸시킬 수 있었다. 중요한 것으로, 용해의 백분율은 CAR+ Nalm6 세포와 형질도입되지 않은 Nalm6 부모 세포 사이에 유사했으며, 이는 모두 건강한 3명의 공여자에서의 CD19 녹아웃 Nalm6 세포의 용해율보다 더 높은 것이었다. 데이터는 Nalm6 세포가 VV100으로 형질도입될 때 에피토프 차폐 및 후속적인 항원 탈출이 일어나지 않음을 입증한다. 하지만, 감소된 표면 CD19 검출에도 불구하고, 항-CD19 CAR-T 세포는 여전히 시험관내에서 CAR+ Nalm6 세포에 대한 CD19 항원 특이적 세포용해 활성을 매개할 수 있다.

[1089] VV100이 환자에게 주입되면 종양 세포가 바이러스 입자에 노출될 수 있다. 형질도입 시 많은 수의 종양 B 세포가 존재하는 시나리오를 모델링하기 위해, 5e5 Nalm6 GFP 세포 및 5e5 건강한 공여자 PBMC를 혼합하고 MOI 5의 VV100으로 형질도입시켰다(도 50). 이 모델에서 VV100을 사용한 형질도입은 동일한 웰에서 항-CD19 CAR-T 세포 및 CAR+ Nalm6 세포를 생성한다. 그런 다음 항-CD19 CAR-T 세포가 CAR+ Nalm6 세포를 제거하는지 또는 CAR+ Nalm6가 검출을 피하고 확인되지 않은 상태로 성장하는지 여부를 평가할 수 있다. 다수의 건강한 공여자로부터의 항-CD19 CAR-T 세포가 CAR+ Nalm6 세포를 사멸시킬 수 있는지를 이해하기 위해, 8명의 건강한 공여자로부터의 PBMC를 단일 실험에서 연구했다. 건강한 공여자는 PBMC 샘플 내 나이브 및 기억 T 세포 하위집합의 다양한 백분율을 갖는 광범한 연령 범위를 나타낸다.

[1090] 8명의 건강한 공여자 모두에서, Nalm6 세포 및 PBMC의 혼합된 집단을 VV100 또는 무관한 항-FITC CAR로 형질도입하면 CAR+ Nalm6 세포 및 CAR-T 세포 둘 모두가 생성되었다(도 51 및 52). 3일째에, VV100을 사용한 형질도입은 감소된 표면 CD19 검출을 가진 51.7% 내지 67.9% 항-CD19 CAR+ Nalm6 세포를 생성했다. 7일경에, 모든 항-CD19 CAR+ Nalm6 세포가 8명의 건강한 공여자 중 7명에서 제거될 때까지 항-CD19 CAR+ Nalm6 세포의 빈도 및 총 수는 감소했다(도 51b). 대조적으로, 무관한 CAR에 의한 형질도입은 어떤 Nalm6 세포도 제거하지 않았으며, 이는 CAR+ Nalm6 세포의 사멸이 CD19 에피토프에 결합하는 항-CD19 CAR-T 세포에 의해 매개된다는 것을 입증한다.

[1091] 건강한 공여자 66BW는 7일경에 Nalm6 세포를 제거하지 않았지만, 이 공여자는 CAR- 및 CAR+ Nalm6 세포에 대한 제어를 나타냈다(도 51). 본 발명자들은 이것이 66BW가 빠르게 분열하는 Nalm6 세포를 제거하기에 충분한 CAR-T 세포 수를 생성하지 않았기 때문에 발생했다고 가정한다. 7일차에 66BW는 다른 건강한 공여자에 비해 가장 낮은 빈도(2.03%) 및 CAR-T 세포의 총 수(1.39e4)를 가졌다(도 52). 이 공여자에서 VV100을 사용한 형질도입은 항-FITC CAR(4.78e6 세포)를 사용한 형질도입과 비교하여 10일째에 여전히 더 적은 Nalm6 세포(7.31e5 세포)를 초래했고, CAR+ 및 CAR- Nalm6 세포의 비율은 시간이 지남에 따라 일정하게 유지되었다. 이는 공여자 66BW가 CAR+ 및 CAR-Nalm6 둘 다에 대해 유사한 수준의 제어를 가졌고 사멸의 임의의 명백한 감소가 Nalm6 세포에 의한 CAR

발현으로 인한 것이 아니라, 이 공여자에 특이적인 T 세포 이펙터 기능의 전반적인 결함 때문이라는 것을 나타낸다(도 51a 및 51b). 전반적으로, 이 데이터는 항-CD19 CAR-T 세포가 VV100 처리 후 CAR+ Nalm6 세포를 표적으로 하고 사멸시킬 수 있음을 확인시켜 주며, 이는 CD19+ B 세포가 VV100으로 형질도입될 때 에피토프 차폐가 일어나지 않는다는 것을 입증한다.

[1092] **결론**

[1093] VV100으로 형질도입된 Nalm6 세포는 감소된 표면 CD19 검출을 갖지만, 감소된 수준은 CD19 녹아웃 Nalm6 세포보다는 높다. 시험관내 사멸 검정에서, 항-CD19 CAR-T 세포는 CAR+ 및 CAR- Nalm6 세포 사이에서 유사한 용해 백분율로 CAR+ Nalm6을 사멸시킬 수 있다. Nalm6 및 PBMC의 혼합 집단이 VV100으로 형질도입될 때 항-CD19 CAR-T 세포는 동일한 웰에서 CAR+ Nalm6 세포를 제거할 수 있다.

[1094] ***실시예 14: Nalm-6 전신 종양 모델에 대한 UB-VV100의 상이한 버전의 비교***

[1095] 인간화 NSG 마우스 모델에서 UB-VV100의 상이한 버전의 효능을 평가하기 위해, 현탁법 대 부착 방법에 의해 생성되고, 상이한 페이로드 버전으로 생성되고, 상이한 항-CD3 scFv 버전으로 생성된 UB-VV100을 비교 및 분석했다.

[1096] 이 연구는 부착성 UB-VV100 입자의 효능을 현탁 UB-VV100 입자와 직접 비교했다. 이 실험을 수행하기 위해, 7개의 상이한 처리 그룹을 분석했다: 마우스의 두 그룹을 WPRE 함유 페이로드(142)(서열번호 121) 또는 WPRE가 없는 페이로드(201)(서열번호 122)를 비교하는 4-플라스미드 시스템을 사용하여 293T 부착 세포에 의해 생성된 20E+0.6 TU의 UB-VV100으로 처리했다. 마우스의 2개 그룹을 전이유전자 서열번호 122 및 αCD3 scFv(서열번호 126)를 사용하여 5-플라스미드 시스템으로 생성된 현탁 벡터인, VPN38의 20E+06 또는 100E+06 TU로 처리했다. 2그룹의 마우스는 αCD3 scFv 결합제(서열번호 127)를 함유하는 5-플라스미드 현탁 벡터인 VPN68의 20E+06 또는 100E+06 TU로 처리했다.

[1097] 연구의 목표는 다음과 같았다:

[1098] 1) 전이유전자 서열번호 121에 의해 제조된 부착성 벡터가 전이유전자 서열번호 122에 의해 제조된 부착성 벡터와 비교 가능한지 결정하고자 한다.

[1099] 2) 유착 벡터에서 현탁 벡터로 제조 변경하는 동안 효능이 감소했는지 결정하고자 한다.

[1100] 3) 100E+06 TU로의 용량 증량이 부착성 로트에 비해 현탁 로트에 의해 관찰되는 활성/PK 이동의 잠재적 손실을 극복할 수 있는지를 평가하고자 한다.

[1101] 4) 항-CD3 scFv 결합제(서열번호 127)를 버전(서열번호 126)과 비교하고자 한다.

[1102] **연구 개요**

[1103] 48마리의 6-8주령 암컷 마우스 NSG MHC 클래스 I 및 II KO 마우스를 연구에 사용했다. 렌티바이러스는 293T 부착 세포에 대해 적정된 293T 부착 생산(142(서열번호 121), 201(서열번호 122))을 사용하여 제조했다. 현탁 로트는 293T 현탁 세포(VPN38 및 VPN68)에서 생성되었고 ddPCR에 의해 SUPT1 세포에 대해 적정되었다. UB-VV100 바이러스 제조물은 각각 2 EU/ml 미만의 내독소 활성을 가진 마이코플라스마에 대해 음성이었다.

[1104] 감염 당일 아침, 바이러스를 실온에서 해동하고 PBS에 희석했다. 바이러스 제조물을 얼음에 보관하고 마우스당 500ul(IP)를 주사하기 전에 실온으로 평형화시켰다.

[1105] **연구 프로토콜**

[1106] 연구 -5일차에, 40마리 마우스에 안와후 주사를 통해 5E05 Nalm-6 GFP FFLUC 종양 세포를 생착시켰다. 연구 -1일차 아침에 성공적인 생착을 보장하기 위해 IVIS 이미징으로 종양 부하를 평가했고, 같은 날 마우스를 IP 주사를 통해 1000만 인간 PBMC로 인간화했다. 이 시점에서 마우스를 연구 부문으로 할당하고 종양 부하에 기초하여 7개의 처리 그룹으로 나누었다. 연구 0일차에 마우스를 IP를 통해 UB-VV100 또는 비히클로 처리했다(표 11). 연구 4일차부터 시작하여 모든 마우스를 복강내 주사를 통해 월요일/수요일/금요일 일정으로 1mg/kg의 라파마이신으로 처리했다. 연구 시간표는 도 53에 도시된다.

표 11: 연구 그룹

그룹	N	종양 (-5 일 RO) 50 만	인간화 (-1 일)	UB-VV100 0 일	라파마이신 (4 일)
1	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	비히클	1mg/kg MWF
2	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	20e6 VV100 부착 142 페이로드 (서열번호 121)	1mg/kg MWF
3	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	20e6 VV100 부착 201 페이로드 (서열번호 122)	1mg/kg MWF
4	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	20e6 VV100 현탁 VPN38	1mg/kg MWF
5	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	100e6 VV100 현탁 VPN38	1mg/kg MWF
6	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	20e6 VV100 현탁 VPN68	1mg/kg MWF
7	5	Nalm6	1000 만 PBMC IP	100e6 VV100 현탁 VPN68	1mg/kg MWF

[1107]

[1108] **결과**

[1109] 연구 동안 동물을 생존에 대해 모니터링했다. 비히클로 처리된 모든 동물은 연구 22일경까지 사망했고, 반면 UB-VV100의 부착 또는 현탁 로트로 처리된 동물은 이 시점 이후에도 생존을 보였다(도 54). 동물의 40%는 안와 후 종양의 발달로 인해 연구 기간 동안 안락사되어야 했다. 또한, 1억 TU의 VPN68을 받은 5마리의 동물은 플러딩(flooding) 이벤트 직후 급격한 체중 감소로 인해 안락사시켰다.

[1110] 벡터 투여 직후에 T 세포 활성화를 평가하기 위해 3일차에 T 세포 집단을 분석했다. 모든 연구 부문에서 CD25 발현이 낮은 것으로 밝혀졌다(데이터는 나타내지 않음). UB-VV100 T 세포의 다양한 테스트 로트를 처리한 동물에서, East 테스트 로트는 비히클로 처리한 동물의 T 세포보다 CD71 발현이 더 높았다(도 55). VPN68의 100E06 TU로 처리된 동물은 100E6 TU VPN38로 처리된 동물보다 더 높은 CD71 발현을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 현탁 로트의 20E06 TU로 처리된 동물과 비교하여 100E06 TU로 처리된 동물의 T 세포에서 더 높은 CD71 발현 경향이 있었다. 종합하면, 이러한 발견은 부착 입자와 현탁 입자가 모두 CD71의 상향조절에 의해 측정된 바와 같이 활성화를 촉진하고 상향조절이 투여량 의존적이라는 것을 시사한다. VPN68로 처리된 동물이 가장 높은 활성화(가장 높은 CD71% 발현)를 보여주었다(도 55).

[1111] 연구 동안 CAR T 세포 확장을 평가하기 위해 일련의 혈액을 매주 채혈했다. UB-VV100의 모든 제조물로 처리된 동물은 연구 14-42일 사이에 확장된 다음 나머지 생존 동물에서 42-49일에 걸쳐 축소되는 CAR T 세포를 생성한 것으로 발견되었다(도 56a). 142 페이로드(서열번호 121)를 갖는 20E06 TU 부착 물질로 처리된 동물은 14일 내지 28일 사이에 CART 세포 확장을 보여주었고, 이후 축소되었다. 부착 제조물 142(서열번호 121), VPN38 20E06 TU, VPN38 100E06 TU, VPN68 20E06 TU 및 VPN68 100E06 TU로 처리된 동물은 >150 CAR T 세포/μL 혈액의 최고 순환 CAR T 세포 농도를 발생시킨 반면, 부착 제조물 201로 처리된 동물은 <100 CAR T 세포 μL 혈액의 정점에 도달했다. 부착 제조물 둘 모두로 처리된 동물, 및 VPN68 및 VPN38의 100E06 TU로 처리된 동물은 연구 14일까지 쉽게 검출가능한 CAR T 세포를 가졌고; 대조적으로, VPN38 및 VPN68의 20E06 TU로 처리된 동물은 이 초기 시점에서 검출 가능한 CAR T 세포가 없었다. 요약하면, UB-VV100의 모든 제조물은 연구 3일차에 CD71의 상향조절을 촉진하고 연구 21일차에 검출 가능한 CAR T 세포를 생성했지만, 20E6 TU의 현탁 입자로 처리된 동물은 부착 제조물 또는 더 높은 용량으로 처리된 동물에 비해, CAR T 세포 검출의 1주 지연을 전시했다(도 56b).

[1112] IP 경로를 통한 d-루시페린 주사 후 생물발광 이미징에 의해 질환 진행을 모니터링했다. 생물발광 이미징은 연구 내내 주 2회 수행했다. 대조군의 마우스는 25일경 인도적 엔드포인트에 도달했고 질환 부하 및 체중 감소로 인해 안락사되어야 했다. 마우스의 약 40%에서는 눈 종양이 발생하여 조기에 안락사시켜야 했다. UB-VV100 VPN38 및 VPN68의 20E6으로 처리된 마우스는 비히클에 비해 수명을 연장하는 종양 부하를 제어했지만, 종양 감소는 관찰되지 않았다. 100E6 UB-VV100 VPN38 및 VPN68로 처리된 마우스는 20E6 UB-VV100으로 처리된 마우스에

비해 종양 감소를 증가시켰다. 가장 큰 종양 감소는 VPN68의 100E6으로 처리된 마우스에서 관찰되었다(도 57). 20E6 부착 로트의 UB-VV100(142(서열번호 121) 또는 201(서열번호 122) 페이로드)로 처리된 마우스는 20E6 TU의 현탁 로트로 처리된 마우스보다 더 큰 종양 감소를 가졌다(도 57).

[1113] 마우스가 인간적 엔드포인트에 도달했을 때, 비장 및 골수를 수집하고 유세포분석에 의한 종양 부하를 포함하는 분석을 위해 처리했다. 종양 부하를 평가하기 위해 NALM-6 세포(생, CD45-, GFP+)의 백분율을 측정했다. 비히클 대조군의 마우스는 비장에서 세포의 20% 이상 및 골수에서 80%에 가까운 NALM-6 세포를 갖는 것으로 관찰되었다. UB-VV100 처리 후 비장과 골수에서 종양은 크게 감소했다(도 58). 골수 및 비장에서 가장 큰 종양 감소는 VPN68의 100E6으로 처리된 마우스에서 관찰되었다(도 58).

[1114] **결론**

[1115] 증가된 생존은 대조군에 비해 UB-VV100으로 처리된 마우스에서 관찰되었다. 연구 기간 동안 동물의 40%에서 안와후 종양이 발생했으며, 이 중 다수는 말초 기관에 낮은 종양 부하 및 다른 안락사 기준의 부재에도 불구하고 담당 수의사의 권고 기준에 따라 안락사시켜야 했다. 100E6 TU UB-VV100 VPN68로 처리된 마우스는 케이지-플러딩(cage-flooding) 이벤트를 겪었고, 체중 감소로 인해 즉시 안락사되어야 했다.

[1116] 테스트된 UB-VV100의 모든 버전은 비히클 단독으로 처리된 마우스와 비교하여 생존을 연장하는 항-종양 활성을 나타내었지만, VPN68로 처리된 마우스가 가장 현저한 종양 제어를 보여주었다. 희생시 UB-VV100으로 처리된 마우스는 비히클 처리된 마우스와 비교하여 비장 및 골수에서 종양 감소를 나타냈다. 종합하면, 이러한 결과는 UB-VV100의 모든 제조물에 약간의 활성이 있음을 입증한다. 20E+06 TU의 부착 로트와 100E+06 TU의 현탁 로트의 처리에 의해 비-안와후 부위에서 가장 유의미한 종양 감소/제어가 관찰되었다.

[1117] UB-VV100 투여 후 T 세포의 활성화(활성화 마커 CD25 및 CD71 사용)를 조사하여 효능의 차이를 조사했다. 연구 3일째, 어떤 그룹에서도 CD25 발현의 차이는 발견되지 않았다. 그러나, UB-VV100으로 처리된 모든 마우스는 비히클 처리된 마우스에 비해 T 세포에서 CD71의 더 높은 발현 수준을 보여주었다. 구체적으로, 20E6 UB-VV100 용량에서 CD71의 더 높은 발현은 현탁 입자와 비교하여 부착 입자에 의해 처리된 마우스에서 관찰되었다. 이 발견은 20E+06 TU의 부착 벡터가 20E+06 TU의 현탁 벡터보다 더 활성화됨을 시사한다. VPN38 대 VPN68을 검사할 때, VPN68에 존재하는 αCD3 scFv 발현을 위한 작제물(서열번호 127)은 더 높은 용량 수준에서 CD71에 의해 측정되는 유의미하게 더 높은 수준의 활성화와 연관되어 있음이 관찰되었다. 또한, 20E6 현탁 입자와 비교하여 100E6 UB-VV100으로 처리된 마우스에서 더 높은 수준의 CD71이 발견되었고, 이는 CD71의 상향조절이 용량 의존적임을 시사한다.

[1118] UB-VV100의 모든 제조물은 연구 14-21일 사이에 확장되고 42-49일에 걸쳐 축소된 검출 가능한 CAR T 세포를 생성했다. 연구 3일차에 검출된 CD71의 낮은 발현과 일치하는 것으로, 20E+06 TU의 현탁 입자로 처리된 동물은 부착 제조물에 의해 처리된 동물과 비교할 때 CAR T 세포 검출의 1주 지연을 전시했고, 이는 연구 14일경에 검출 가능한 CAR T 세포를 생성했다.

[1119] 요약하면, 플라스미드 서열번호 121에서 플라스미드 서열번호 122로의 전환은 생체내 효능에 최소한의 영향을 미쳤고, 현탁 입자는 부착 입자보다 덜 강력하고 덜 활성적인 것으로 보이며, 이 차이는 용량을 증가시켜 극복할 수 있음을 발견했다. 또한, 서열번호 126 플라스미드에서 서열번호 127 플라스미드로의 전환은 3일차에 T 세포의 더 높은 활성화 및 100E+06 TU로 처리된 동물에서 우수한 종양 제거와 연관이 있었다. 100E+06 TU로의 용량 증량은 전신 Nalm-6 종양 모델에서 일관되고 예측 가능한 효능을 생성하는 데 필수적일 가능성이 있다.

[1120] 약어

AAV	아데노-연관 바이러스
AE	이상 사례
ALL	급성 림프모구성 백혈병
AUC	곡선 아래 면적
B-LBL	B-계통 림프모구성 림프종
BCS	비만 평가 점수
BH	벌크 수확물
CAR	키메라 항원 수용체
CD19	분화 클러스터 19, B-림프구 항원
CD3	분화 클러스터 3
CDMO	수탁 개발 제조 기관
CLL	만성 림프구성 백혈병
CMC	화학 제조 관리
ddPCR	디지털 액적 중합효소 연쇄 반응
DLT	용량 제한 독성
DNA	데옥시리보핵산
DP	의약품
DS	원료 의약품
DSC	질환-특이적 코호트
DSMB	데이터 안전성 모니터링 위원회
ELISA	효소면역측정법
FL	여포성 림프종
FRB	FKBP-라파마이신 결합 (도메인)
GLP	우수 실험실 관리 기준
GMP	우수 의약품 제조 관리 기준
IFNγ	인터페론 감마
IL-15	인터루킨 15
IL-2	인터루킨 2

[1121]

IN	결절내
IP	복강내
ISH	동일계내 혼성화
LAL	대서양 투구게 혈액 세포 용해물
LDLR	저밀도 지단백 수용체
LEDGF	수정체 상피-유래 성장 인자
LVV	렌티바이러스 벡터
MCL	외투세포 림프종
MEK	미토겐-활성화 단백질 키나아제
MOI	감염 다중도
mTOR	라파마이신의 포유동물 표적
NHL	비-호지킨 림프종
NSG	비-비만-당뇨병 SCID 감마 마우스
PBMC	말초 혈액 단핵 세포
PCR	중합효소 연쇄 반응
PD	약력학
PK	약동학
POC	개념 증명
RACR	라파마이신 활성화 사이토카인 수용체
RAF	급가속 섬유육종
RAS	래트 육종 바이러스 종양유전자
RCL	복제가능 렌티바이러스
RNA	리보핵산
SAE	심각한 이상 사례
SC	피하
scFv	단일 사슬 가변 단편
SEM	평균의 표준 오차
SIN	자가 활성화

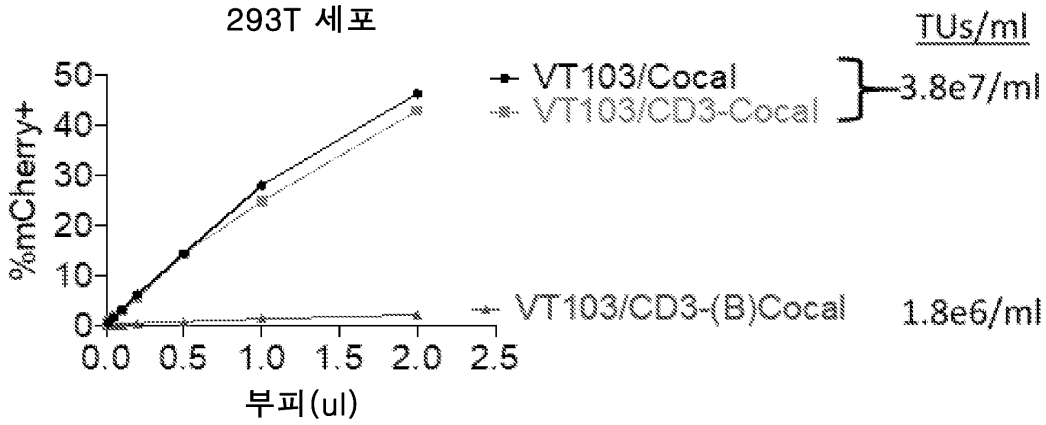
[1122]

SMC	안전성 모니터링 위원회
STDEV	표준 편차
TCR	T 세포 수용체
TNFα	종양 괴사 인자 알파
TU	형질도입 단위
VCN	벡터 카피수
WPRE	우드척(간염 바이러스) 전사후 조절 요소

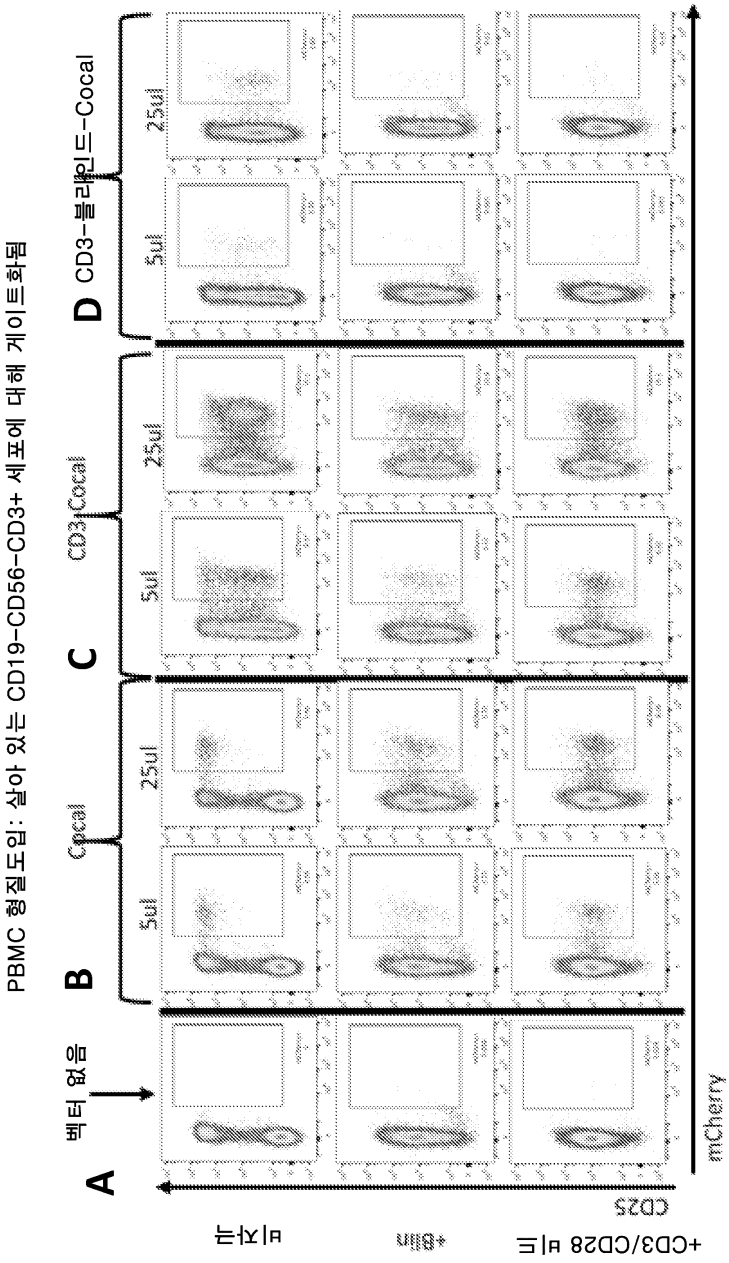
[1123]

도면

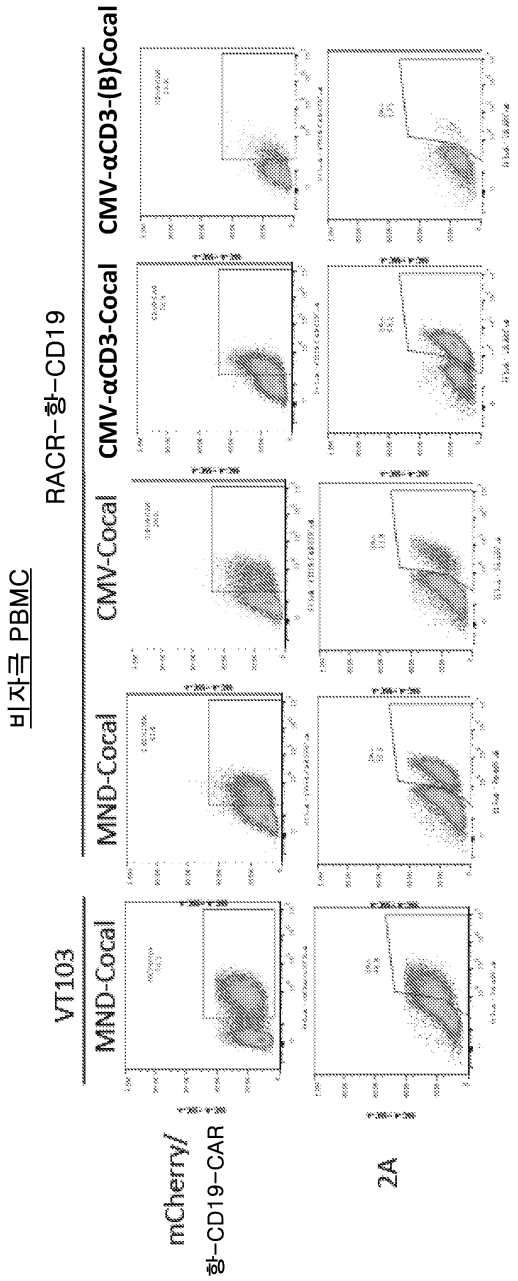
도면1


293T 세포
TUs/ml
VT103/Cocal
VT103/CD3-Cocal
3.8e7/ml
VT103/CD3-(B)Cocal
1.8e6/ml
%mCherry+
50
40
30
20
10
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
부피(ul)

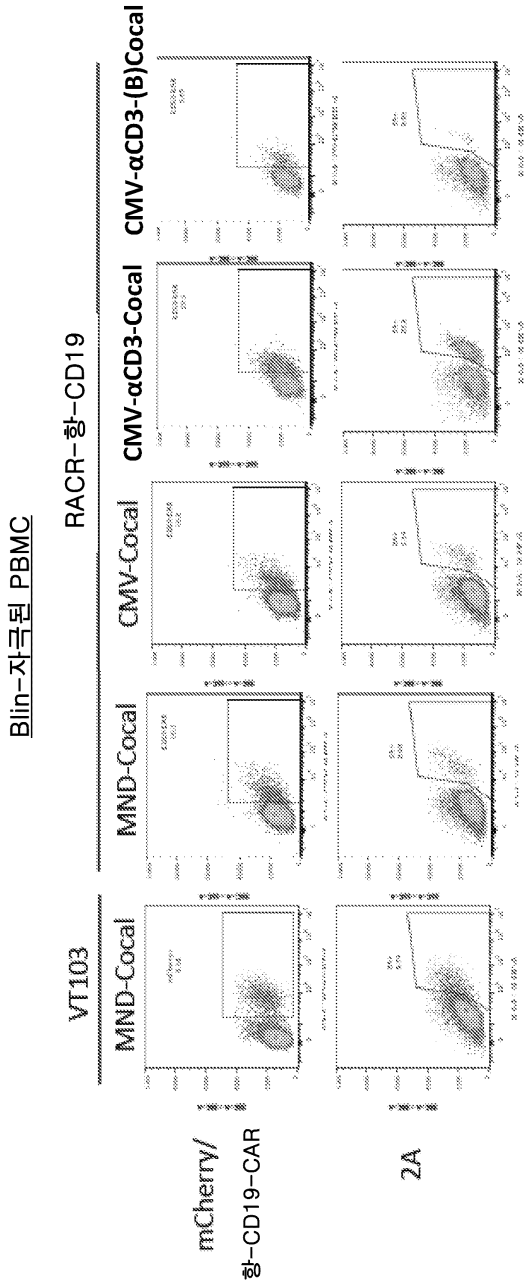
도면2


PBMC 형질도입: 살아 있는 CD19-CD56-CD3+ 세포에 대해 게이트화됨
A
B
C
D
벡터 없음
Cocal
CD3+Cocal
CD3-블라인드-Cocal
5ul
25ul
비자극
+Blin
+CD3/CD28 비드
CD25
mCherry

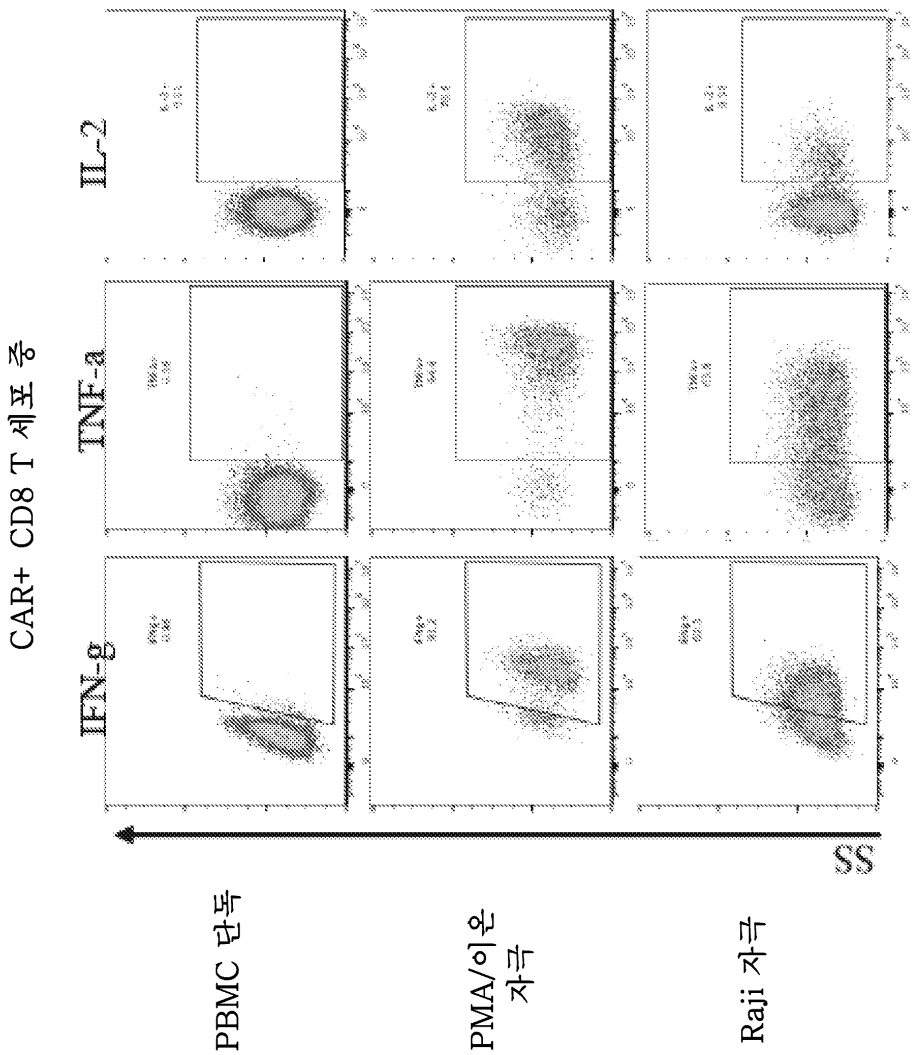
도면3


비자극 PBMC
VT103
RACR-항-CD19
MND-Cocal
MND-Cocal
CMV-Cocal
CMV-αCD3-Cocal
CMV-αCD3-(B)Cocal
mCherry/
항-CD19-CAR
2A

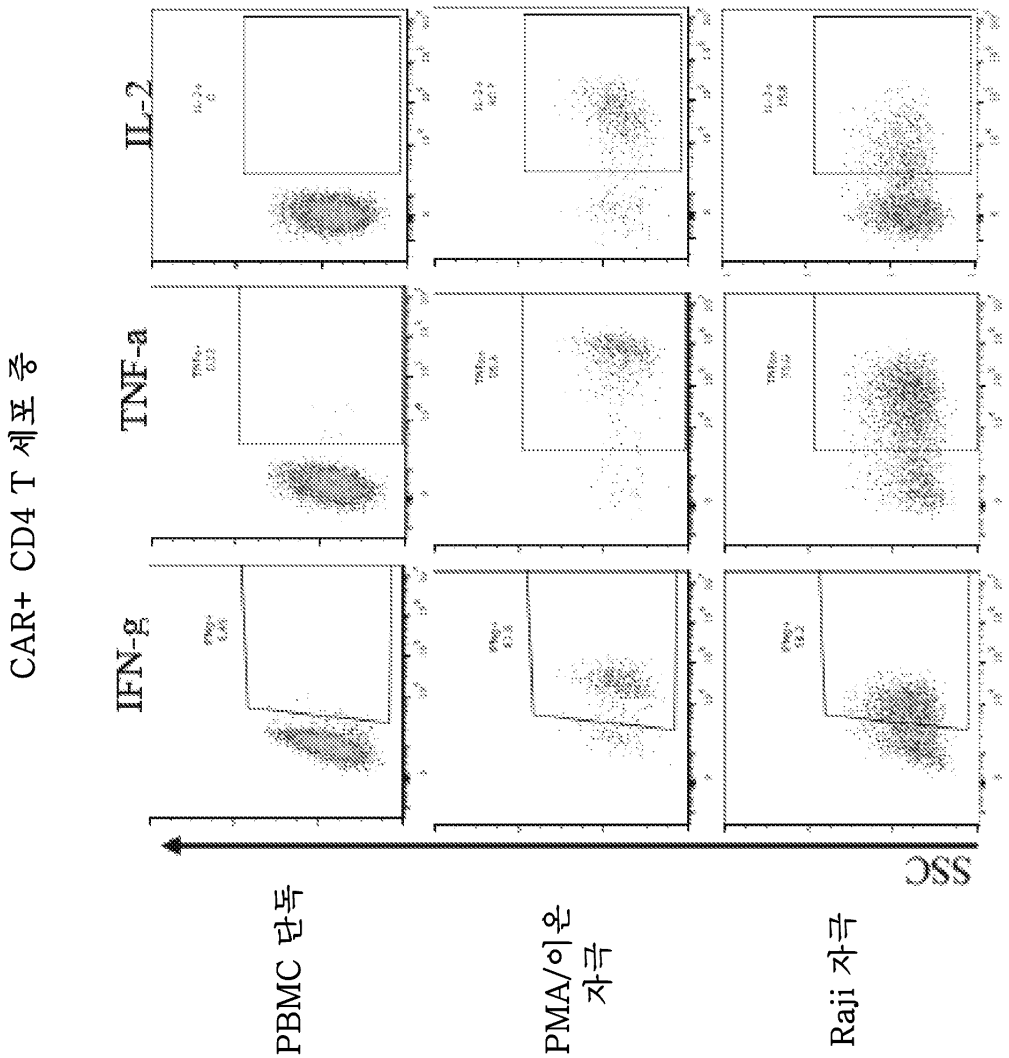
도면4


Blin-자극된 PBMC
VT103
RACR-항-CD19
MND-Cocal
MND-Cocal
CMV-Cocal
CMV-αCD3-Cocal
CMV-αCD3-(B)Cocal
mCherry/
항-CD19-CAR
2A

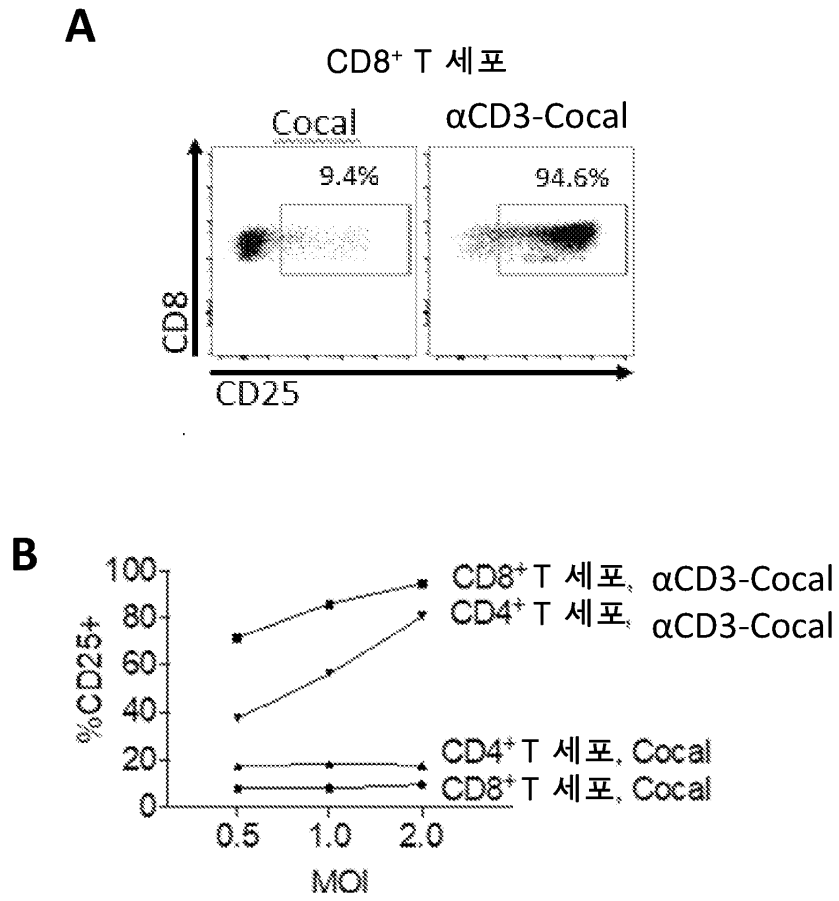
도면5



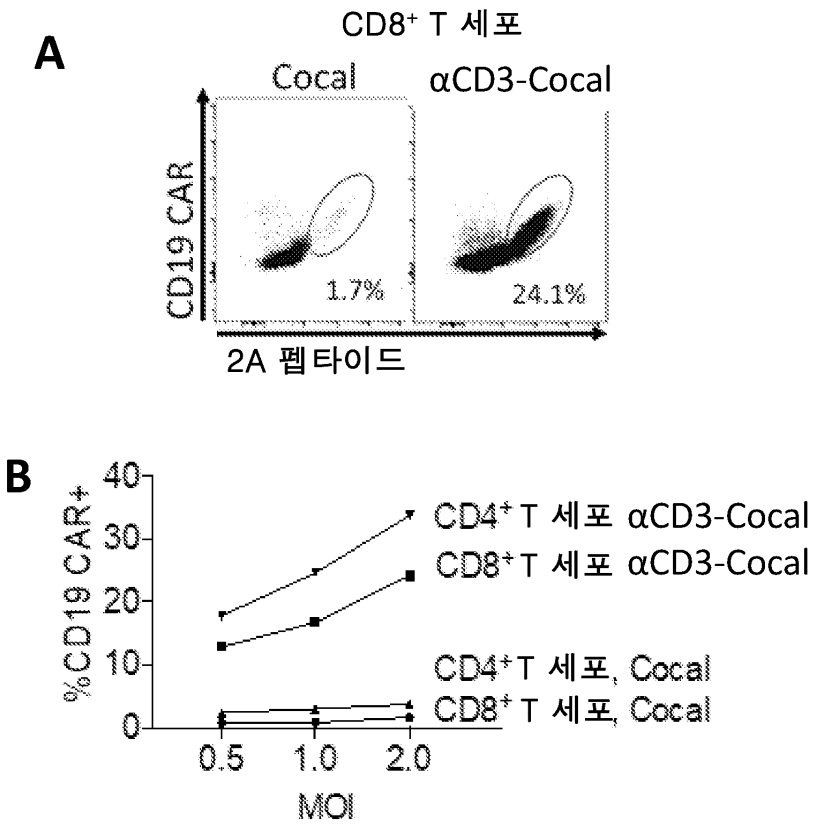
도면6



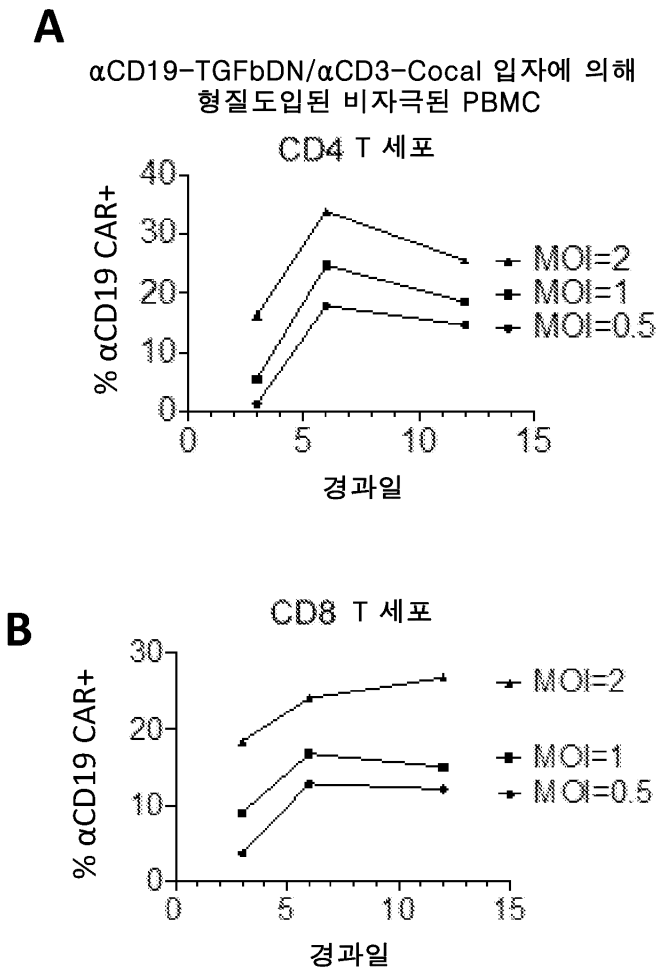
도면7


A
CD8+ T 세포
Cocal
αCD3-Cocal
9.4%
94.6%
CD8
CD25
B
%CD25+
100
80
60
40
20
0
0.5
1.0
2.0
MOI
CD8+ T 세포, αCD3-Cocal
CD4+ T 세포, αCD3-Cocal
CD4+ T 세포, Cocal
CD8+ T 세포, Cocal

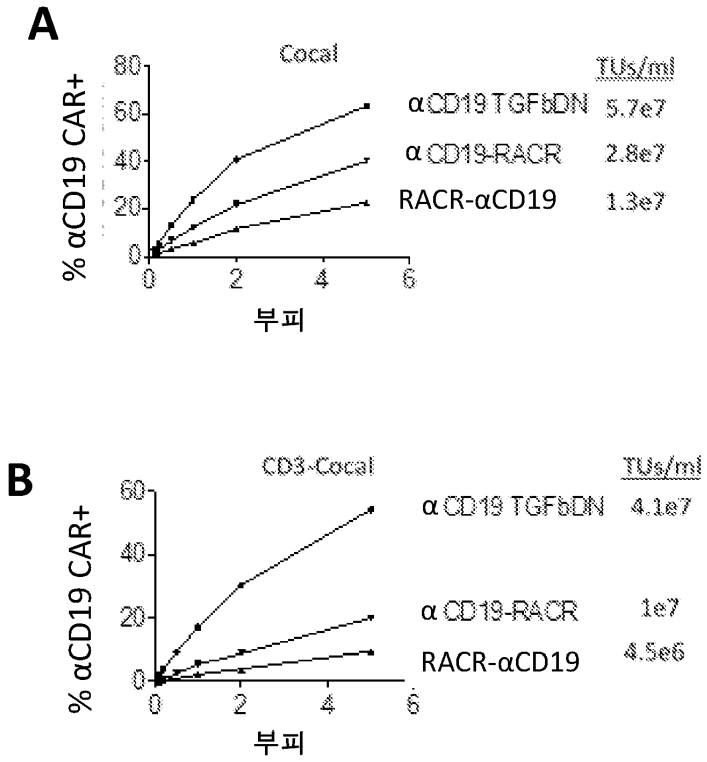
도면8


A
CD8+ T 세포
Cocal
αCD3-Cocal
CD19 CAR
1.7%
24.1%
2A 펩타이드
B
%CD19 CAR+
40
30
20
10
0
0.5
1.0
2.0
MOI
CD4+ T 세포 αCD3-Cocal
CD8+ T 세포 αCD3-Cocal
CD4+ T 세포, Cocal
CD8+ T 세포, Cocal

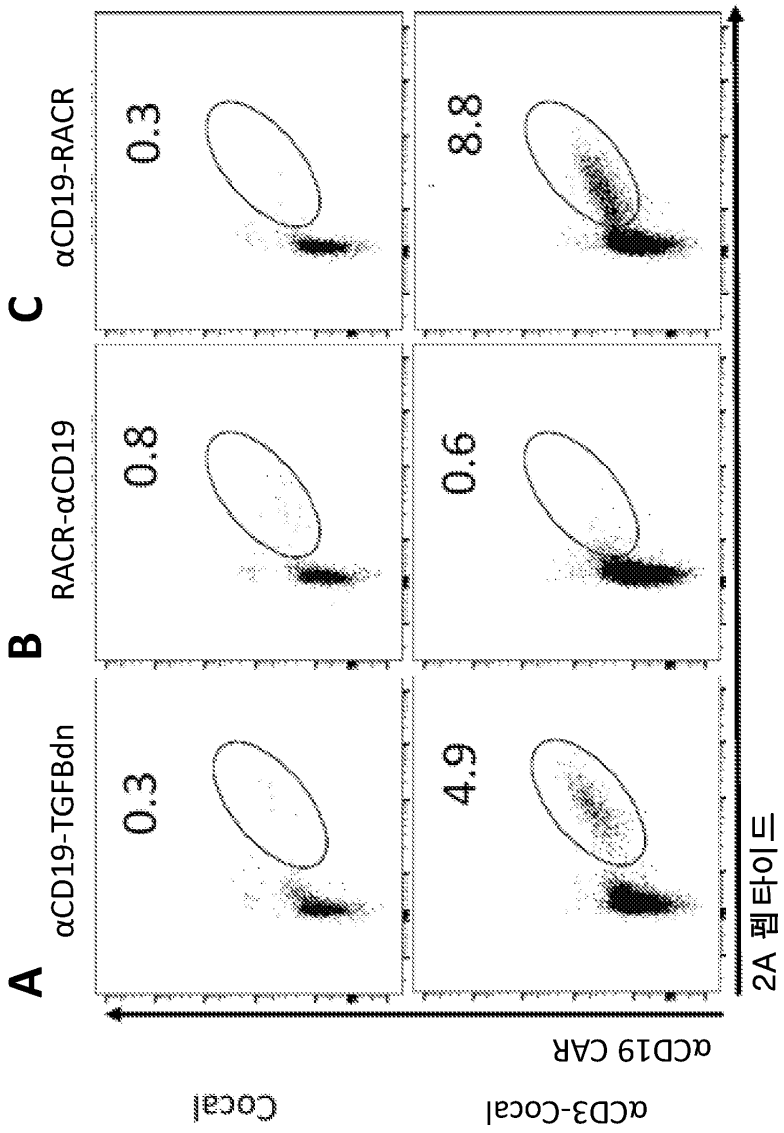
도면9


A
αCD19-TGFbDN/αCD3-Cocal 입자에 의해
형질도입된 비자극된 PBMC
CD4 T 세포
% αCD19 CAR+
40
30
20
10
0
0
5
10
15
경과일
MOI=2
MOI=1
MOI=0.5
B
CD8 T 세포
% αCD19 CAR+
30
20
10
0
0
5
10
15
경과일
MOI=2
MOI=1
MOI=0.5

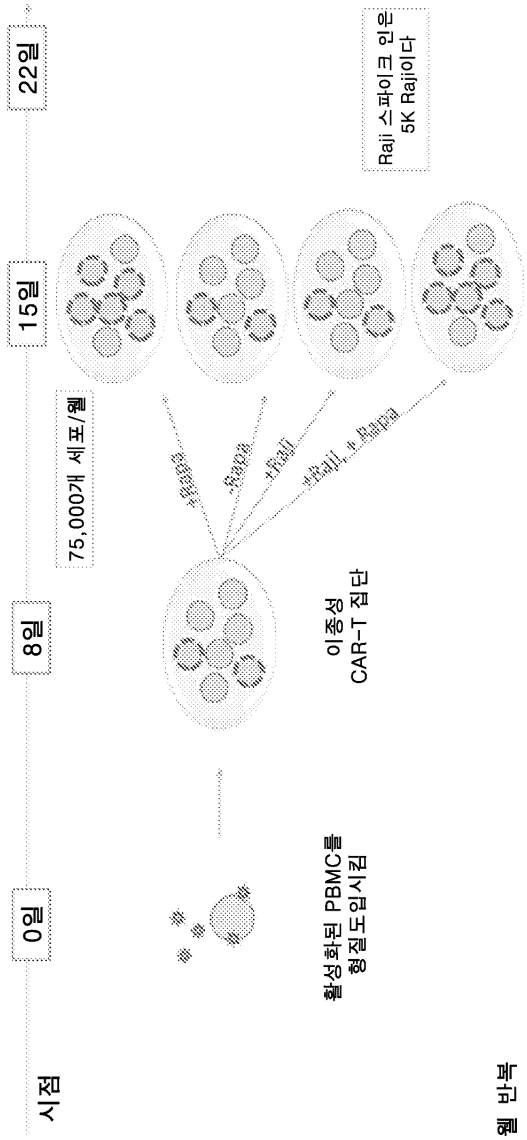
도면10


A
Cocal
TUs/ml
αCD19 TGFbDN 5.7e7
α CD19-RACR 2.8e7
RACR-αCD19 1.3e7
% αCD19 CAR+
80
60
40
20
0
0
2
4
6
부피
B
CD3-Cocal
TUs/ml
α CD19 TGFbDN 4.1e7
α CD19-RACR 1e7
RACR-αCD19 4.5e6
% αCD19 CAR+
60
40
20
0
0
2
4
6
부피

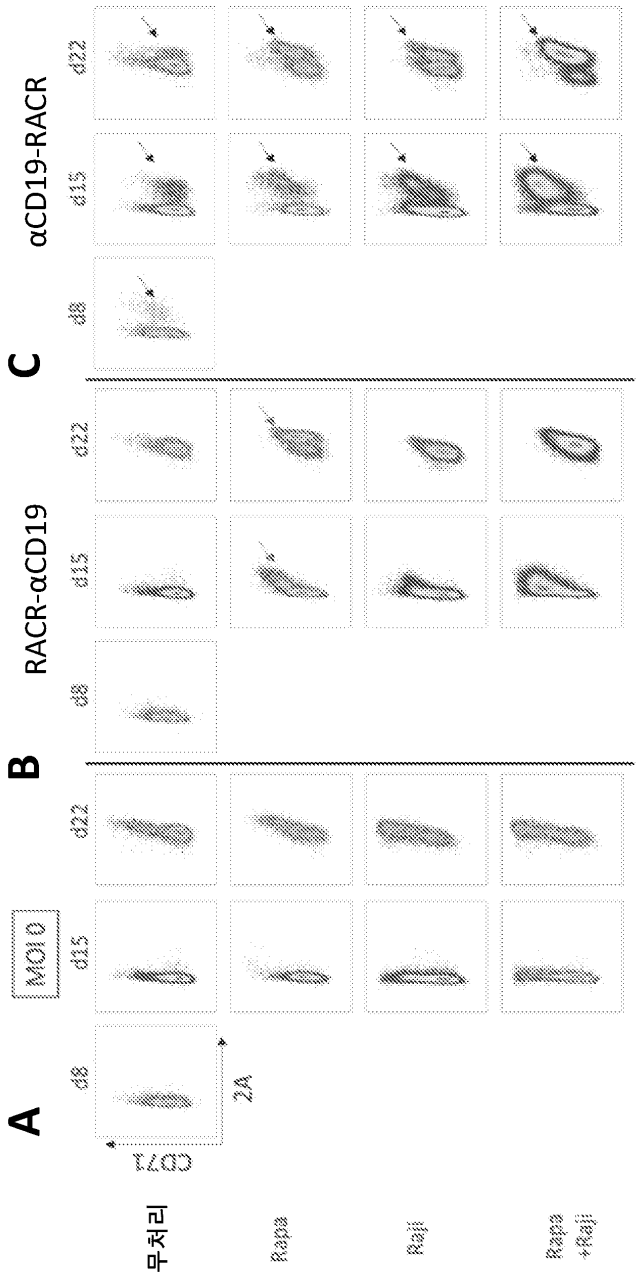
도면11


A
αCD19-TGFBdn
B
RACR-αCD19
C
αCD19-RACR
0.3
0.8
0.3
4.9
0.6
8.8
αCD3-Cocal
αCD19 CAR
Cocal
2A 펩타이드

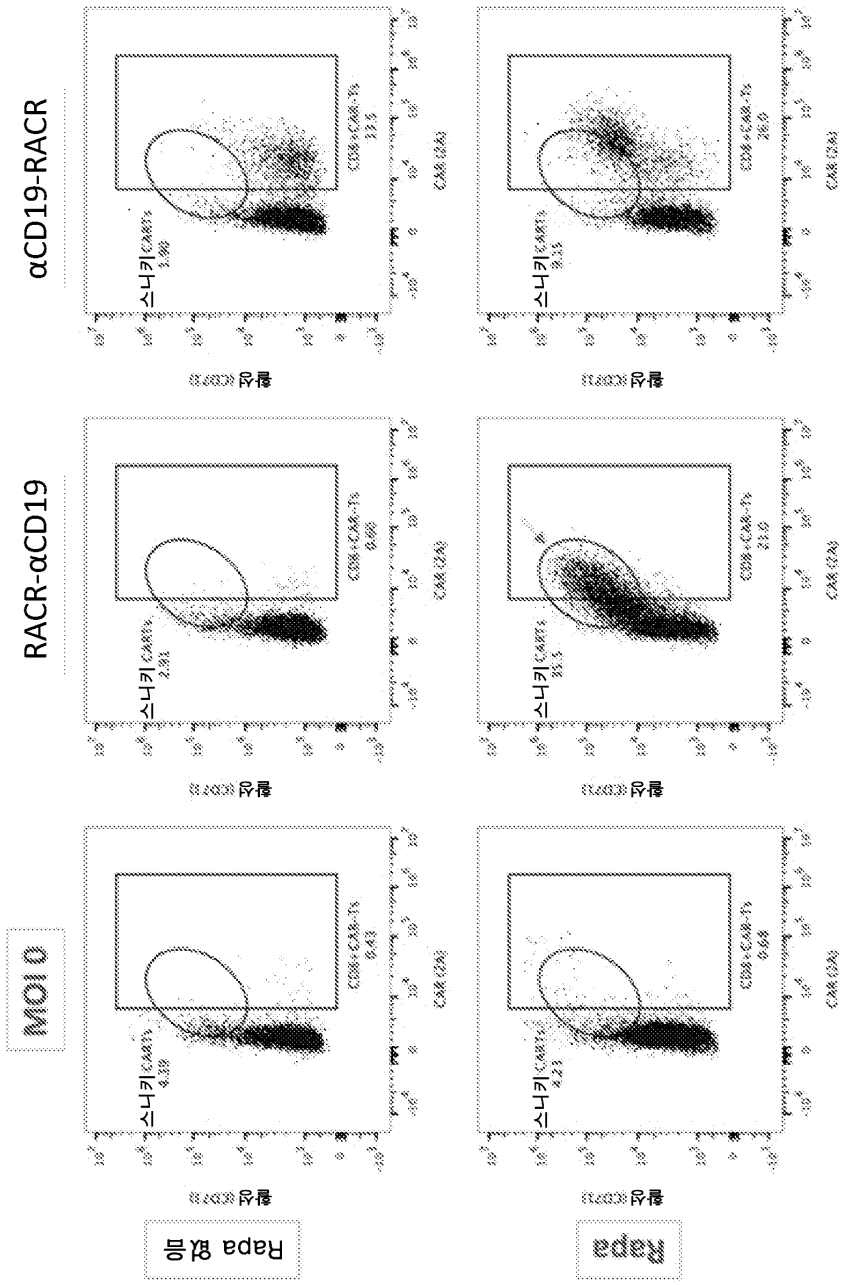
도면12


시점
0일
8일
15일
22일
활성화된 PBMC를
형질도입시킴
이중성
CAR-T 집단
75,000개 세포/웰
Raji 스파이크 인은
5K Raji이다
혈 반복

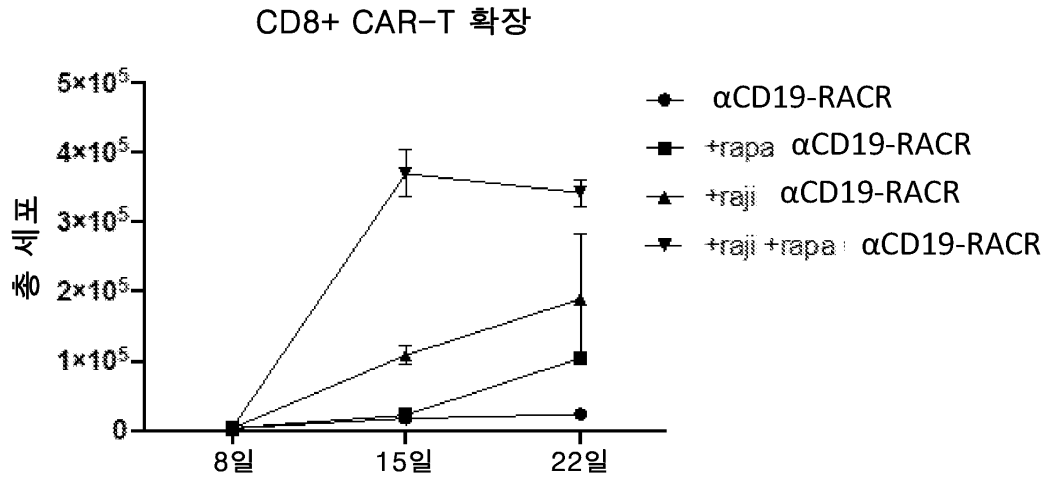
도면13


A
B
C
MOI 0
RACR-αCD19
αCD19-RACR
d8
d15
d22
1ZD
2A
무처리
Rapa
Raji
Rapa +Raji

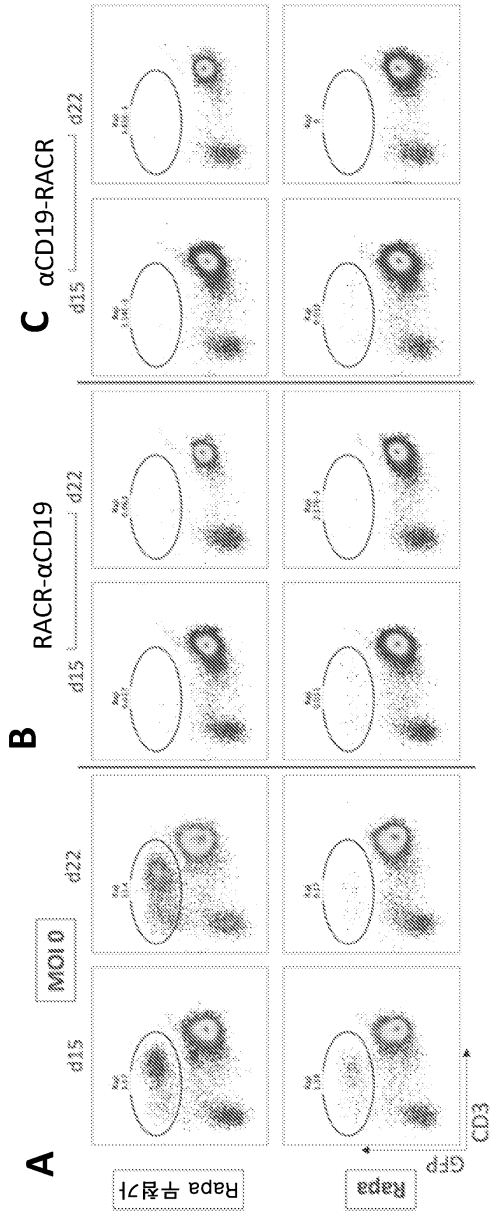
도면14



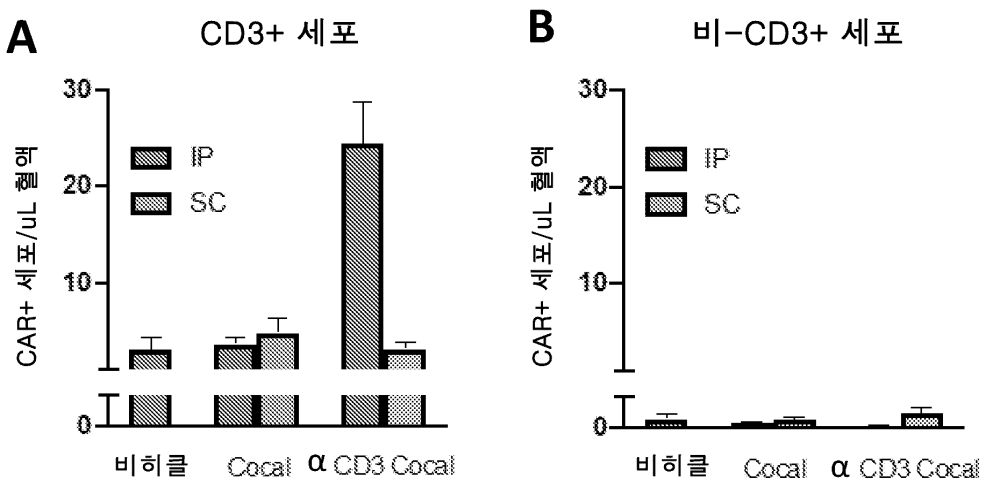
도면15


CD8+ CAR-T 확장
총 세포
5×10^5
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
8일
15일
22일
αCD19-RACR
+rapa αCD19-RACR
+raji αCD19-RACR
+raji +rapa αCD19-RACR

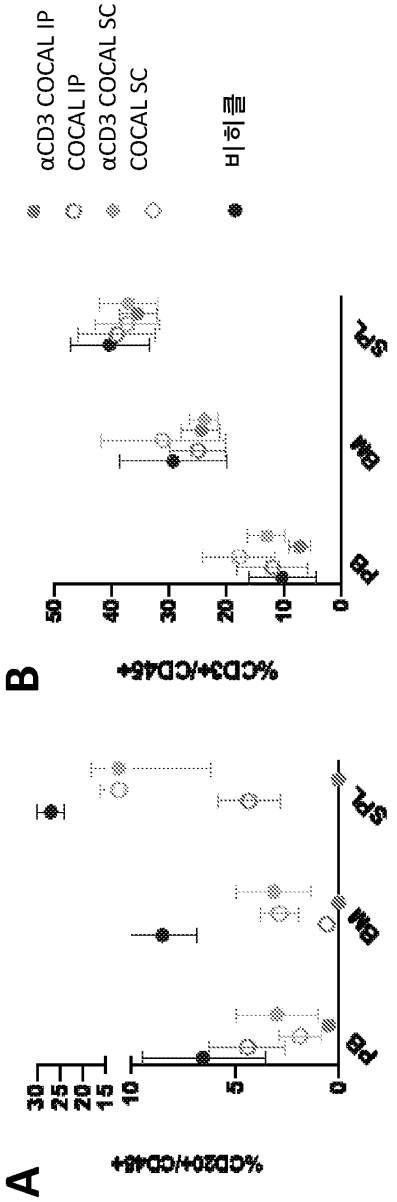
도면16


A
B
C
MOI 0
d15
d22
RACR-αCD19
αCD19-RACR
CD3
GFP
Rapa 무첨가
Rapa

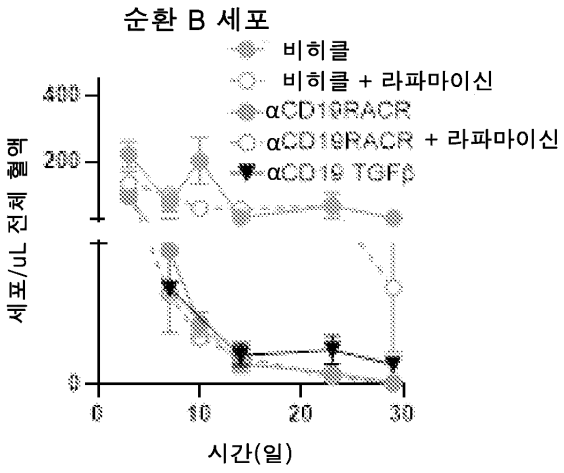
도면17


A
CD3+ 세포
CAR+ 세포/uL 혈액
30
20
10
0
IP
SC
비히클
Cocal
α CD3 Cocal
B
비-CD3+ 세포
CAR+ 세포/uL 혈액
30
20
10
0
IP
SC
비히클
Cocal
α CD3 Cocal

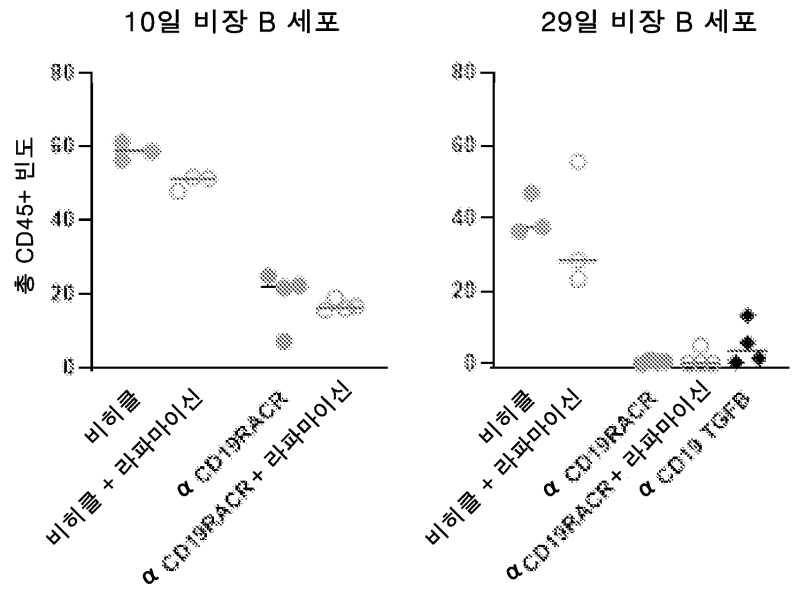
도면18


αCD3 COCAL IP
COCAL IP
αCD3 COCAL SC
COCAL SC
비히클
B
%CD3+/CD45+
SPL
BM
PB
50
40
30
20
10
0
A
%CD20+/CD45+
30
25
20
15
10
5
0

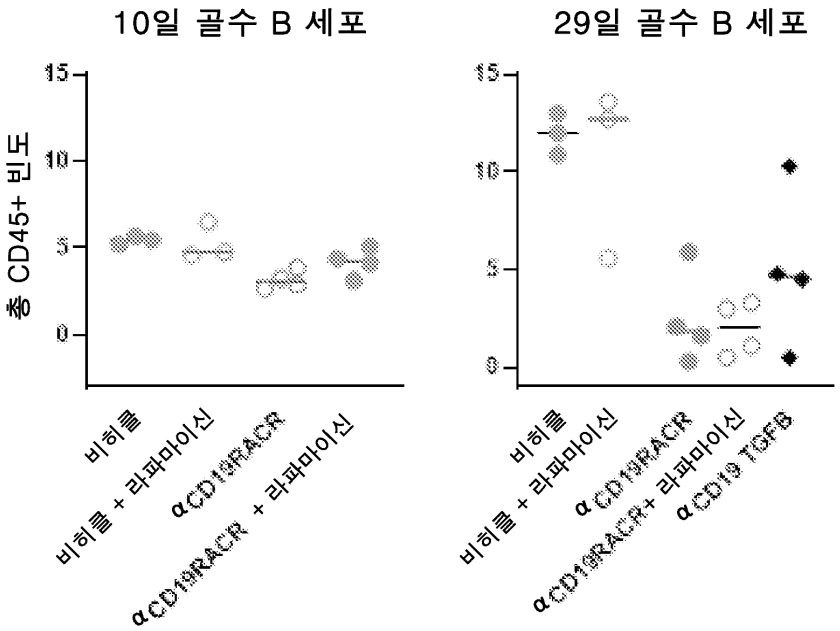
도면19a


순환 B 세포
비히클
비히클 + 라파마이신
αCD19RACR
αCD19RACR + 라파마이신
αCD19 TGFβ
세포/uL 전체 혈액
400
200
0
0
10
20
30
시간(일)

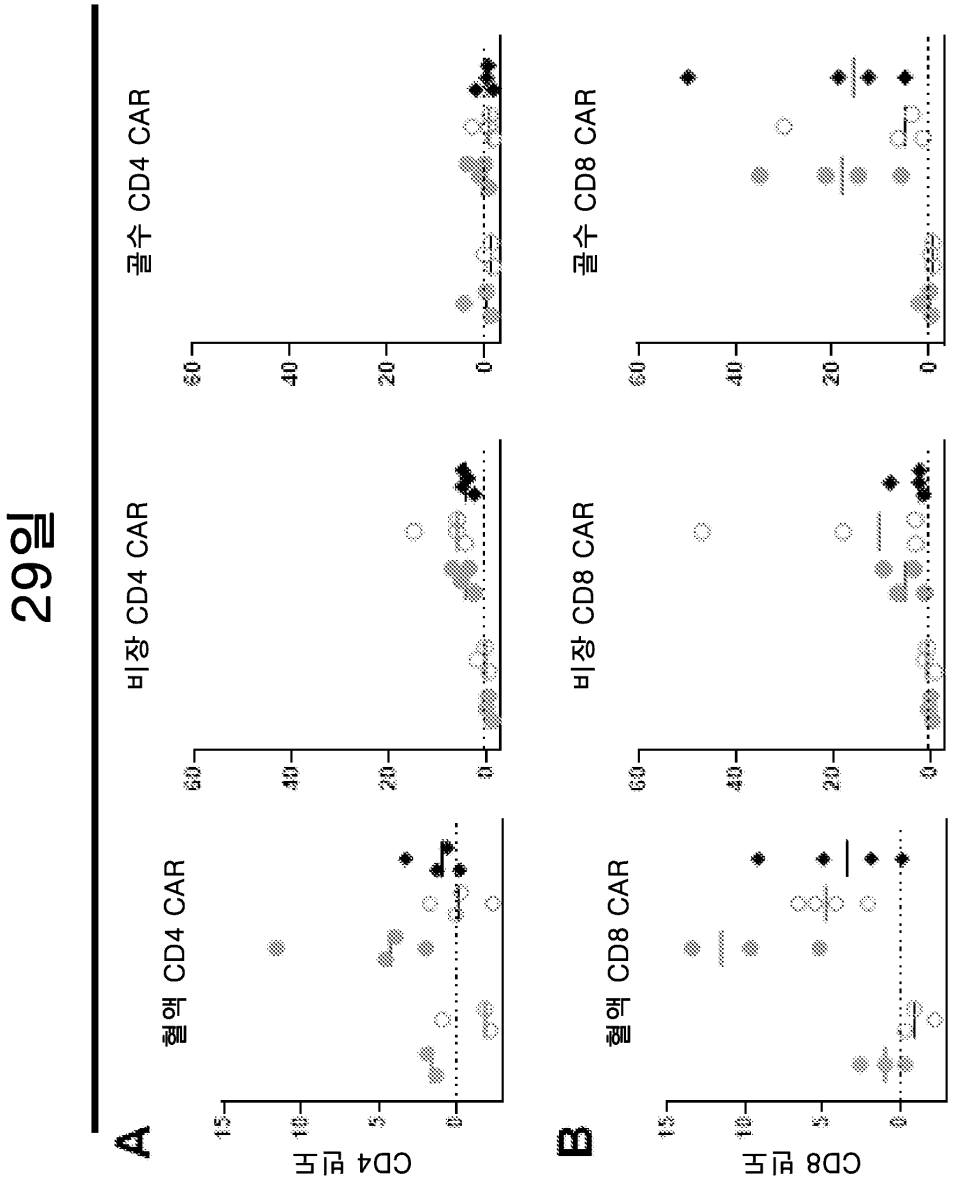
도면19b


10일 비장 B 세포
29일 비장 B 세포
총 CD45+ 빈도
80
60
40
20
0
비히클
비히클 + 라파마이신
α CD19RACR
α CD19RACR+ 라파마이신
α CD19 TGFB

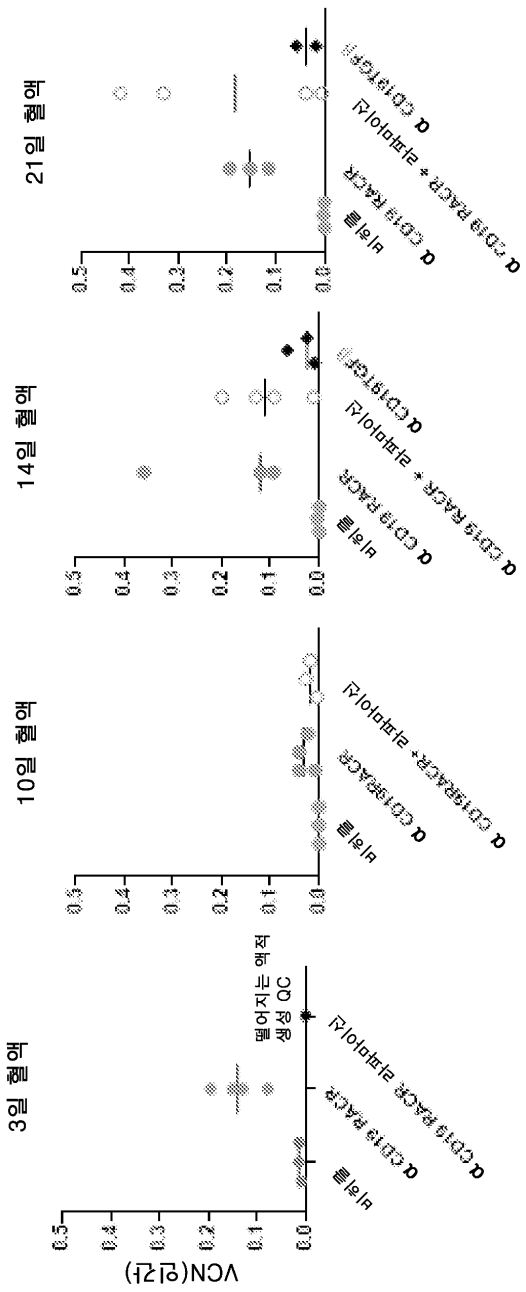
도면19c


10일 골수 B 세포
29일 골수 B 세포
총 CD45+ 빈도
15
10
5
0
비히클
비히클 + 라파마이신
αCD19RACR
αCD19RACR + 라파마이신
α CD19 TGFB

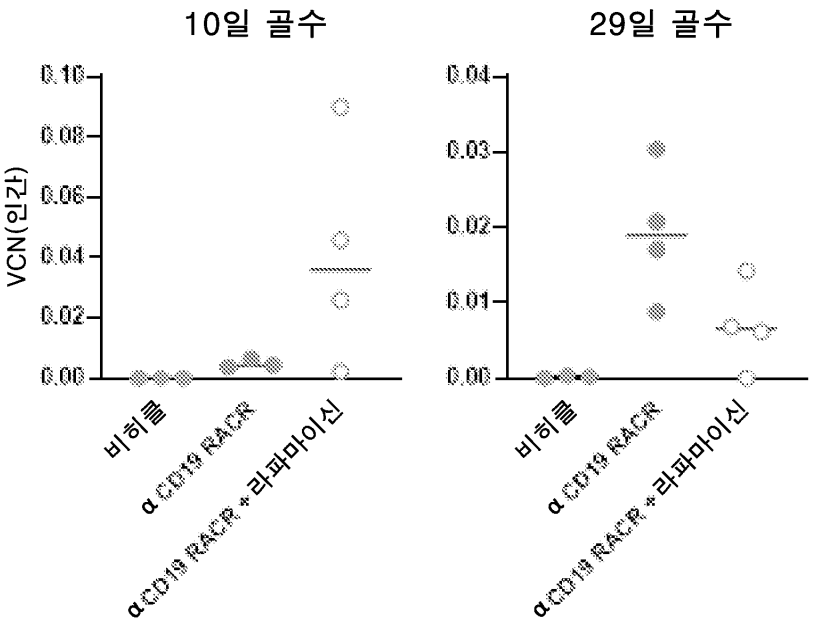
도면20


29일
A
혈액 CD4 CAR
비장 CD4 CAR
골수 CD4 CAR
CD4 벡터
B
혈액 CD8 CAR
비장 CD8 CAR
골수 CD8 CAR
CD8 벡터

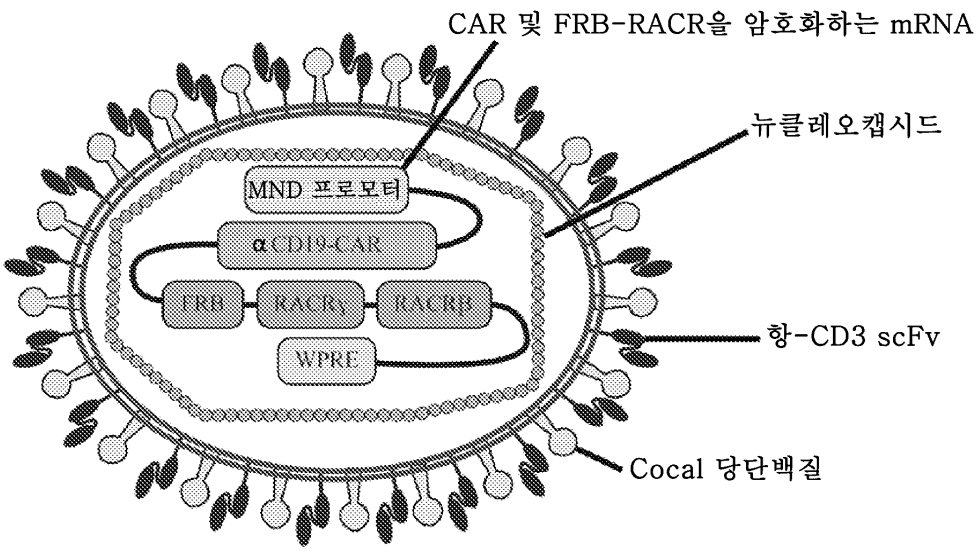
도면21a


3일 혈액
10일 혈액
14일 혈액
21일 혈액
VCN(원값)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
떨어지는 액적
생성 QC
비히클
CD19 PACR
CD19 PACR + 리세이식
CD19 RACR
CD19 RACR + 리세이식
CD19 PACR + 리세이식

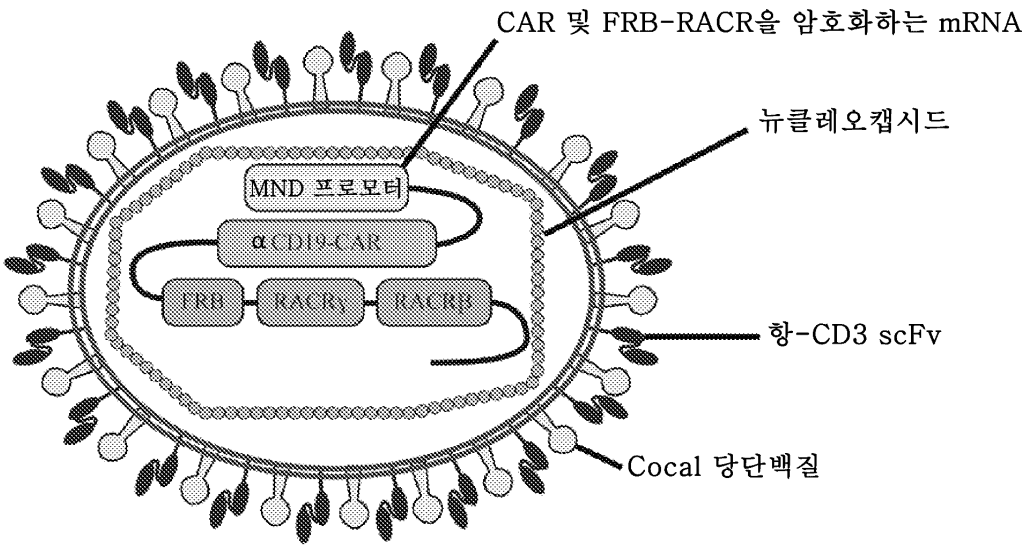
도면21b


10일 골수
29일 골수
VCN(인간)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
비히클
αCD19 RACR
αCD19 RACR + 라파마이신

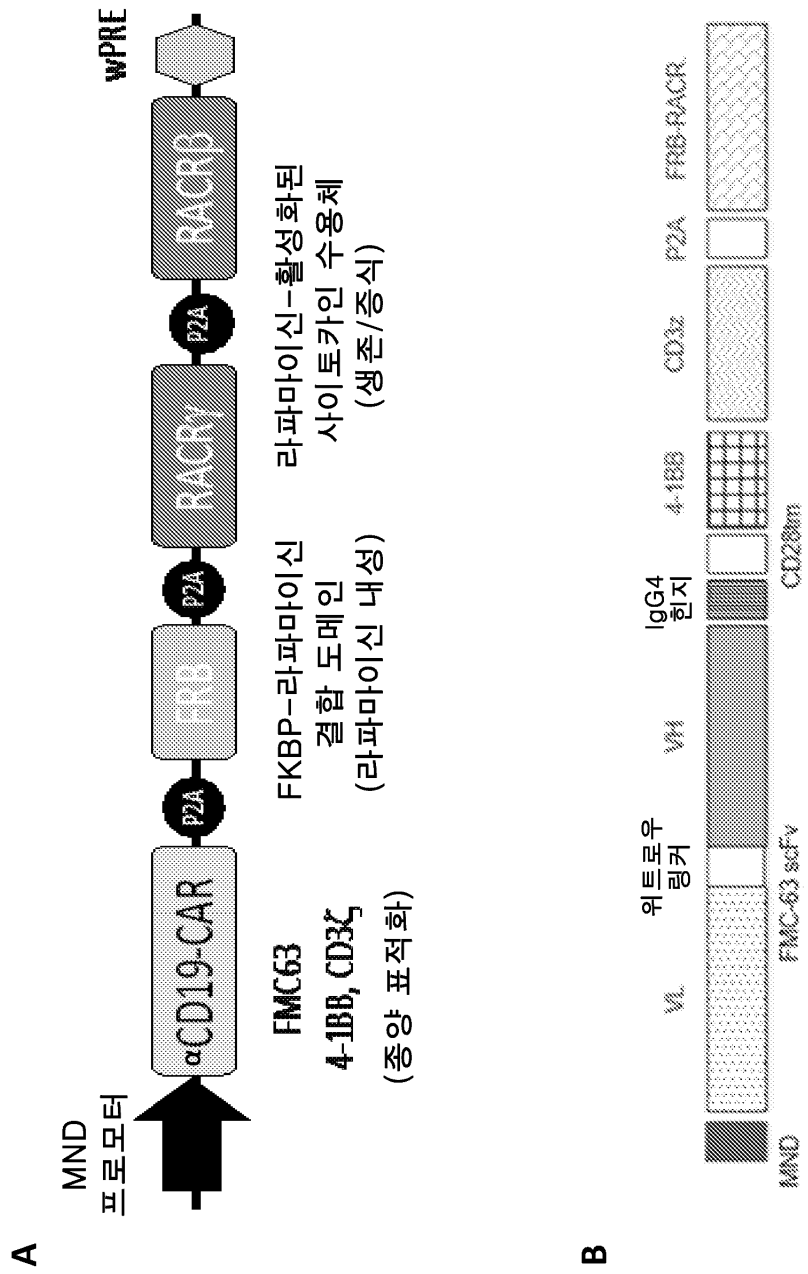
도면22a


CAR 및 FRB-RACR을 암호화하는 mRNA
뉴클레오캡시드
MND 프로모터
αCD19-CAR
FRB
RACRγ
RACRβ
WPRE
항-CD3 scFv
Cocal 당단백질

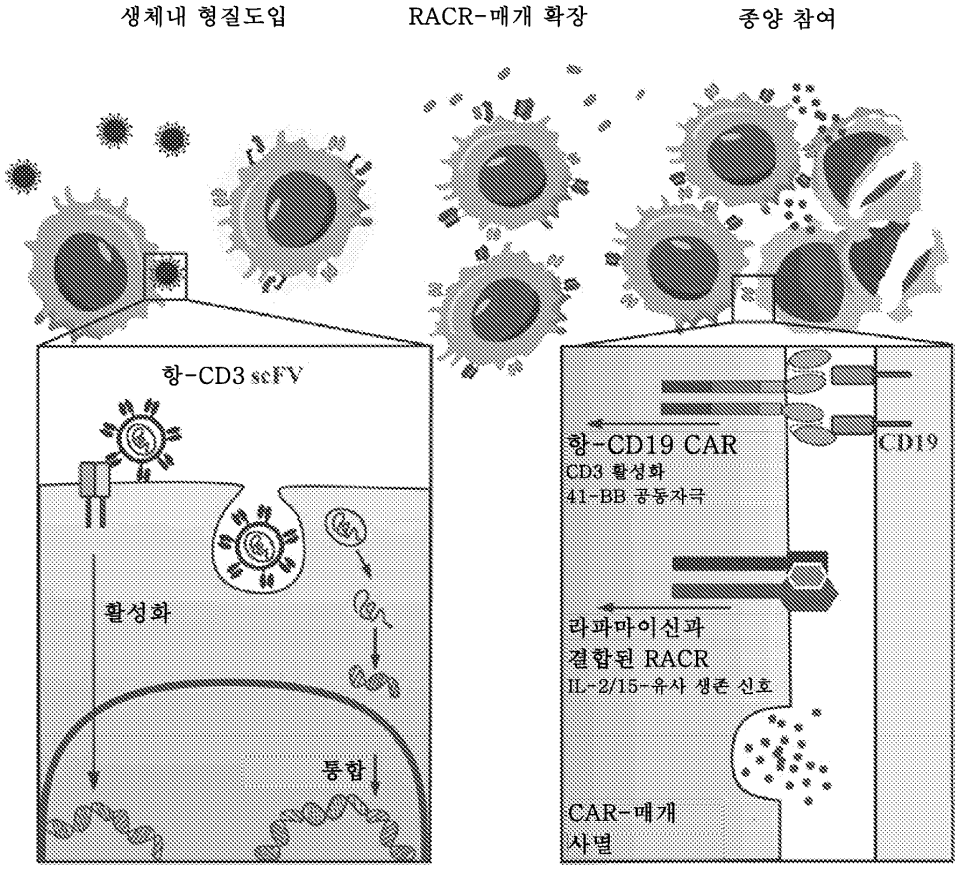
도면22b


CAR 및 FRB-RACR을 암호화하는 mRNA
뉴클레오캡시드
MND 프로모터
αCD19-CAR
FRB
RACRα
RACRβ
항-CD3 scFv
Cocal 당단백질

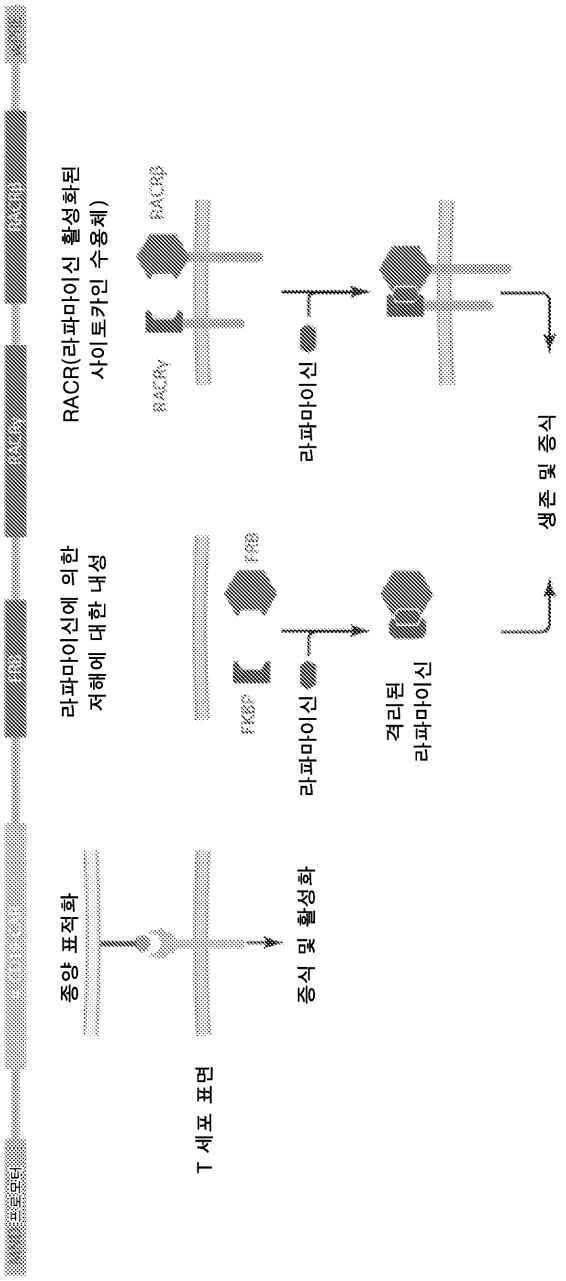
도면23


A
MND
프로모터
αCD19-CAR
P2A
FRB
P2A
RACR
P2A
RACRP
wPRE
FMC63
4-1BB, CD3ζ
(종양 표적화)
FKBP-라파마이신
결합 도메인
(라파마이신 내성)
라파마이신-활성화된
사이토카인 수용체
(생존/증식)
B
MND
VL
위트로우
링커
VH
IgG4
힌지
4-1BB
CD3ζ
P2A
FRB-RACR
FMC-63 scFv
CD28tm

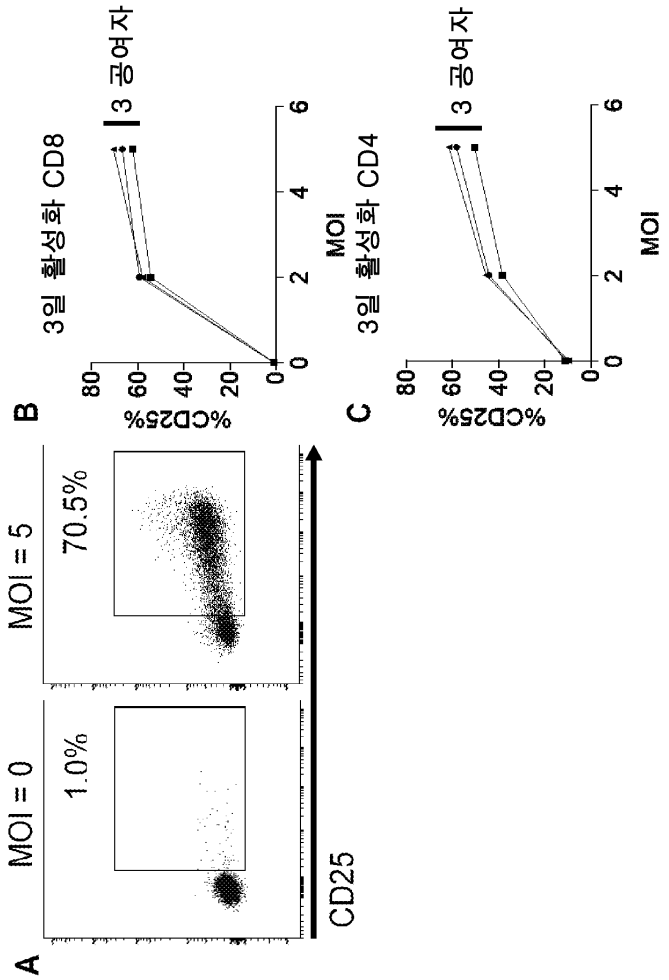
도면24


생체내 형질도입
RACR-매개 확장
종양 참여
항-CD3 scFV
활성화
통합
항-CD19 CAR
CD3 활성화
41-BB 공동자극
CD19
라파마이신과
결합된 RACR
IL-2/15-유사 생존 신호
CAR-매개
사멸

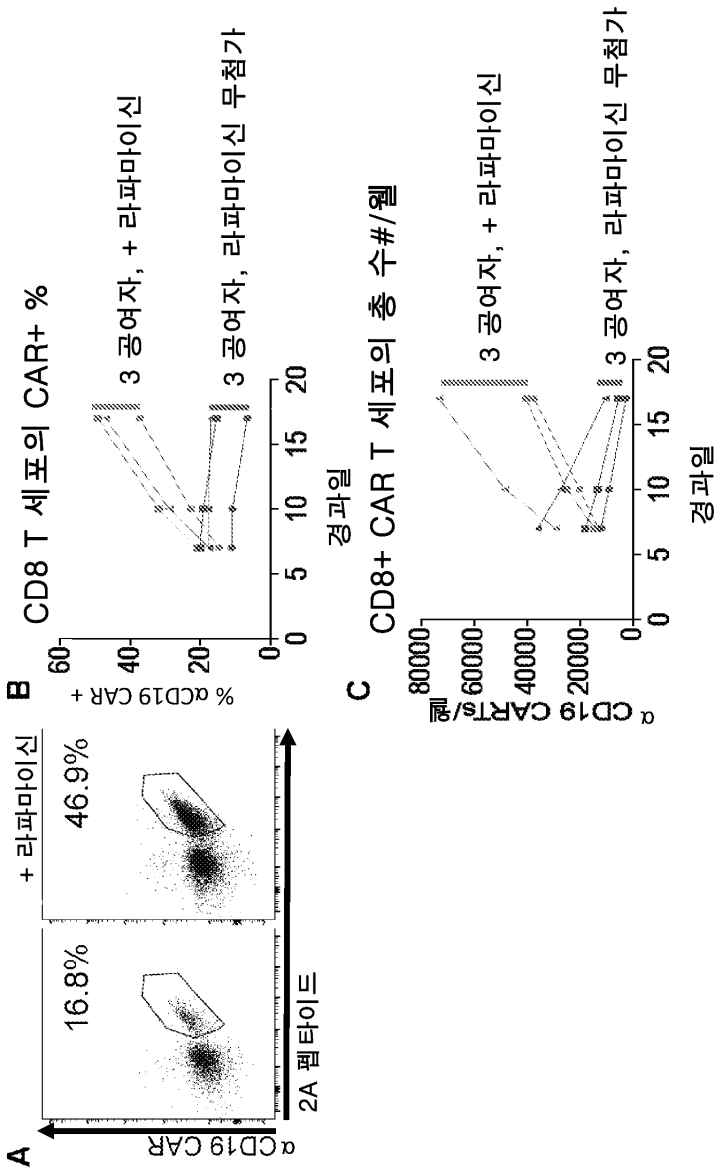
도면25


종양 표적화
T 세포 표면
증식 및 활성화
라파마이신에 의한
저해에 대한 내성
FKBP
FRB
라파마이신
격리된
라파마이신
RACR(라파마이신 활성화된
사이토카인 수용체)
RACRγ
RACRβ
라파마이신
생존 및 증식

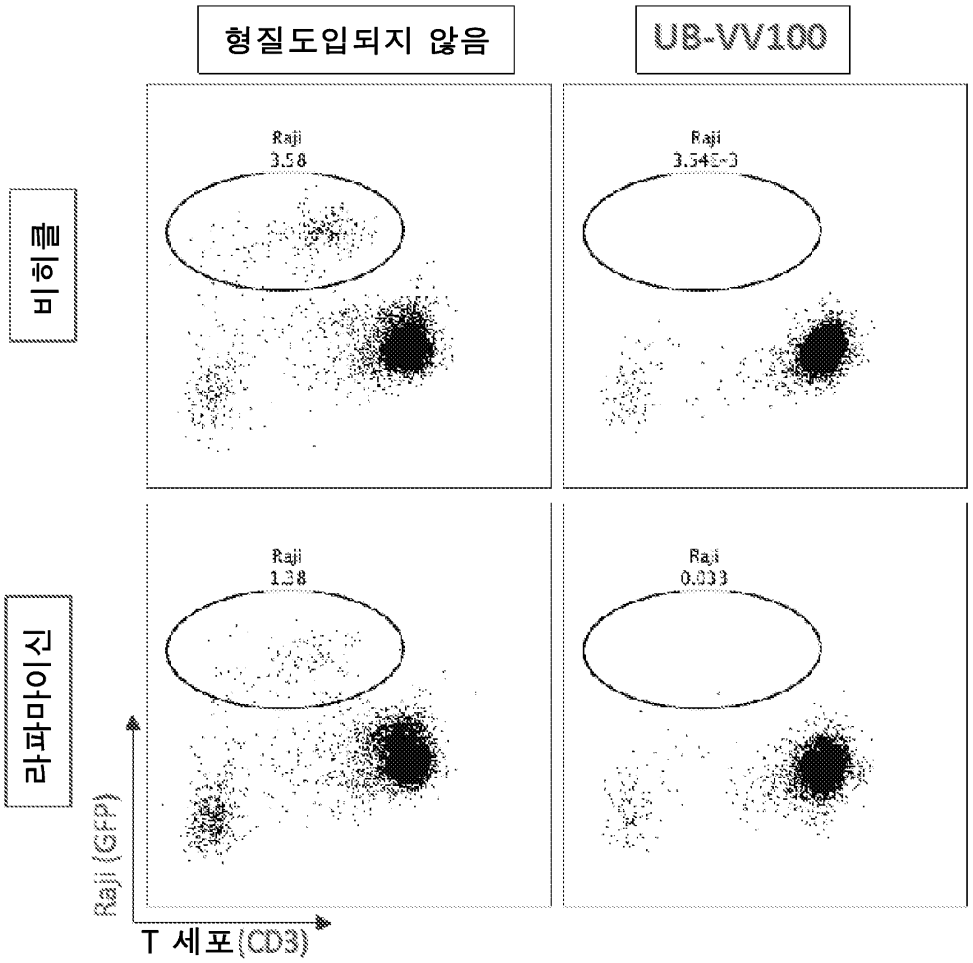
도면26


A
MOI = 0
1.0%
MOI = 5
70.5%
CD25
B
3일 활성화 CD8
%CD25%
MOI
3 공여자
C
3일 활성화 CD4
%CD25%
MOI
3 공여자

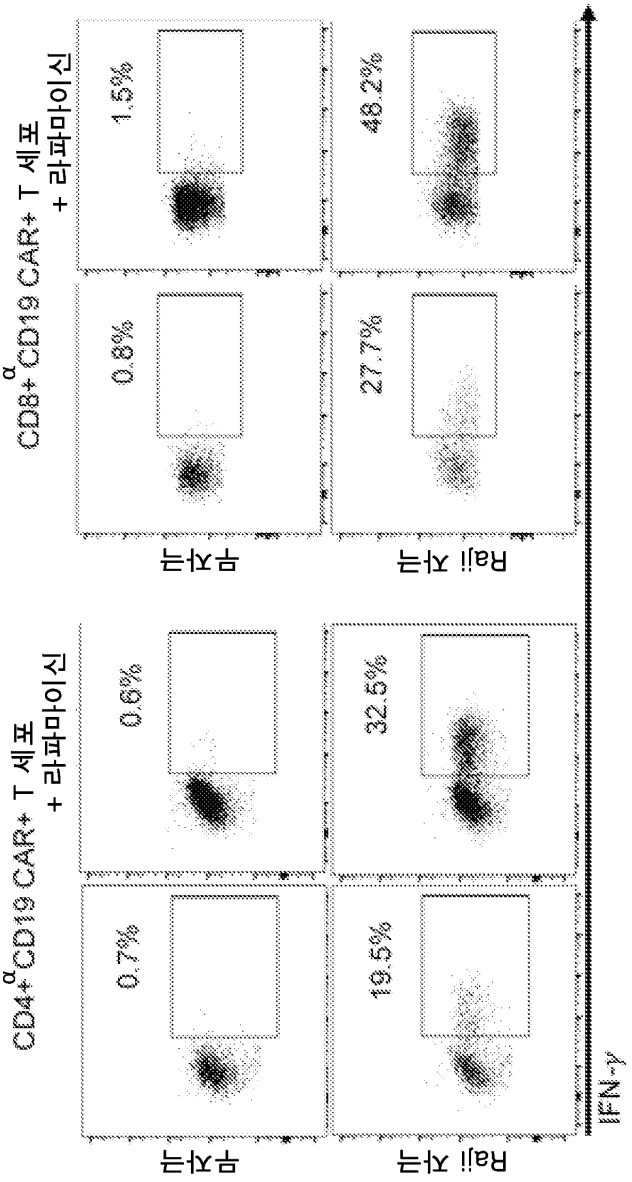
도면27


A
+ 라파마이신
16.8%
46.9%
α CD19 CAR
2A 펩타이드
B
CD8 T 세포의 CAR+ %
% αCD19 CAR +
3 공여자, + 라파마이신
3 공여자, 라파마이신 무첨가
경과일
C
CD8+ CAR T 세포의 총 수#/웰
α CD19 CARTs/웰
3 공여자, + 라파마이신
3 공여자, 라파마이신 무첨가
경과일

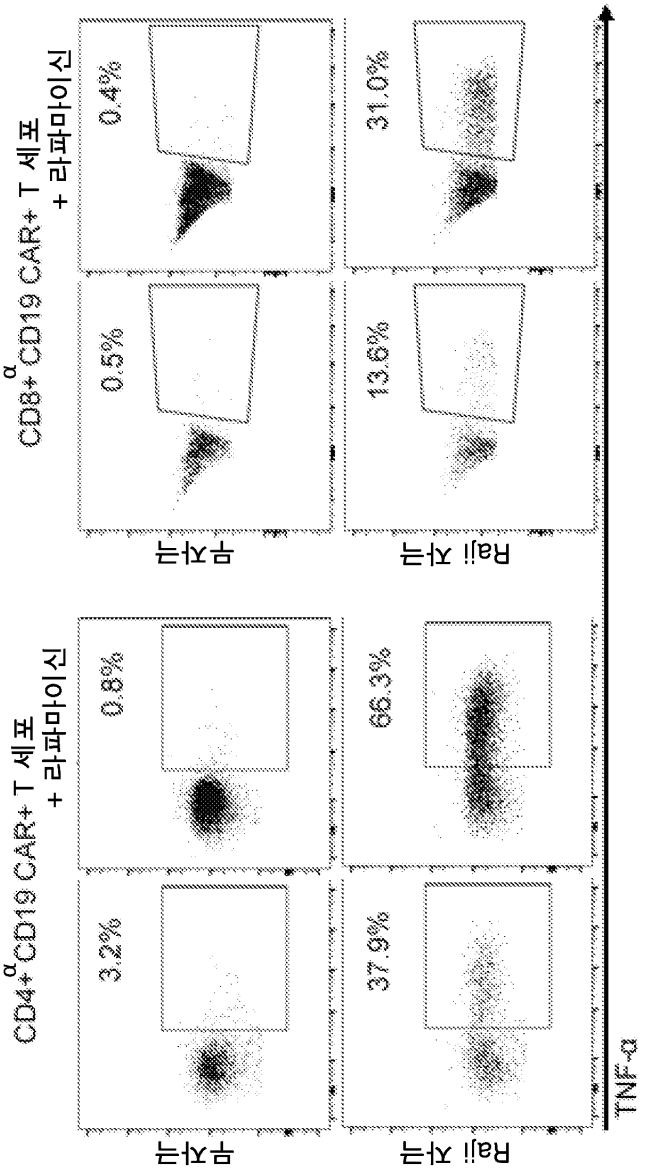
도면28



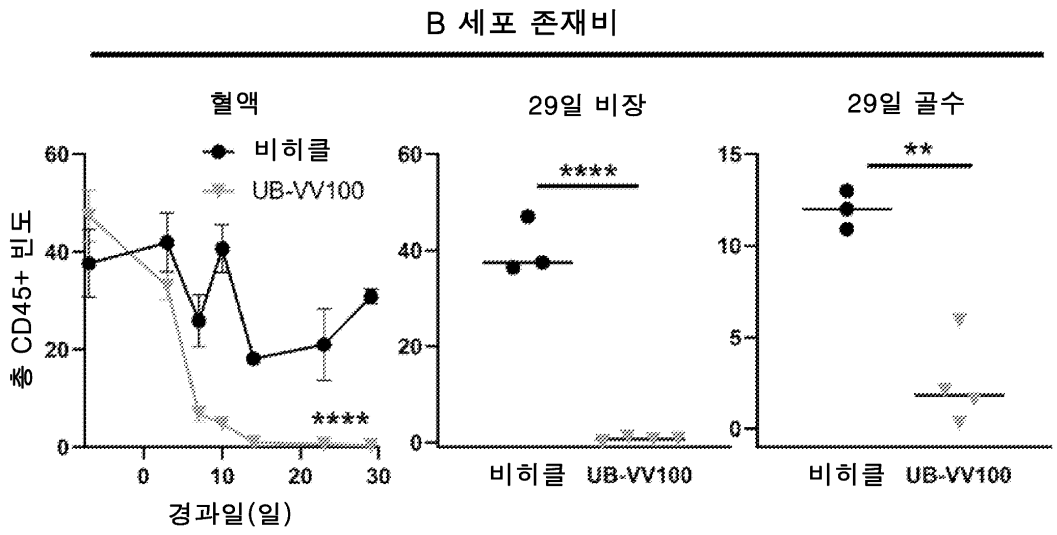
도면29a


CD4+αCD19 CAR+ T 세포
+ 라파마이신
CD8+αCD19 CAR+ T 세포
+ 라파마이신
무자극
Raji 자극
0.7%
0.6%
19.5%
32.5%
0.8%
1.5%
27.7%
48.2%
IFN-γ

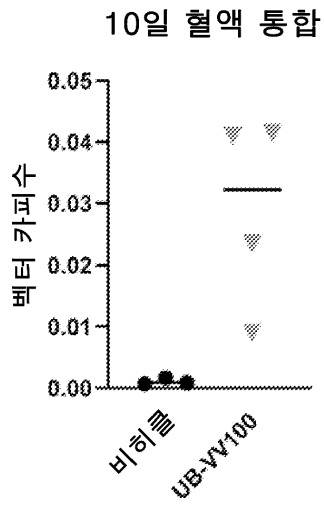
도면29b


CD4+αCD19 CAR+ T 세포
+ 라파마이신
CD8+αCD19 CAR+ T 세포
+ 라파마이신
무자극
Raji 자극
3.2%
0.8%
37.9%
66.3%
0.5%
0.4%
13.6%
31.0%
TNF-α

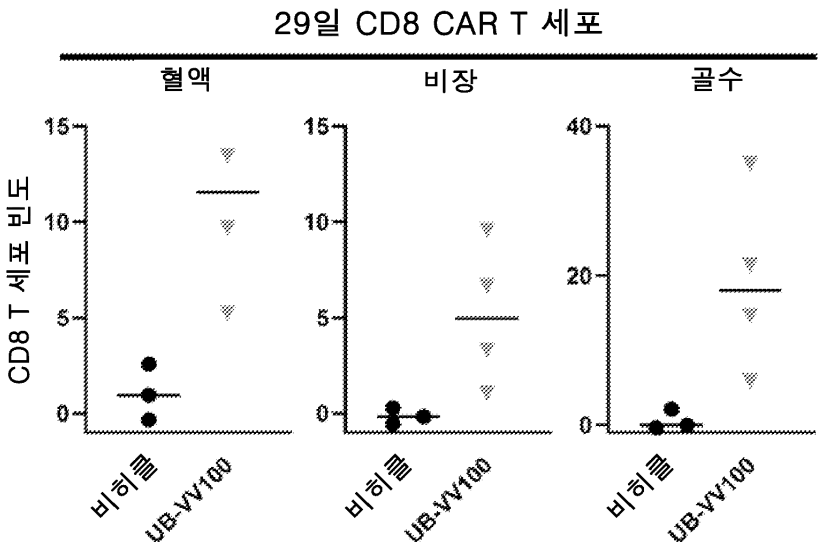
도면30a


B 세포 존재비
혈액
29일 비장
29일 골수
비히클
UB-VV100
총 CD45+ 빈도
경과일(일)
****
**
비히클
UB-VV100

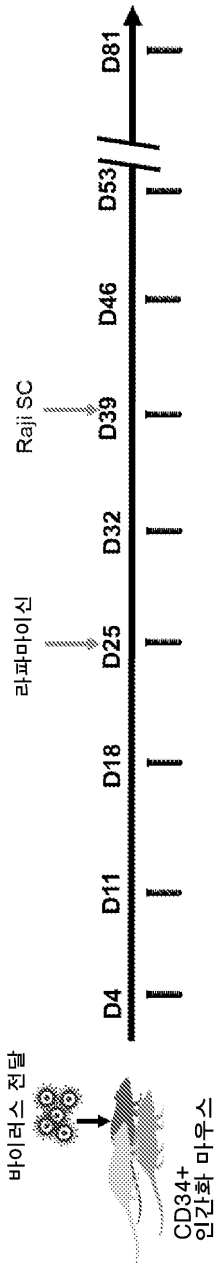
도면30b


10일 혈액 통합
벡터 카피수
비히클
UB-VV100

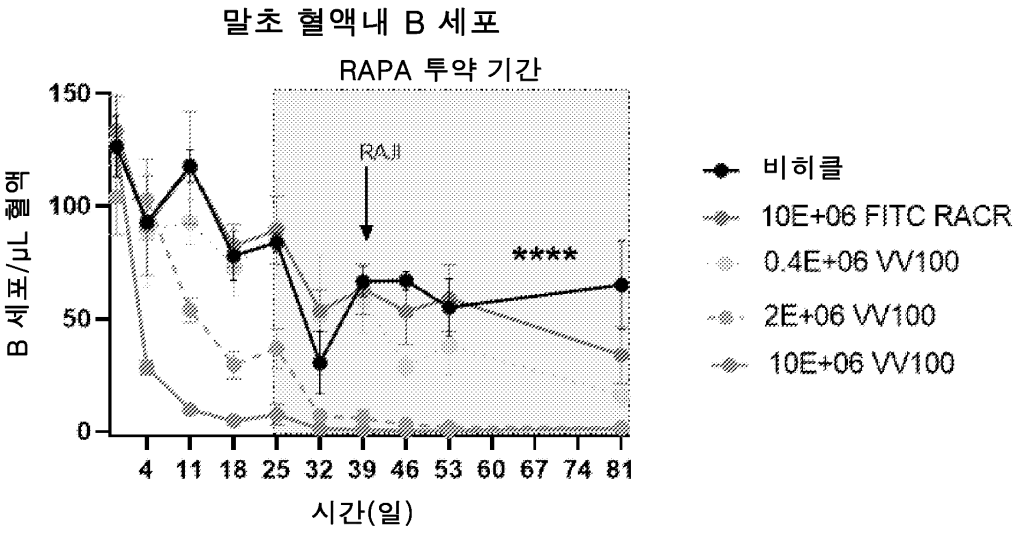
도면30c


29일 CD8 CAR T 세포
혈액
비장
골수
CD8 T 세포 빈도
15
10
5
0
15
10
5
0
40
20
0
비히클
UB-VV100
비히클
UB-VV100
비히클
UB-VV100

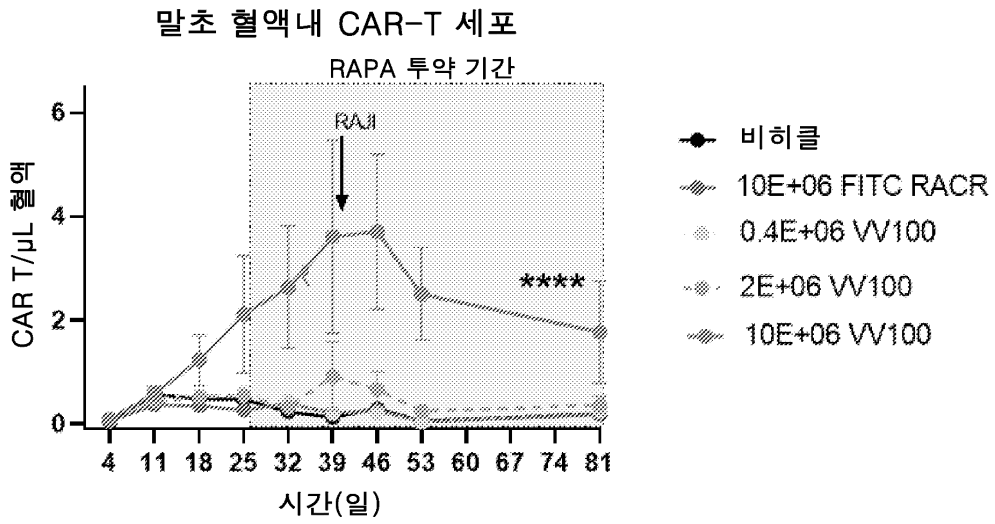
도면31a


D4
D11
D18
D25
D32
D39
D46
D53
D81
바이러스 전달
CD34+
인간화 마우스
라파마이신
Raji SC

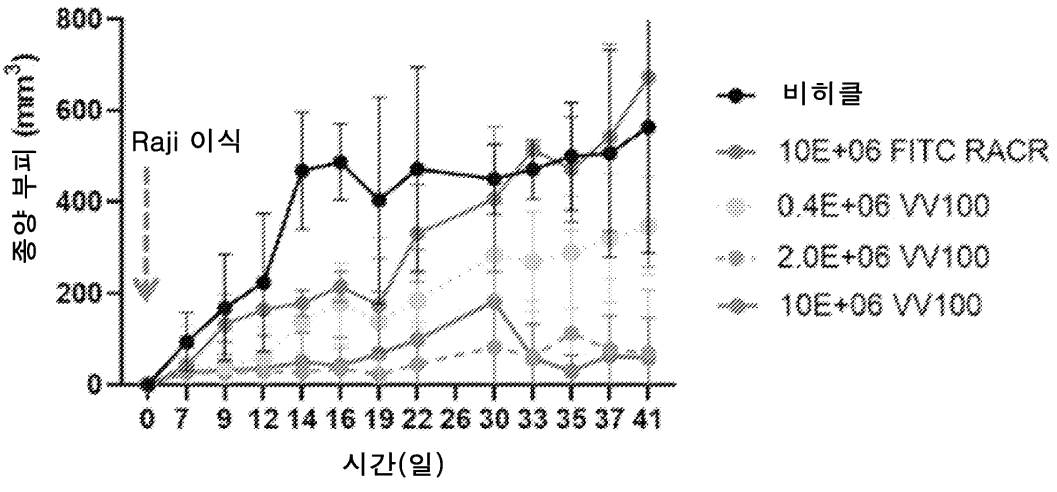
도면31b



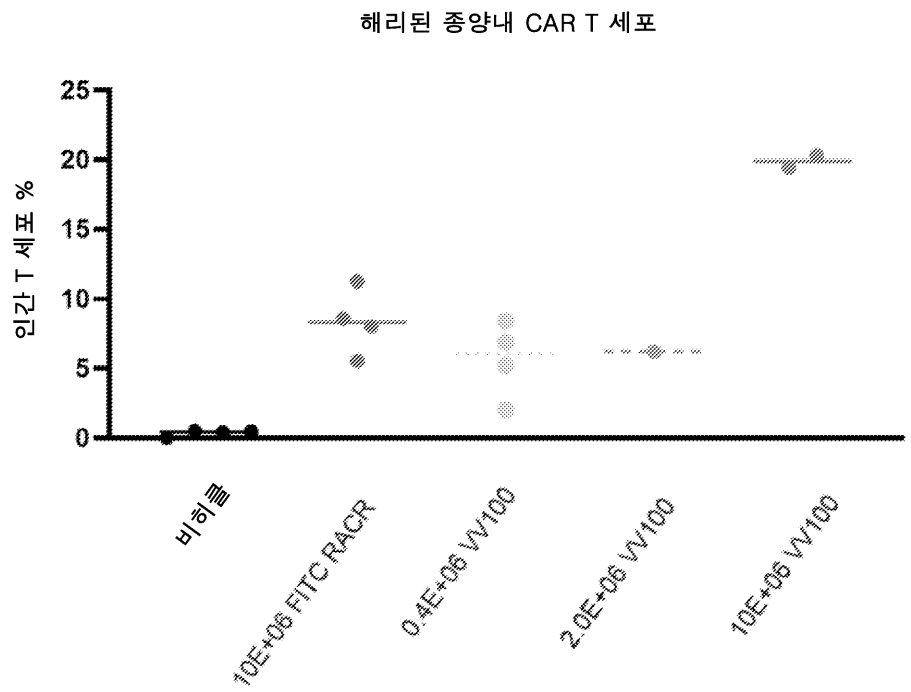
도면31c



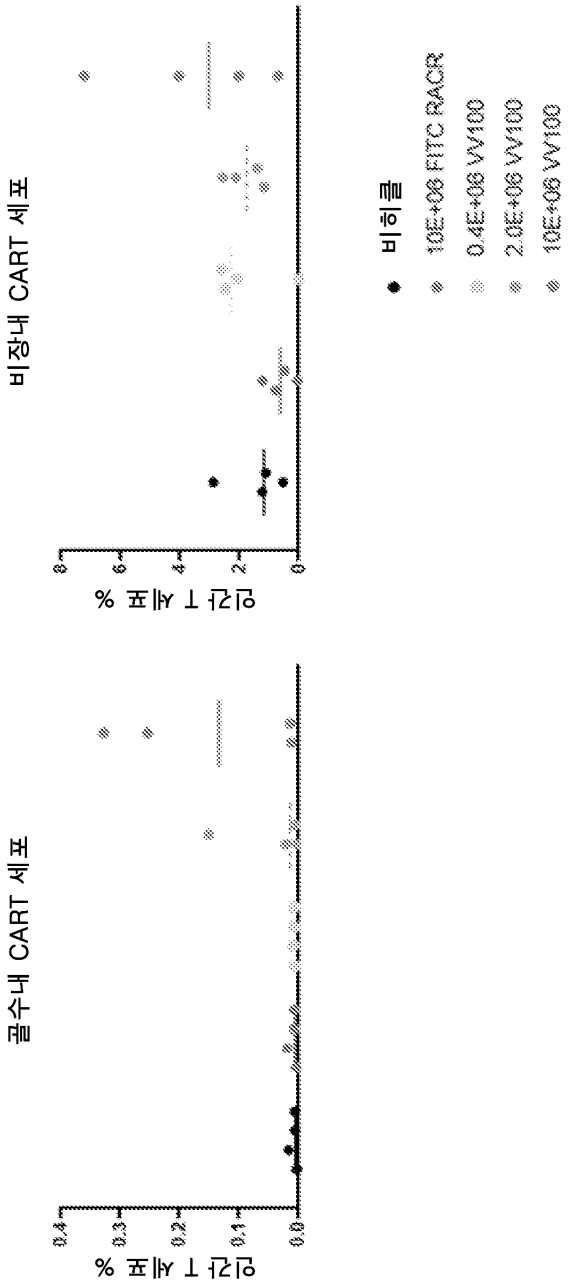
도면32a



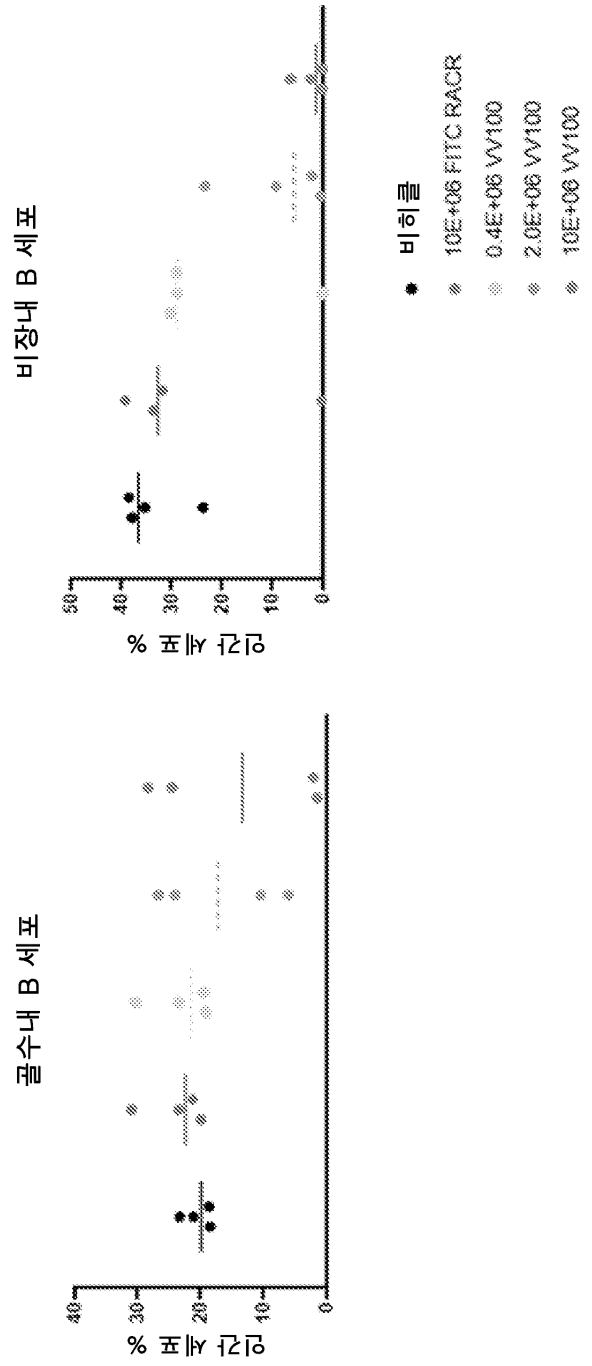
도면32b


해리된 종양내 CAR T 세포
인간 T 세포 %
25
20
15
10
5
0
비히클
10E+06 FITC RACR
0.4E+06 VV100
2.0E+06 VV100
10E+06 VV100

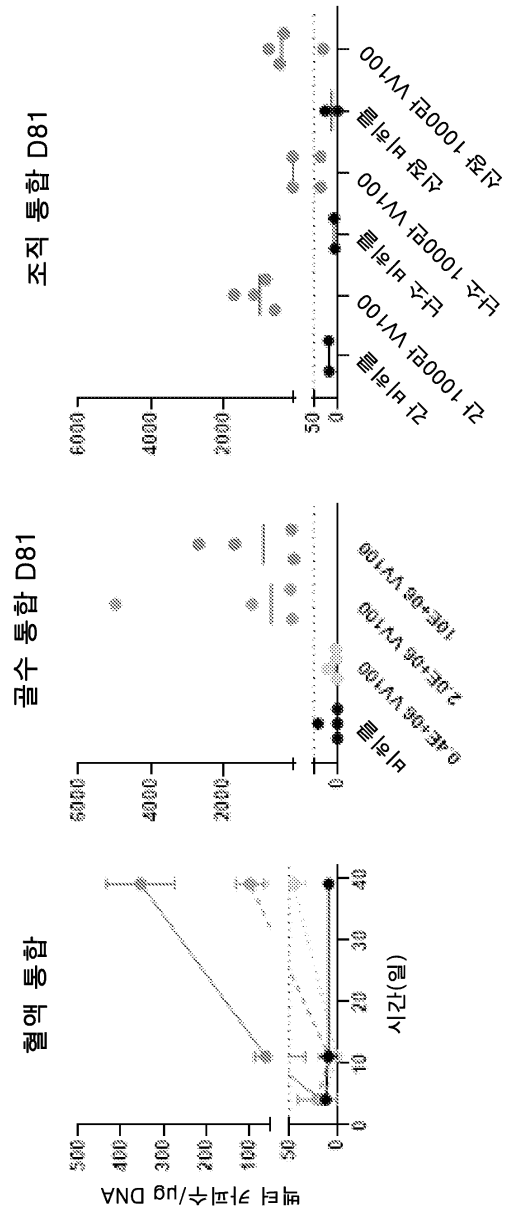
도면33a


비장내 CART 세포
골수내 CART 세포
인간 T 세포 %
인간 T 세포 %
비히클
10E+08 FITC RACR
0.4E+08 VV100
2.0E+06 VV100
10E+06 VV100

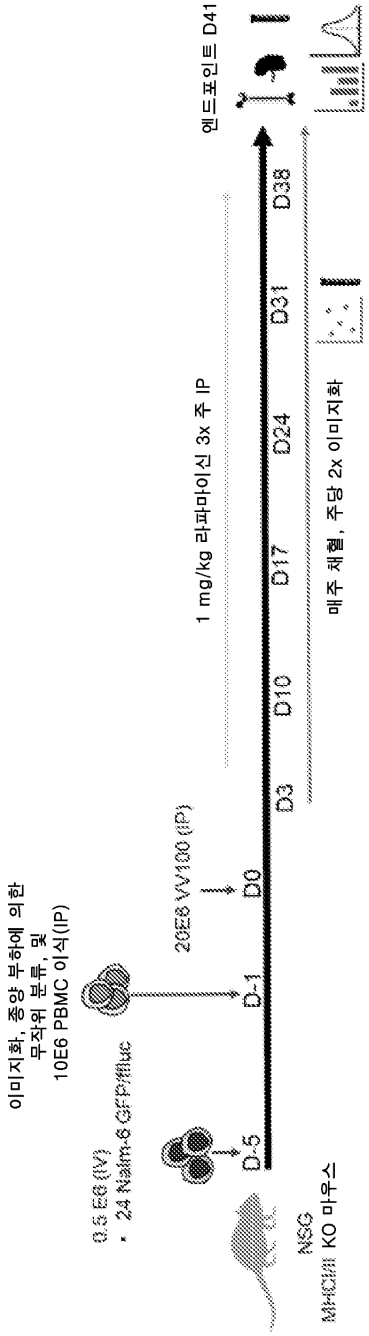
도면33b


비장내 B 세포
인간 세포 %
0
10
20
30
40
50
골수내 B 세포
인간 세포 %
0
10
20
30
40
비히클
10E+06 FITC RACR
0.4E+06 VV100
2.0E+06 VV100
10E+06 VV100

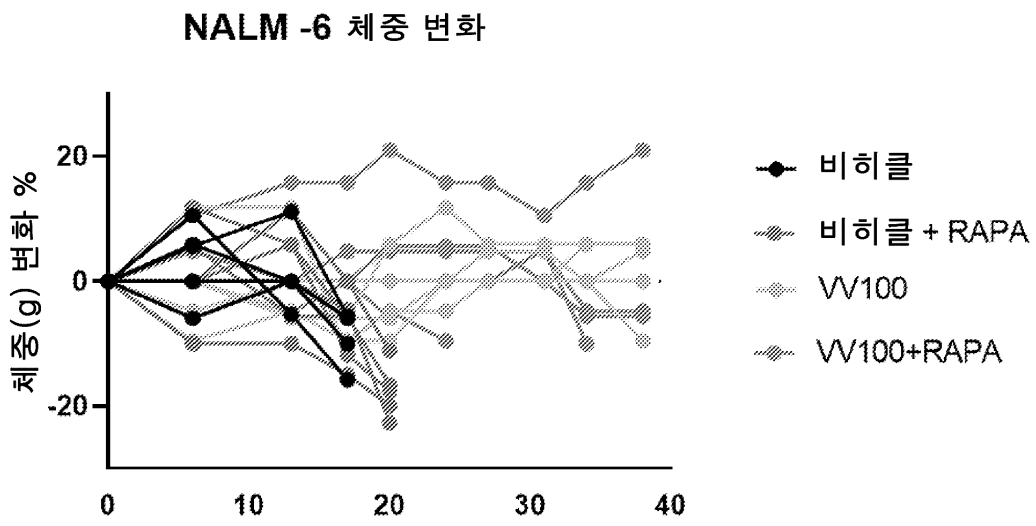
도면33c


혈액 통합
벡터 카피수/μg DNA
시간(일)
골수 통합 D81
비히클
0.4E+06 VV100
2.0E+06 VV100
조직 통합 D81
간 비히클
간 1000만 VV100
근육 비히클
근육 1000만 VV100
신장 비히클
신장 1000만 VV100

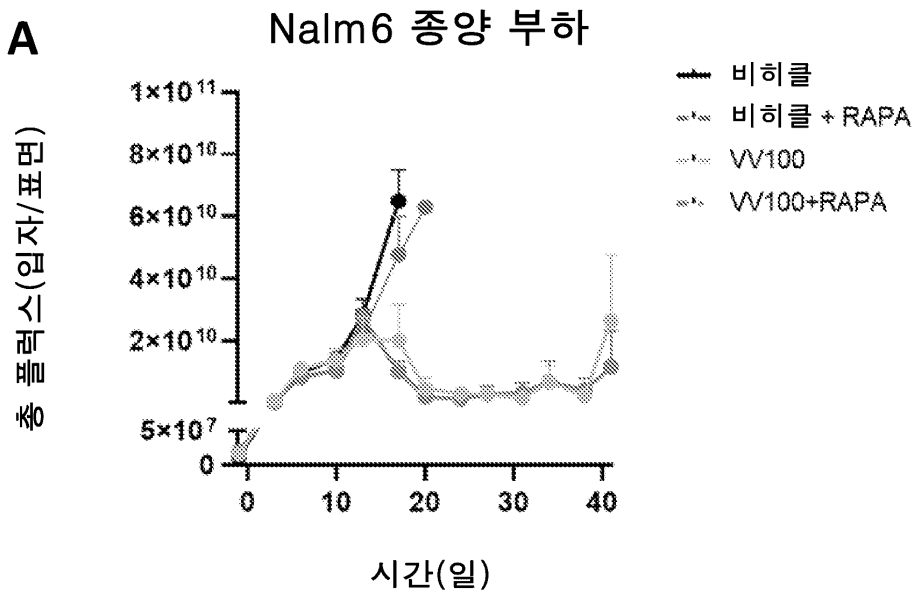
도면34a

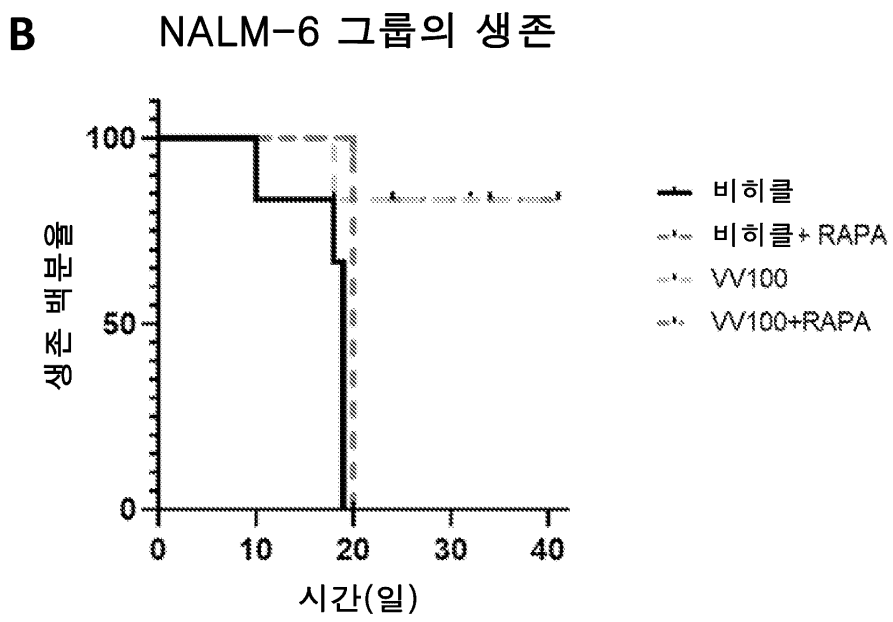

이미지화, 종양 부하에 의한
무작위 분류, 및
10E6 PBMC 이식(IP)
0.5 E6 (IV)
• 24 Nalm-6 GFP/fflluc
NSG
MHCI/II KO 마우스
D-5
D-1
D0
20E8 VV1200 (IP)
1 mg/kg 라파마이신 3x 주 IP
D3
D10
D17
D24
D31
D38
엔드포인트 D41
매주 채혈, 주당 2x 이미지화

도면34b

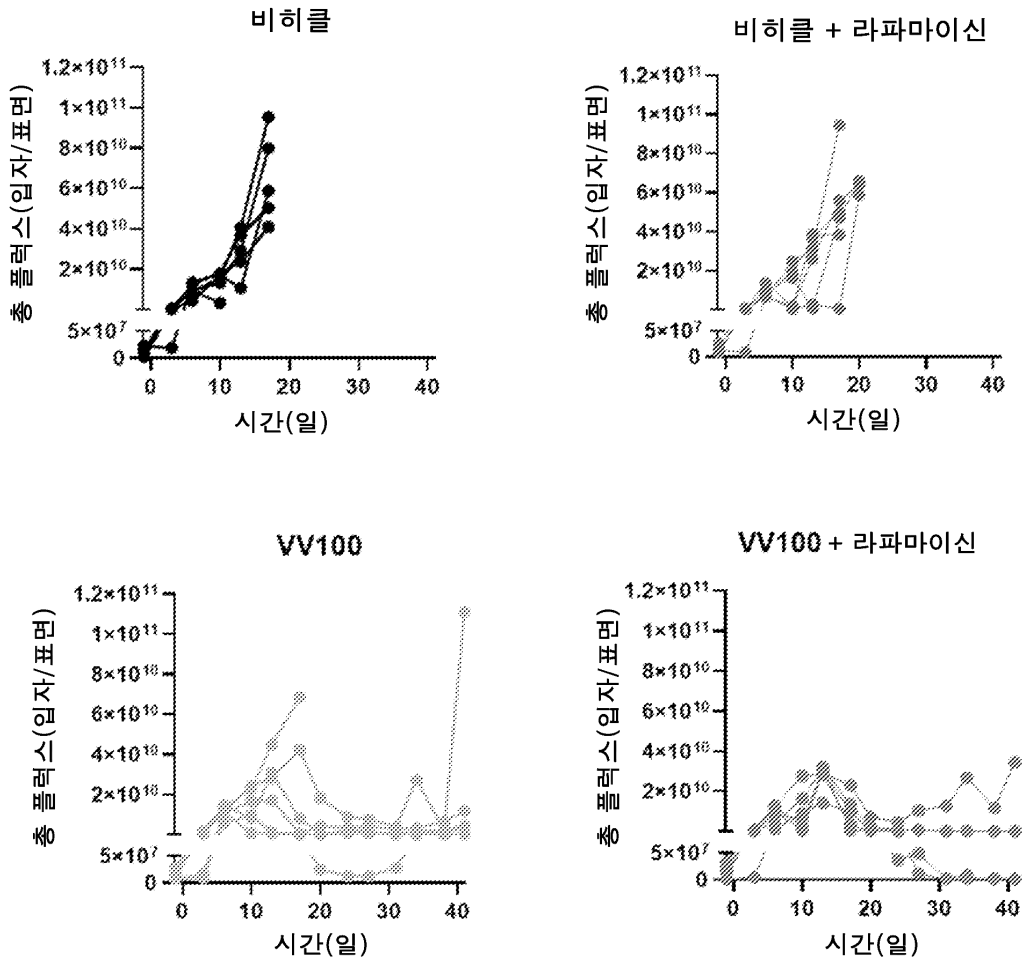

NALM -6 체중 변화
체중(g) 변화 %
20
0
-20
0
10
20
30
40
비히클
비히클 + RAPA
VV100
VV100+RAPA

도면35

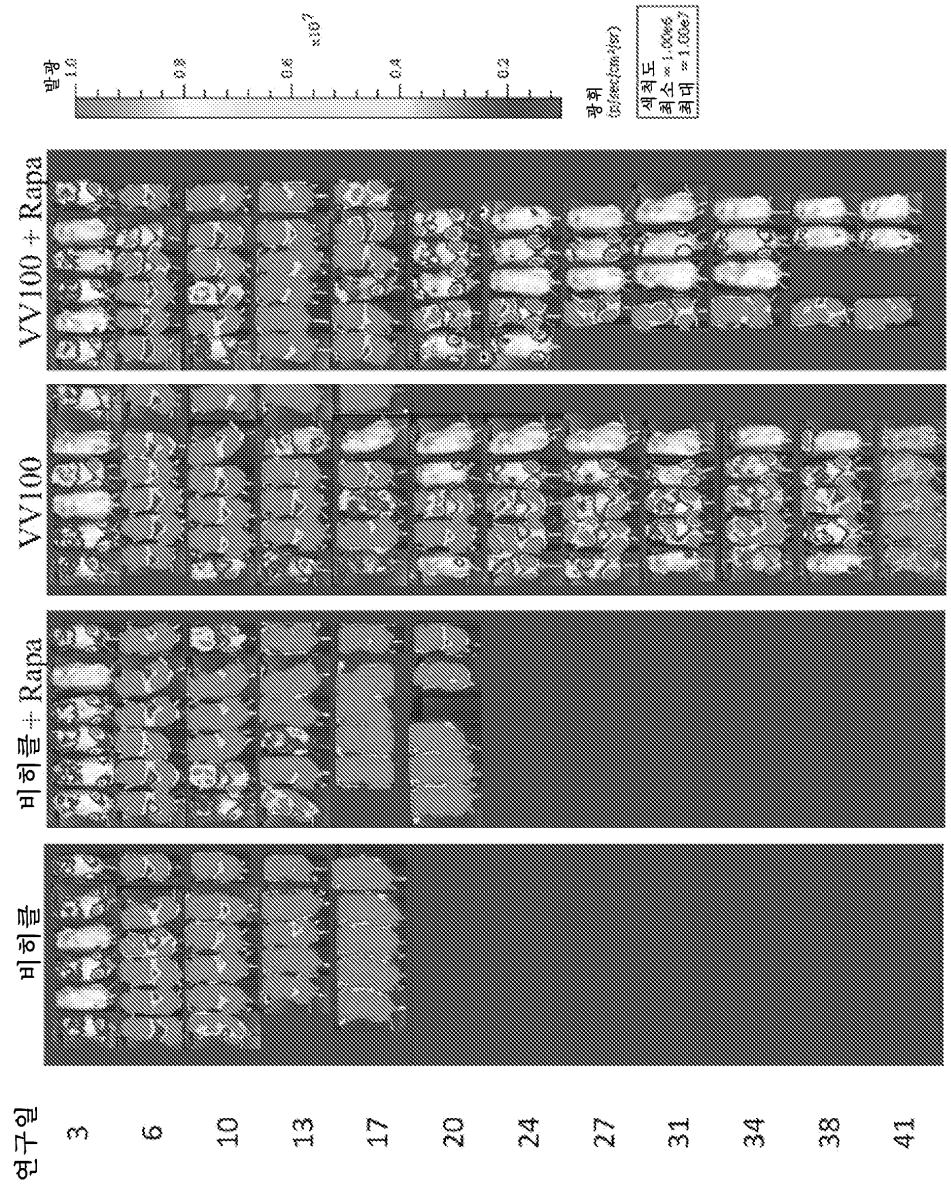

A
Nalm6 종양 부하
총 플럭스(입자/표면)
1×10^11
8×10^10
6×10^10
4×10^10
2×10^10
5×10^7
0
0
10
20
30
40
시간(일)
비히클
비히클 + RAPA
VV100
VV100+RAPA


B
NALM-6 그룹의 생존
생존 백분율
100
50
0
0
10
20
30
40
시간(일)
비히클
비히클 + RAPA
VV100
VV100+RAPA

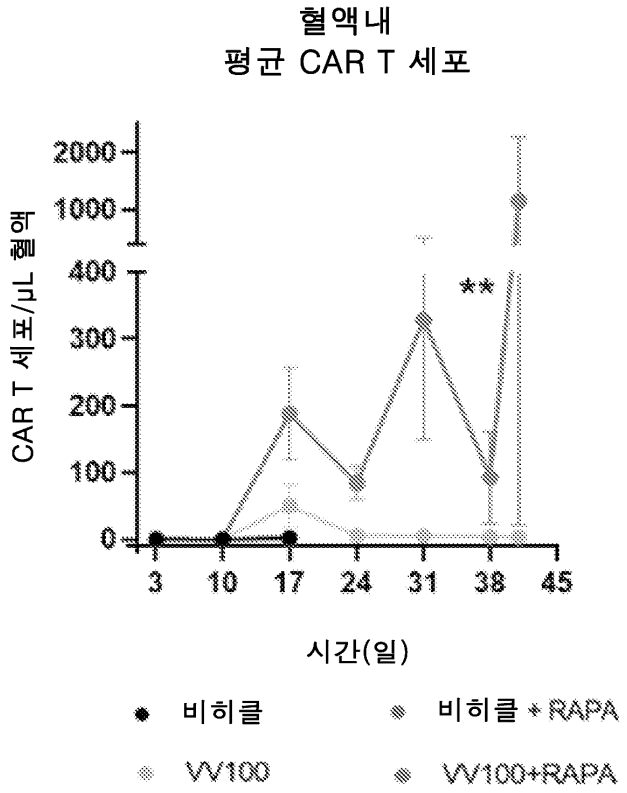
도면36


비히클
비히클 + 라파마이신
VV100
VV100 + 라파마이신
총 플럭스(입자/표면)
시간(일)
1.2×10¹¹
1×10¹¹
8×10¹⁰
6×10¹⁰
4×10¹⁰
2×10¹⁰
5×10⁷
0
0
10
20
30
40

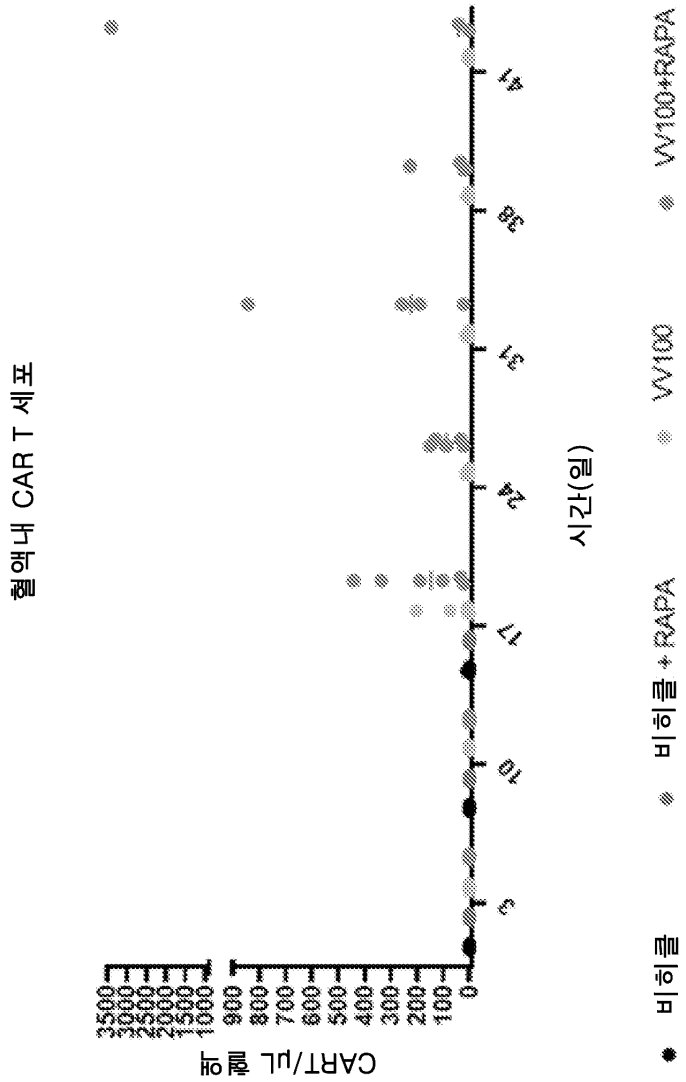
도면37


발광
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
x10^7
광휘
(photons/sec)
색척도
최소 = 1.00e6
최대 = 1.00e7
VV100 + Rapa
VV100
비히클 + Rapa
비히클
연구일
3
6
10
13
17
20
24
27
31
34
38
41

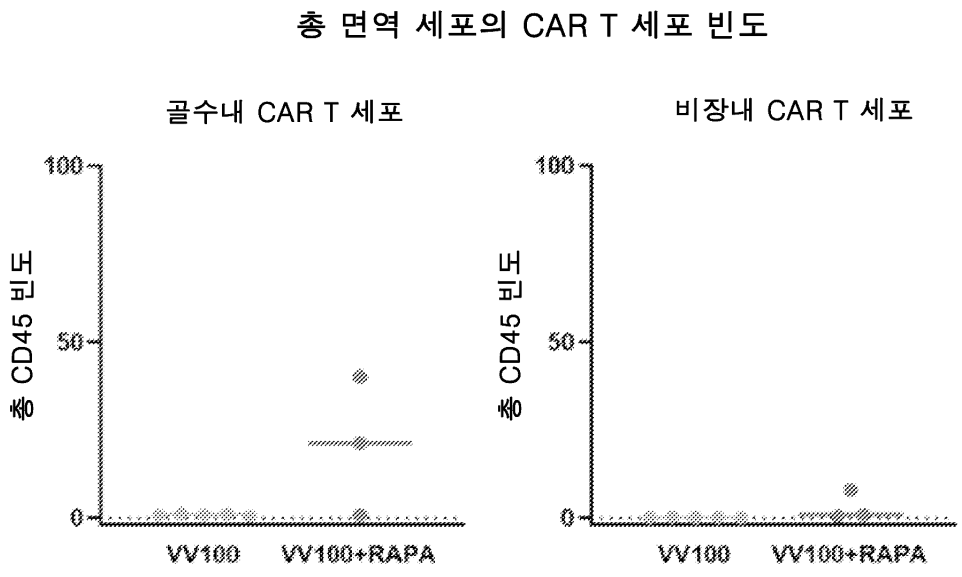
도면38a


혈액내
평균 CAR T 세포
CAR T 세포/μL 혈액
2000
1000
400
300
200
100
0
**
3
10
17
24
31
38
45
시간(일)
비히클
비히클 + RAPA
VV100
VV100+RAPA

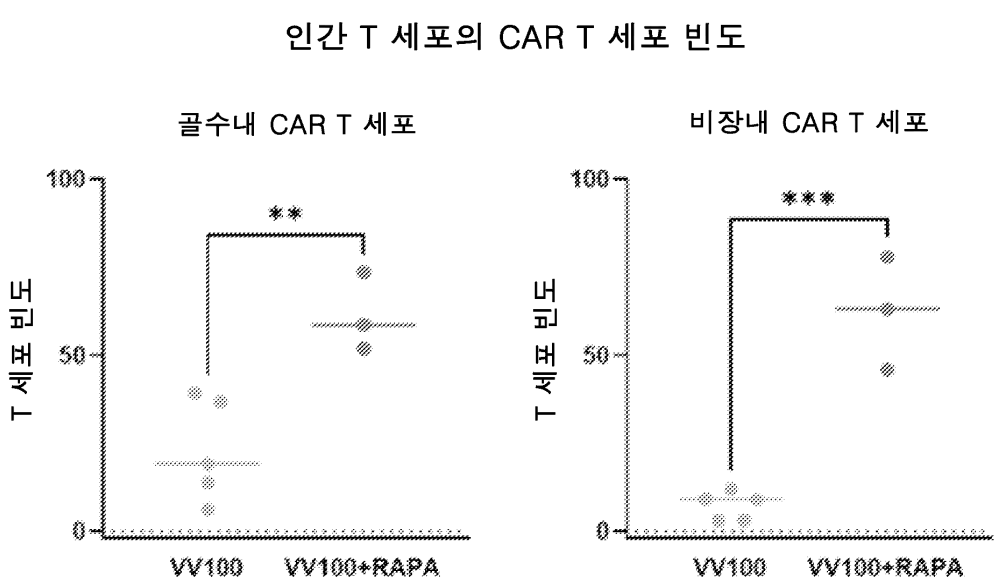
도면38b


혈액내 CAR T 세포
CART/μL 혈액
35000
30000
25000
20000
15000
10000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
3
10
17
24
31
38
45
시간(일)
비히클
비히클 + RAPA
VV100
VV100+RAPA

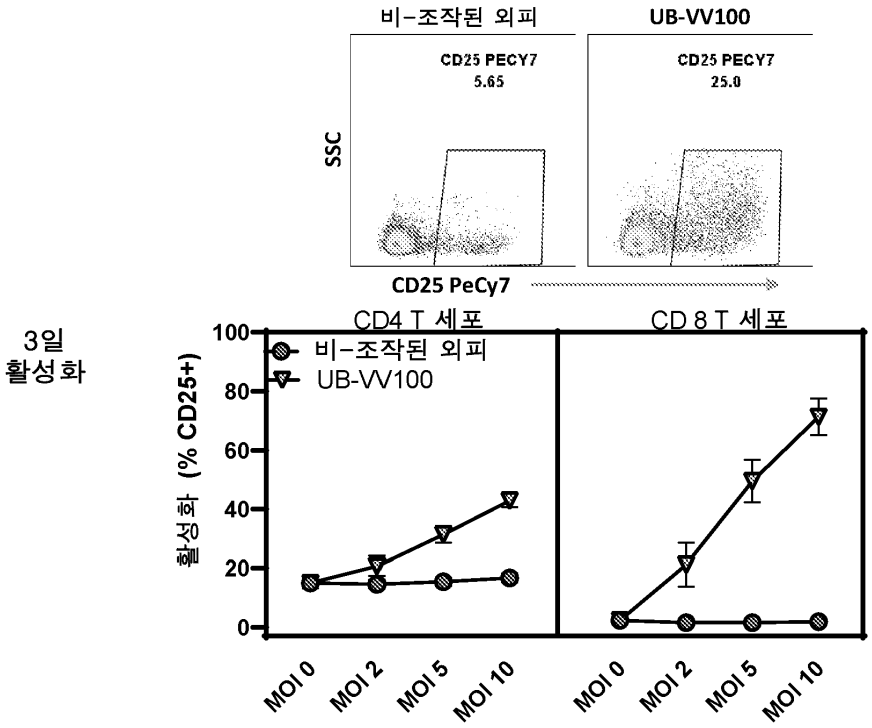
도면39a


총 면역 세포의 CAR T 세포 빈도
골수내 CAR T 세포
비장내 CAR T 세포
총 CD45 빈도
100
50
0
VV100
VV100+RAPA

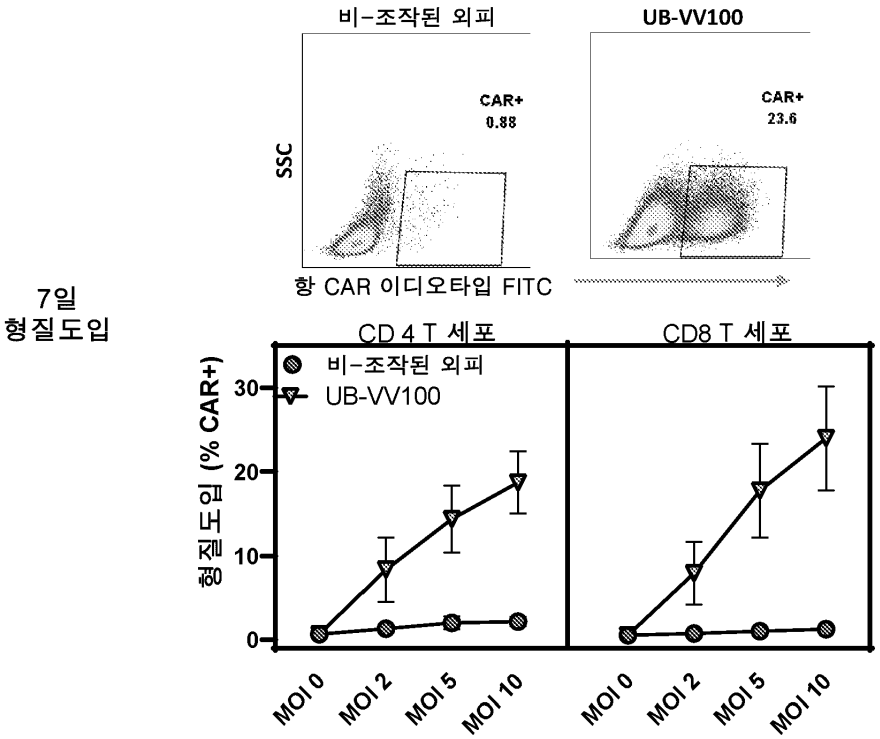
도면39b


인간 T 세포의 CAR T 세포 빈도
골수내 CAR T 세포
비장내 CAR T 세포
T 세포 빈도
100
50
0
**
***
VV100
VV100+RAPA

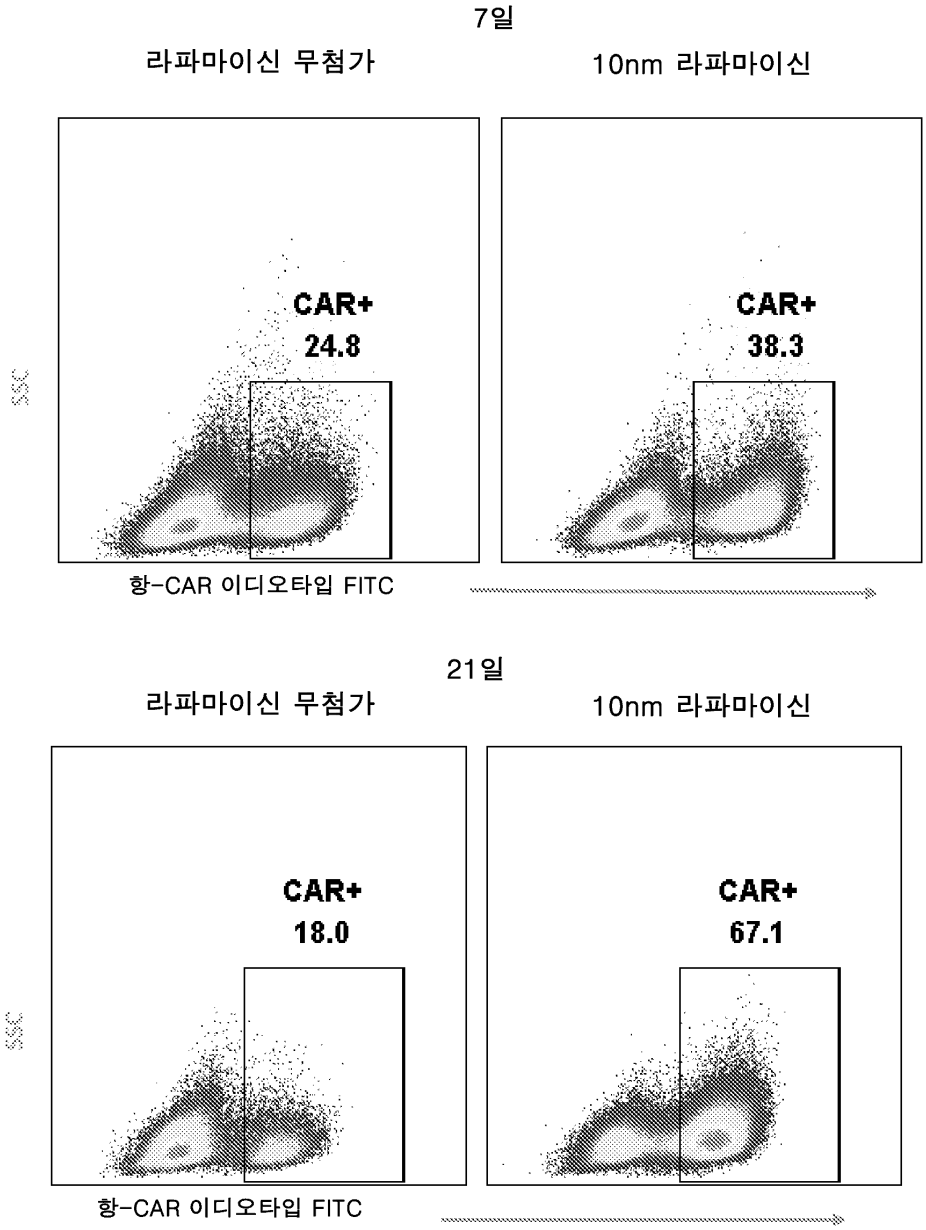
도면40a


비-조작된 외피
UB-VV100
CD25 PECY7
5.65
CD25 PECY7
25.0
SSC
CD25 PeCy7
3일
활성화
CD4 T 세포
CD 8 T 세포
비-조작된 외피
UB-VV100
활성화 (% CD25+)
100
80
60
40
20
0
MOI 0
MOI 2
MOI 5
MOI 10

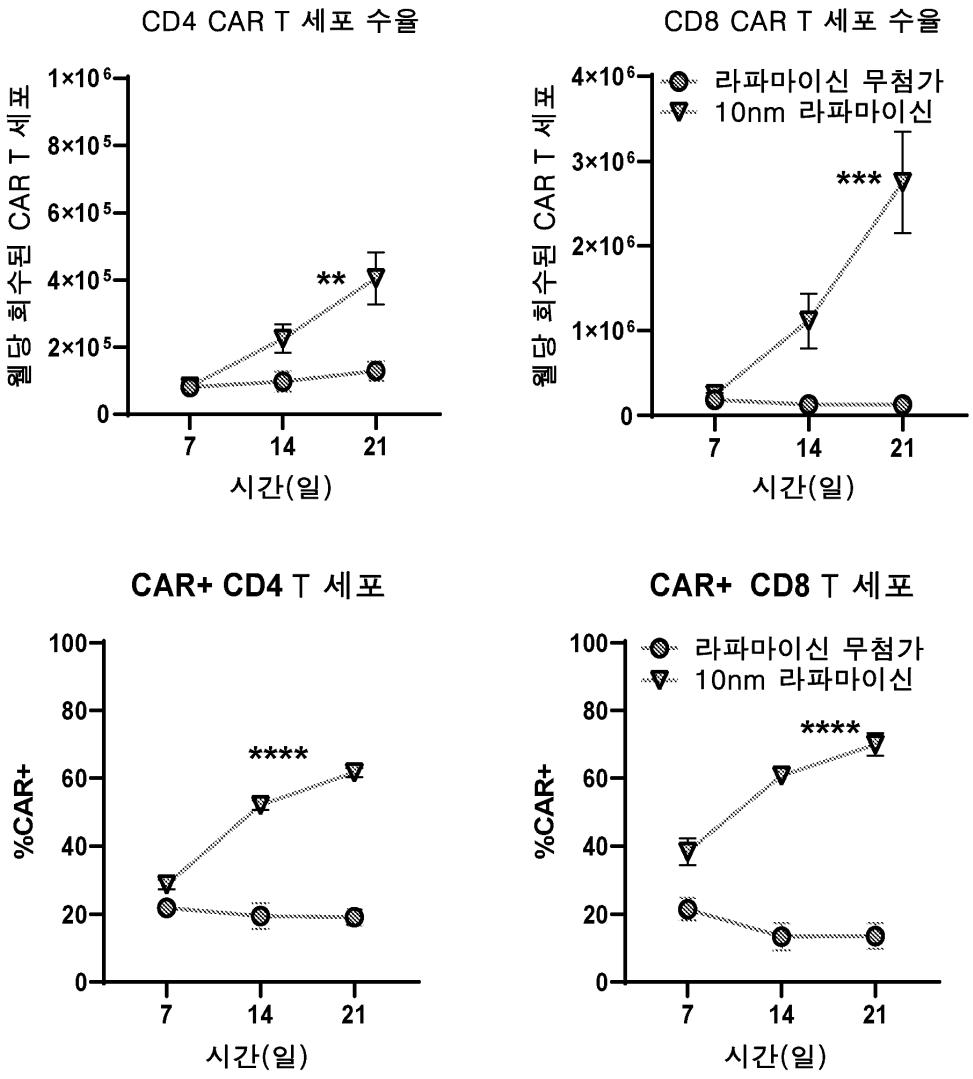
도면40b


비-조작된 외피
UB-VV100
CAR+
0.88
CAR+
23.6
SSC
항 CAR 이디오타입 FITC
7일
형질도입
CD 4 T 세포
CD8 T 세포
비-조작된 외피
UB-VV100
형질도입 (% CAR+)
30
20
10
0
MOI 0
MOI 2
MOI 5
MOI 10
MOI 0
MOI 2
MOI 5
MOI 10

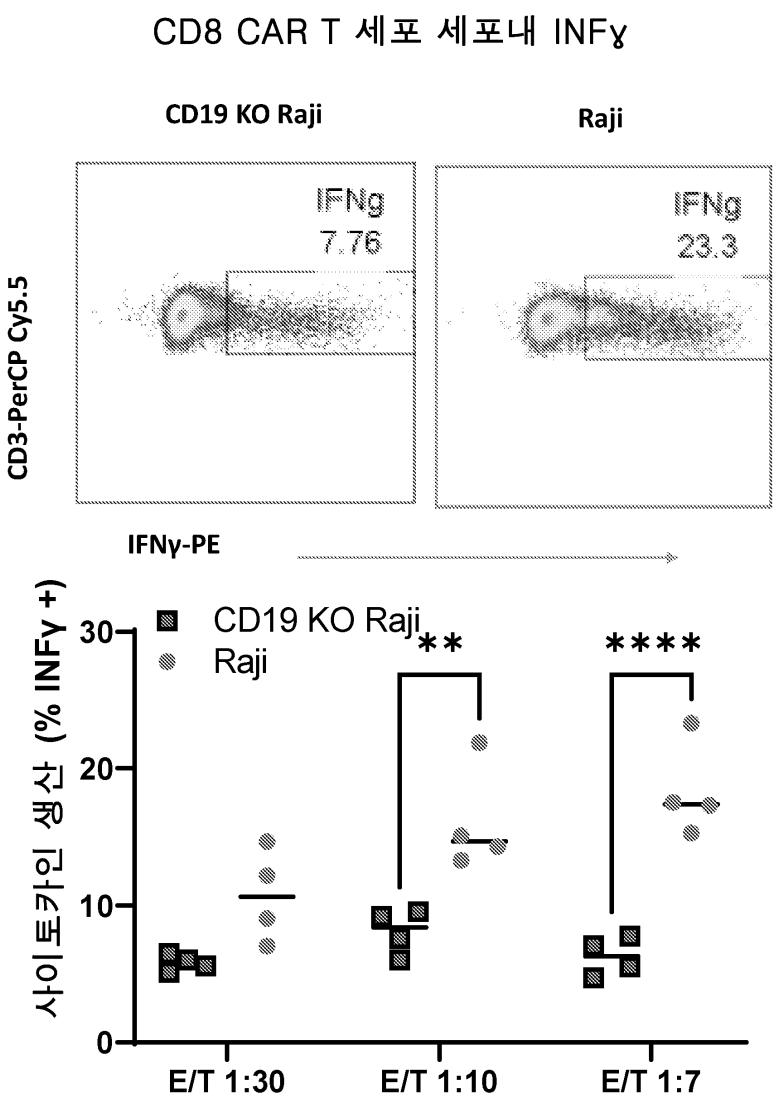
도면41a


7일
라파마이신 무첨가
10nm 라파마이신
CAR+
24.8
CAR+
38.3
SSC
항-CAR 이디오타입 FITC
21일
라파마이신 무첨가
10nm 라파마이신
CAR+
18.0
CAR+
67.1
SSC
항-CAR 이디오타입 FITC

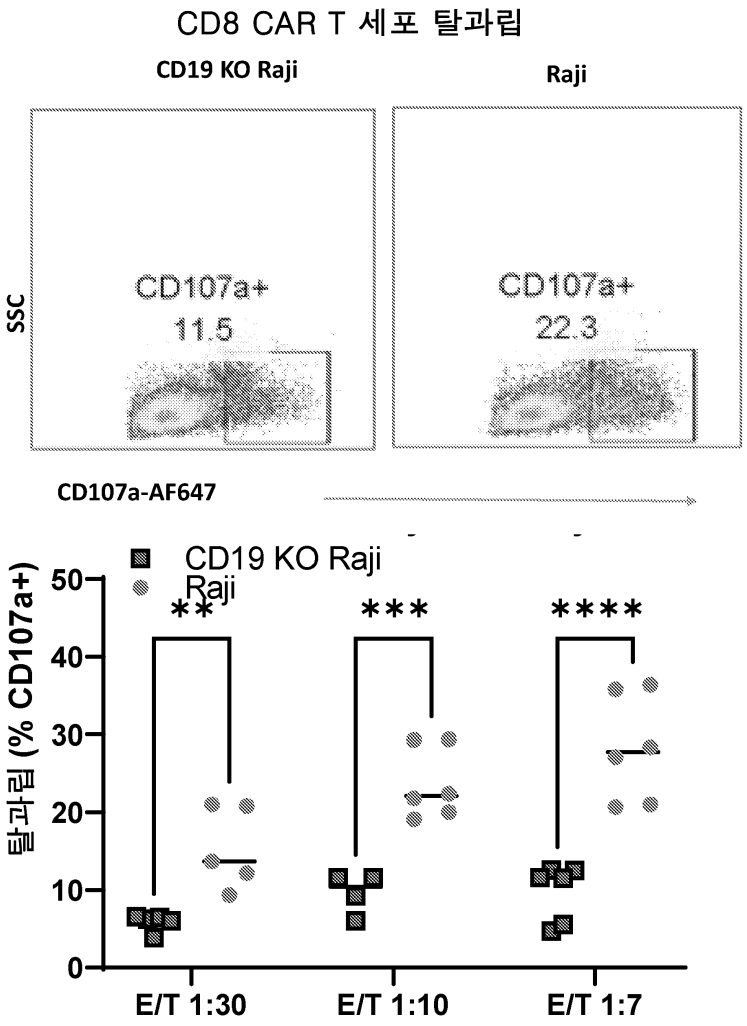
도면41b


CD4 CAR T 세포 수율
웰당 회수된 CAR T 세포
1×10⁶
8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
**
7
14
21
시간(일)
CD8 CAR T 세포 수율
웰당 회수된 CAR T 세포
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
라파마이신 무첨가
10nm 라파마이신
***
7
14
21
시간(일)
CAR+ CD4 T 세포
%CAR+
100
80
60
40
20
0
****
7
14
21
시간(일)
CAR+ CD8 T 세포
%CAR+
100
80
60
40
20
0
라파마이신 무첨가
10nm 라파마이신
****
7
14
21
시간(일)

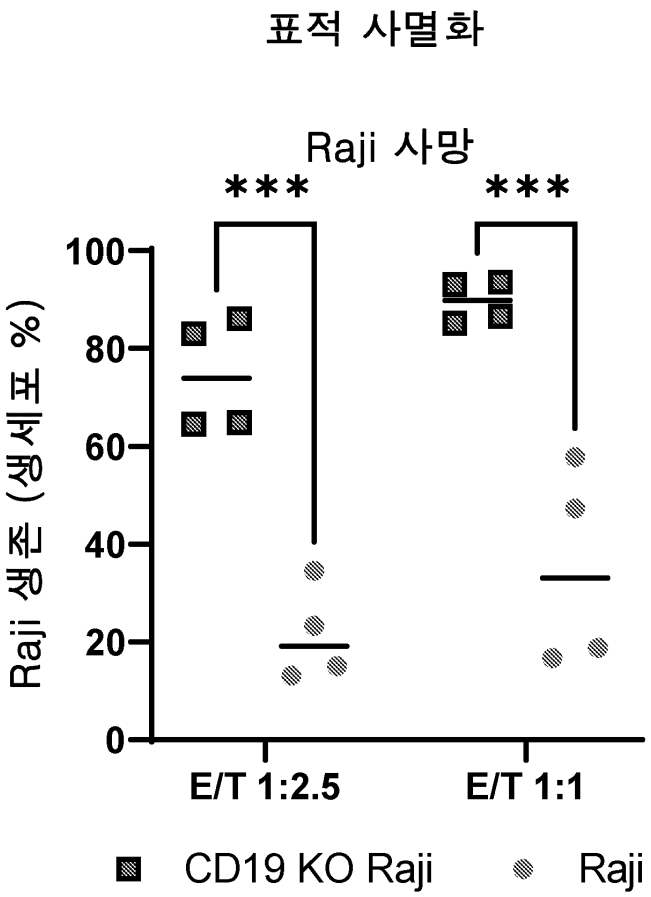
도면42a


CD8 CAR T 세포 세포내 INFɣ
CD19 KO Raji
Raji
IFNg
7.76
IFNg
23.3
CD3-PerCP Cy5.5
IFNγ-PE
CD19 KO Raji
Raji
**
****
사이토카인 생산 (% INFγ +)
30
20
10
0
E/T 1:30
E/T 1:10
E/T 1:7

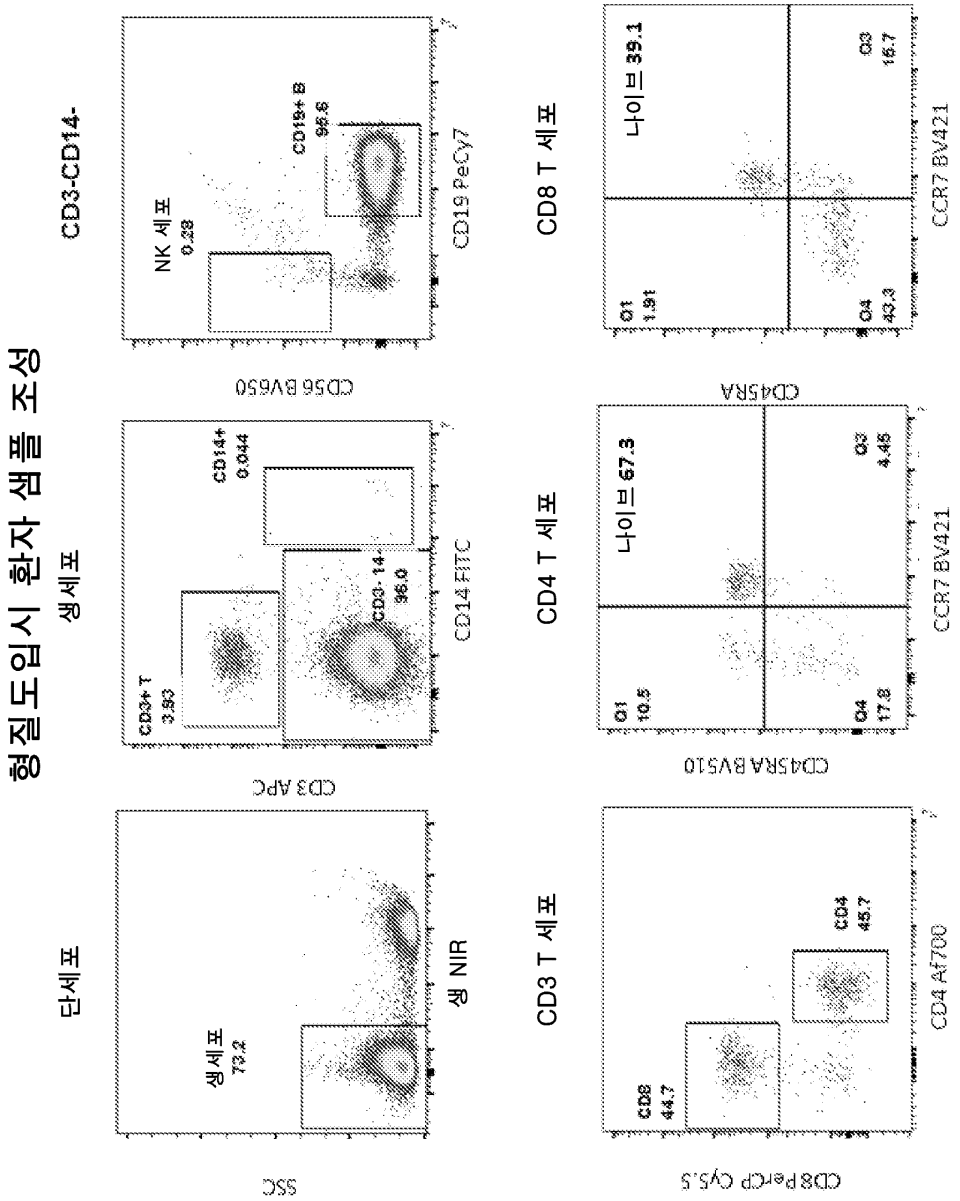
도면42b


CD8 CAR T 세포 탈과립
CD19 KO Raji
Raji
SSC
CD107a+
11.5
CD107a+
22.3
CD107a-AF647
CD19 KO Raji
Raji
탈과립 (% CD107a+)
50
40
30
20
10
0
**
***
****
E/T 1:30
E/T 1:10
E/T 1:7

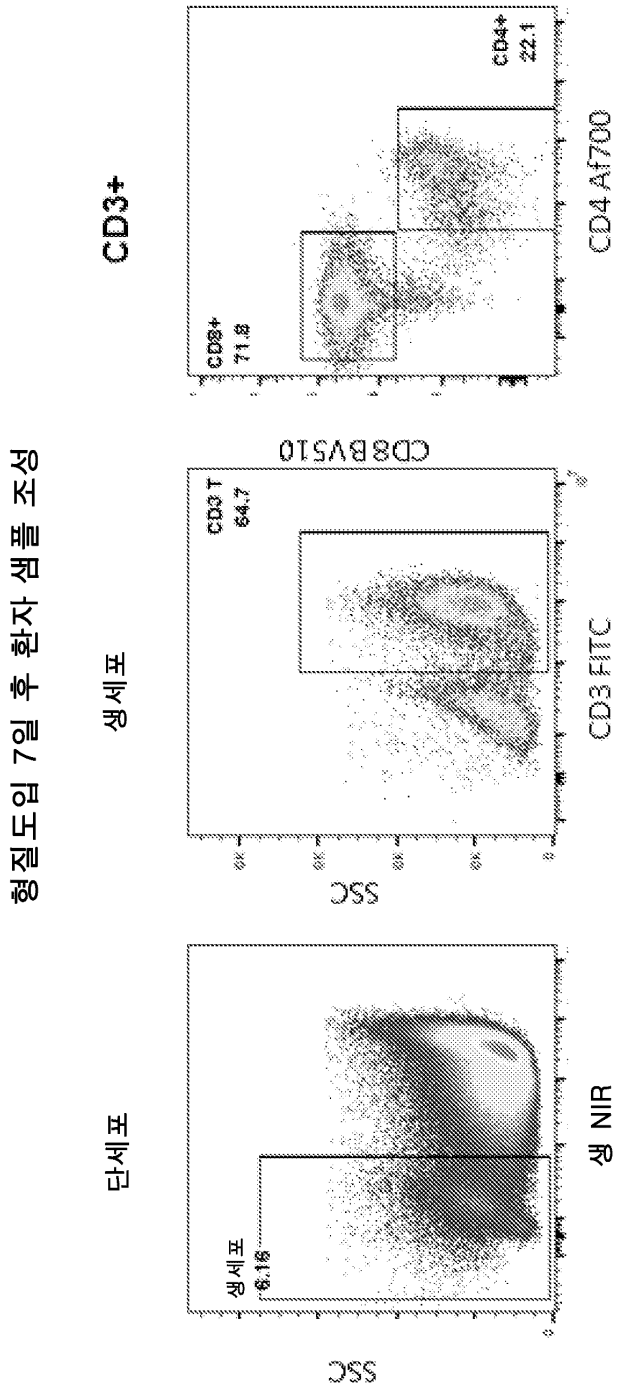
도면42c


표적 사멸화
Raji 사망
***
***
100
80
60
40
20
0
Raji 생존 (생세포 %)
E/T 1:2.5
E/T 1:1
CD19 KO Raji
Raji

도면43a

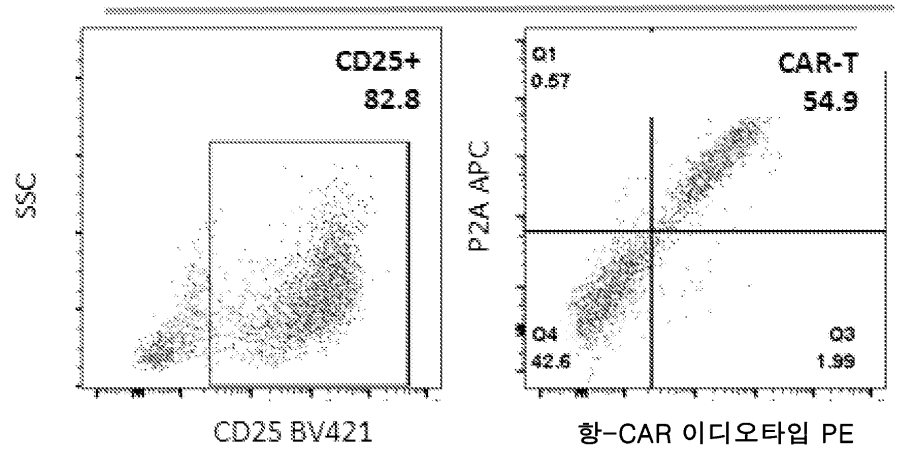

형질도입시 환자 샘플 조성
단세포
생 NIR
생 세포
73.2
SSC
CD3 APC
CD3+ T
3.93
CD14+
0.044
CD3- 14
96.0
CD14 FITC
CD3-CD14-
CD56 BV650
NK 세포
0.28
CD19+ B
96.8
CD19 PeCy7
CD3 T 세포
CD8 PerCP Cy5.5
CD8
44.7
CD4
45.7
CD4 AF700
CD4 T 세포
CD45RA BV510
나이브 67.3
Q1
10.5
Q4
17.8
Q3
4.46
CCR7 BV421
CD8 T 세포
CD45RA
나이브 39.1
Q1
1.91
Q4
43.3
Q3
16.7
CCR7 BV421

도면43b

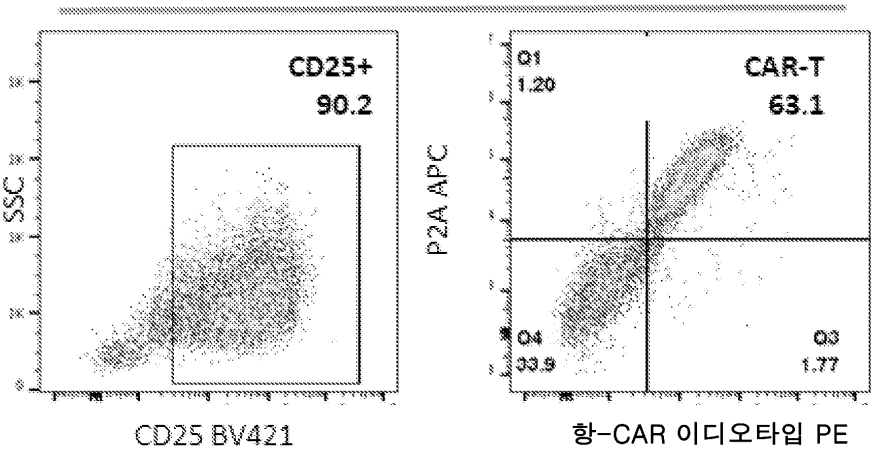

형질도입 7일 후 환자 샘플 조성
단세포
생세포
CD3+
생 NIR
SSC
생세포
6.16
SSC
CD3 FITC
CD3 T
64.7
CD8 BV510
CD4 AF700
CD8+
71.8
CD4+
22.1

도면43c

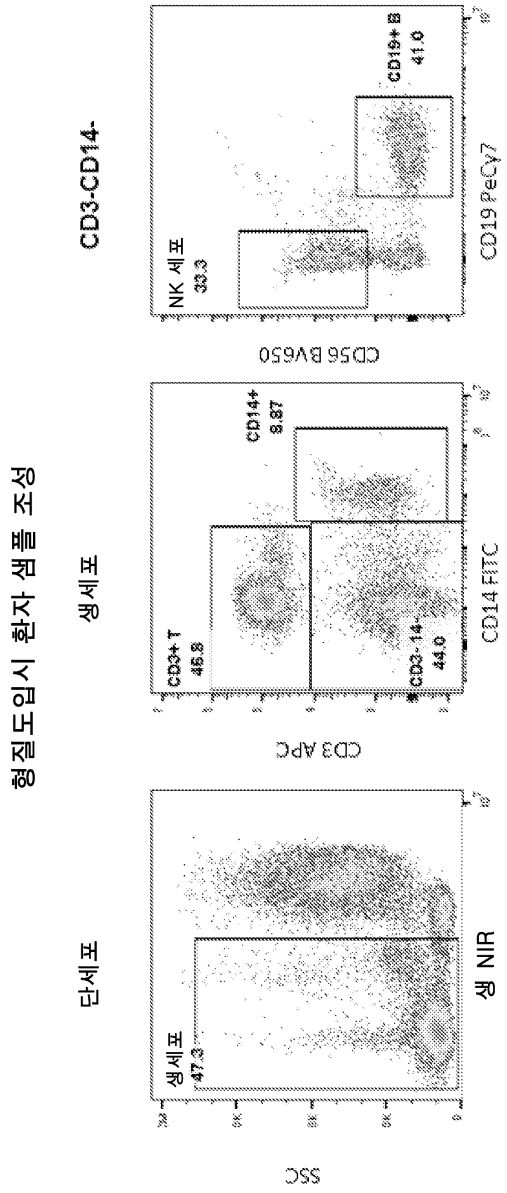
CD4 T 세포



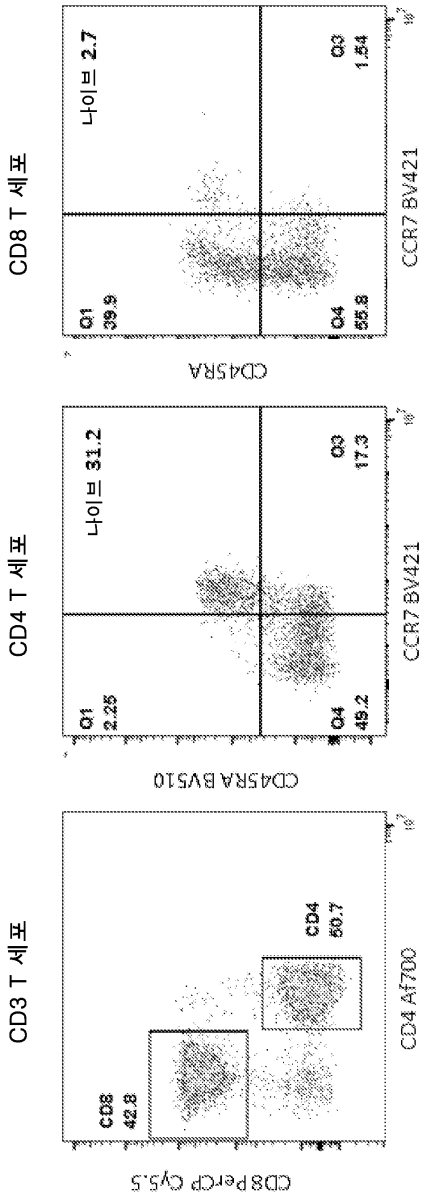
CD8 T 세포



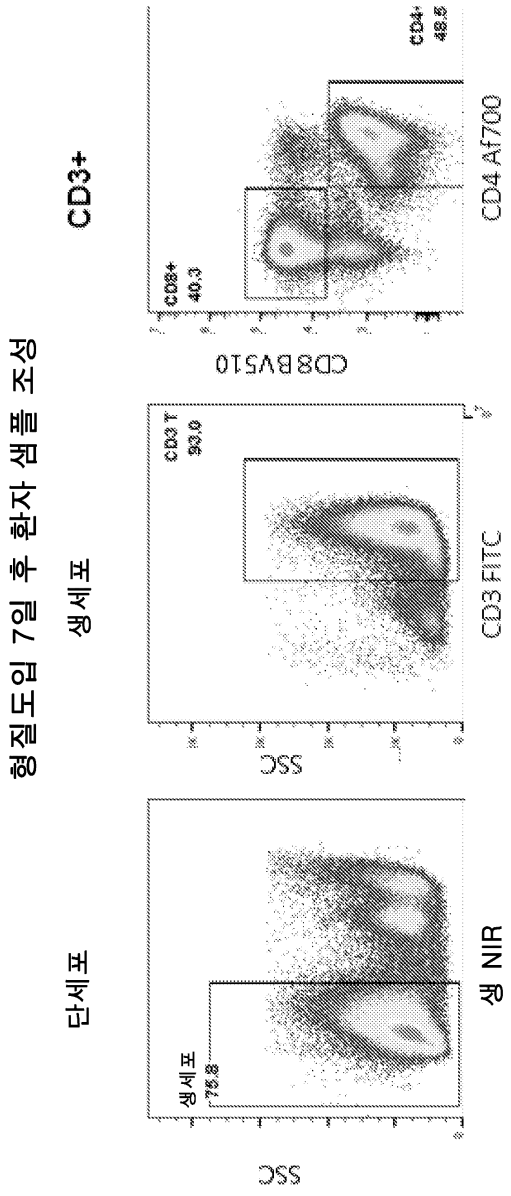
도면44a


형질도입시 환자 샘플 조성
단세포
생세포
CD3-CD14-
생 NIR
SSC
생세포
47.3
CD3 APC
CD14 FITC
CD3+ T
46.8
CD14+
8.87
CD3-14-
44.0
CD56 BV650
CD19 PeCy7
NK 세포
33.3
CD19+ B
41.0

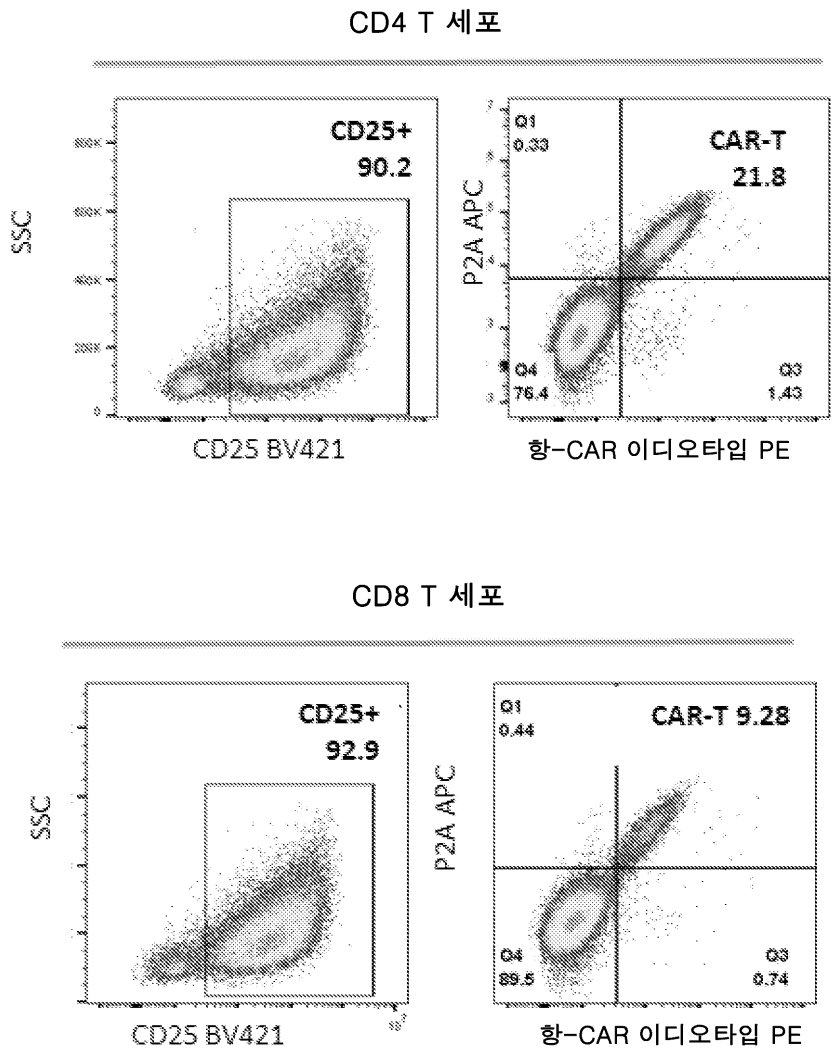
도면44b


CD3 T 세포
CD8 T 세포
CD4 T 세포
CD8 PerCP Cy5.5
CD4 Af700
CD45RA BV510
CCR7 BV421
CD45RA
CD8
42.8
CD4
50.7
Q1
2.25
Q4
45.2
나이브 31.2
Q3
17.3
Q1
39.9
Q4
55.8
나이브 2.7
Q3
1.54

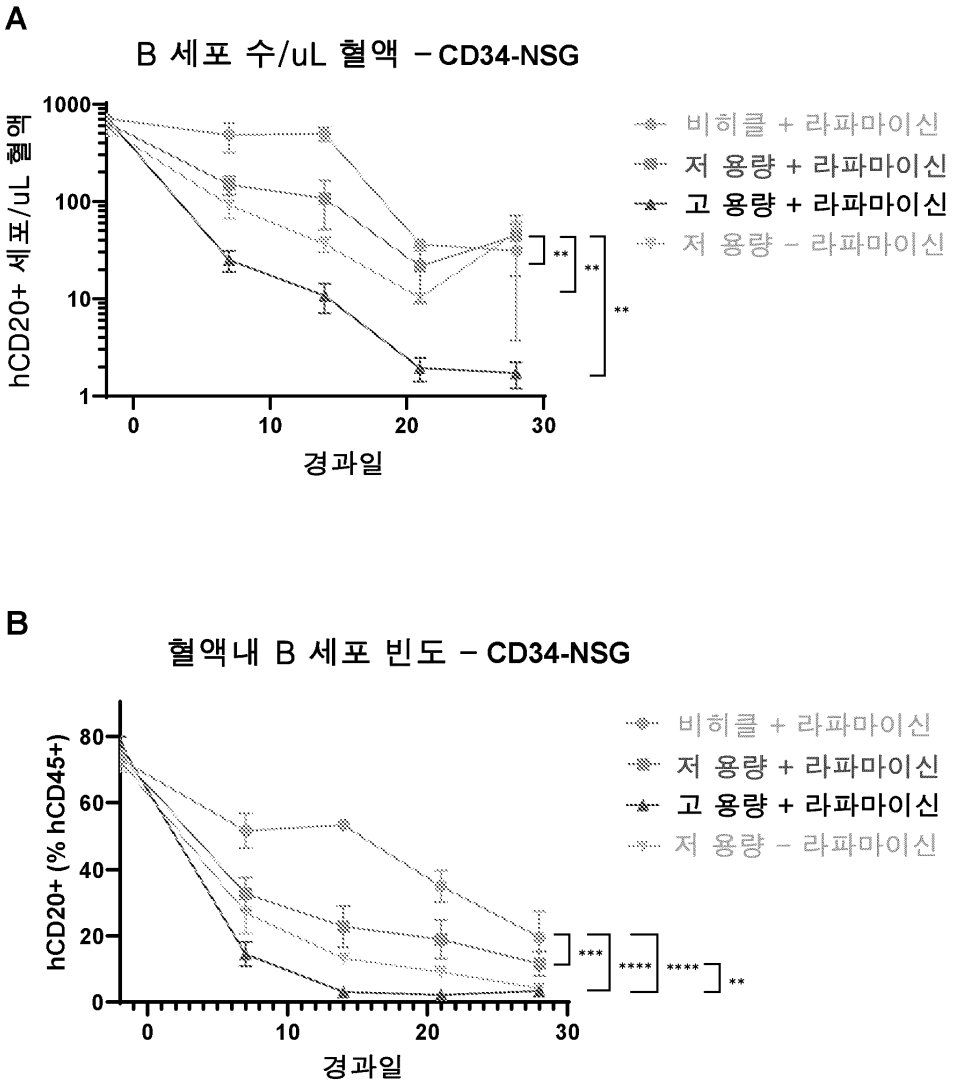
도면44c


형질도입 7일 후 환자 샘플 조성
단세포
생세포
CD3+
생 NIR
생세포
75.8
SSC
SSC
CD3 T
93.0
CD3 FITC
CD8 BV510
CD8+
40.3
CD4 AF700
CD4+
48.5

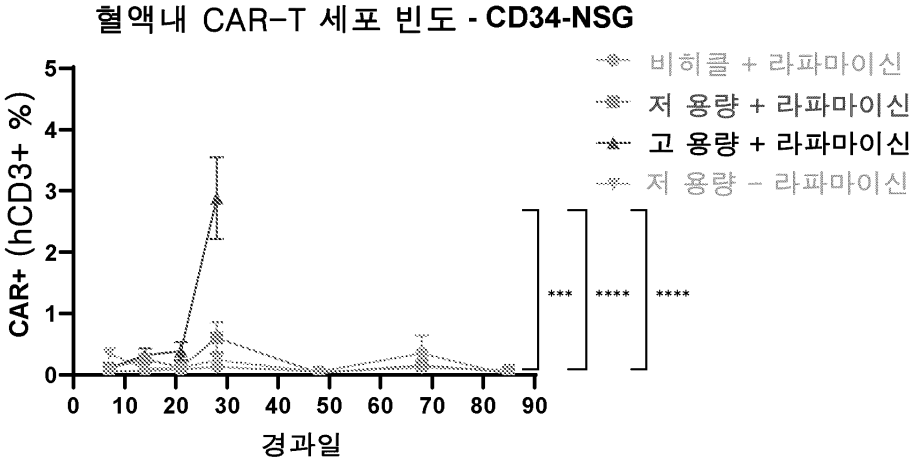
도면44d


CD4 T 세포
CD25+
90.2
SSC
CD25 BV421
Q1
0.33
CAR-T
21.8
Q4
76.4
Q3
1.43
P2A APC
항-CAR 이디오타입 PE
CD8 T 세포
CD25+
92.9
SSC
CD25 BV421
Q1
0.44
CAR-T 9.28
Q4
89.5
Q3
0.74
P2A APC
항-CAR 이디오타입 PE

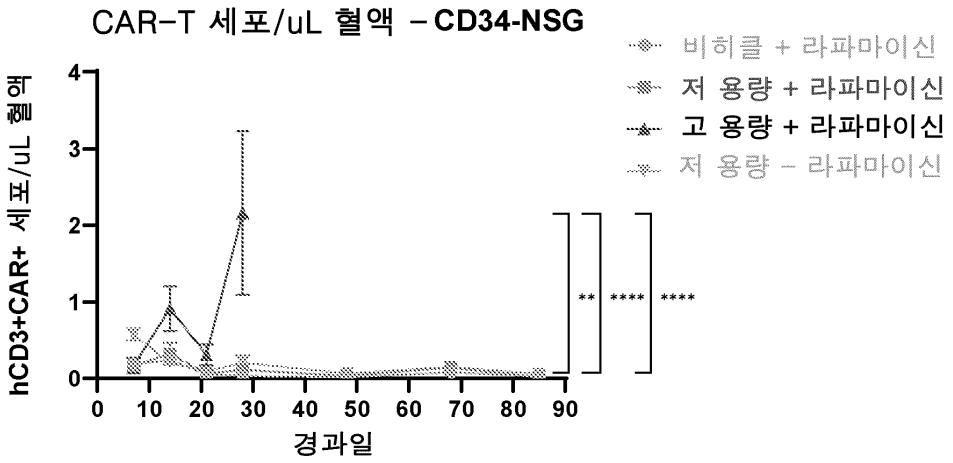
도면45


A
B 세포 수/uL 혈액 – CD34-NSG
hCD20+ 세포/uL 혈액
1000
100
10
1
0
10
20
30
경과일
비히클 + 라파마이신
저 용량 + 라파마이신
고 용량 + 라파마이신
저 용량 – 라파마이신
**
**
**
B
혈액내 B 세포 빈도 – CD34-NSG
hCD20+ (% hCD45+)
80
60
40
20
0
0
10
20
30
경과일
비히클 + 라파마이신
저 용량 + 라파마이신
고 용량 + 라파마이신
저 용량 – 라파마이신
***
****
****
**

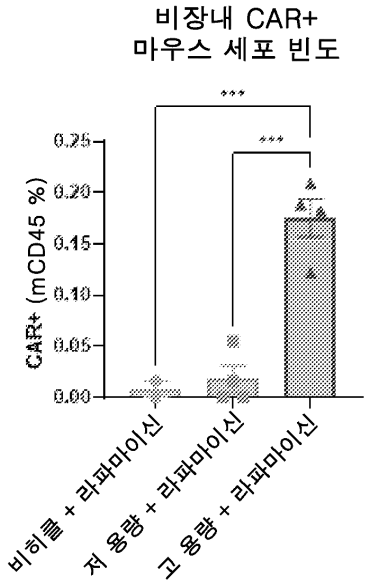
도면46a


혈액내 CAR-T 세포 빈도 - CD34-NSG
CAR+ (hCD3+ %)
5
4
3
2
1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
경과일
비히클 + 라파마이신
저 용량 + 라파마이신
고 용량 + 라파마이신
저 용량 – 라파마이신
***
****
****

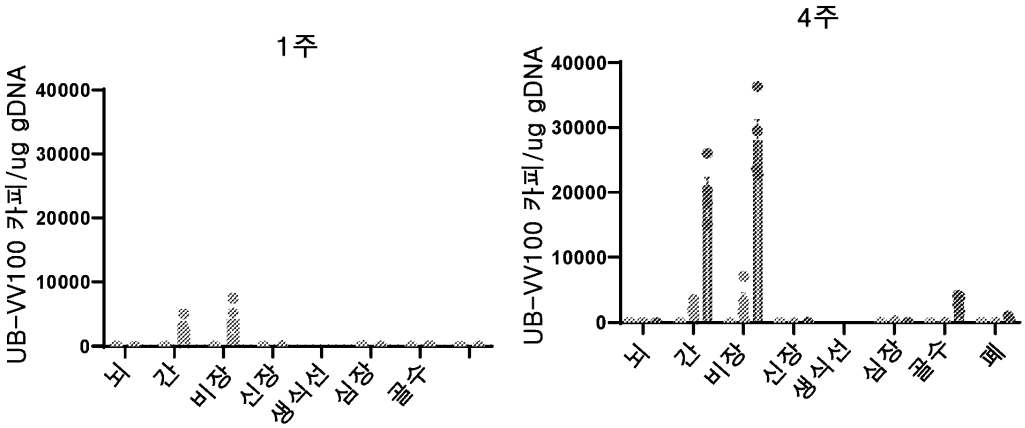
도면46b



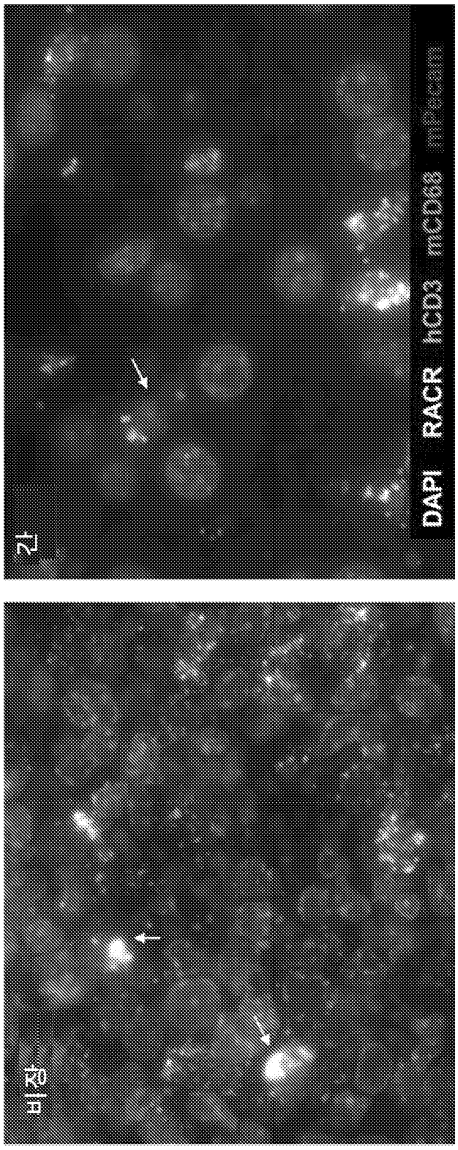
도면46c



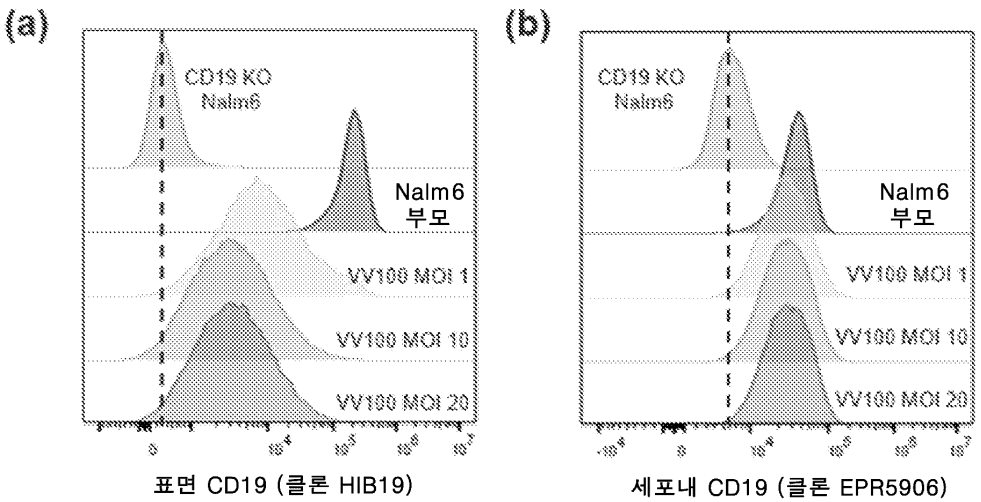
도면46d



도면47



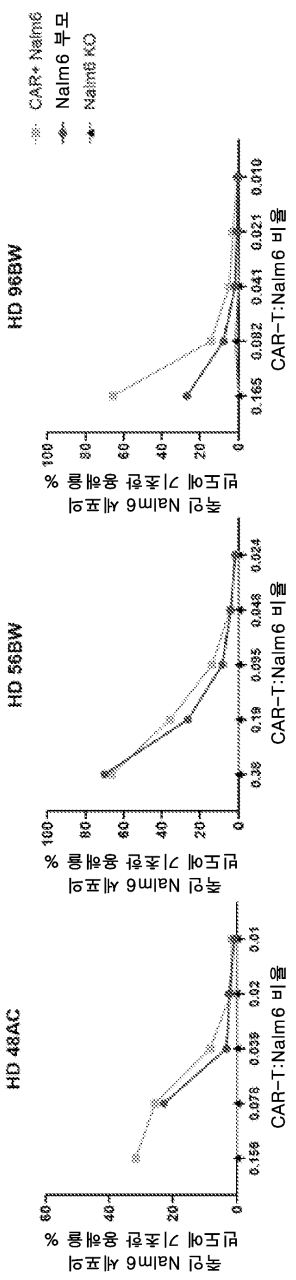
도면48



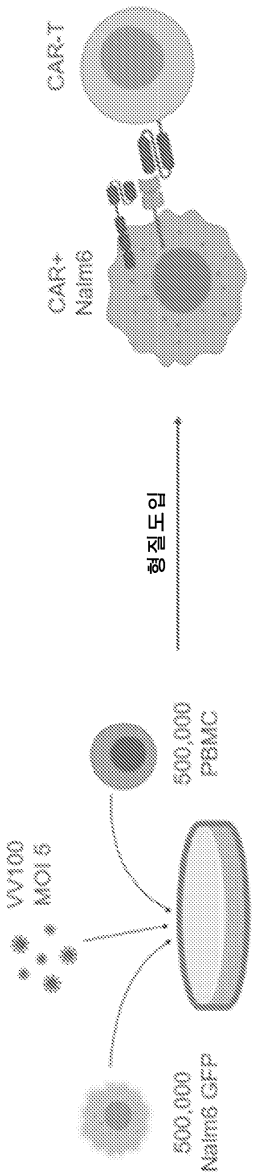
표면 CD19 (클론 HIB19)

세포내 CD19 (클론 EPR5906)

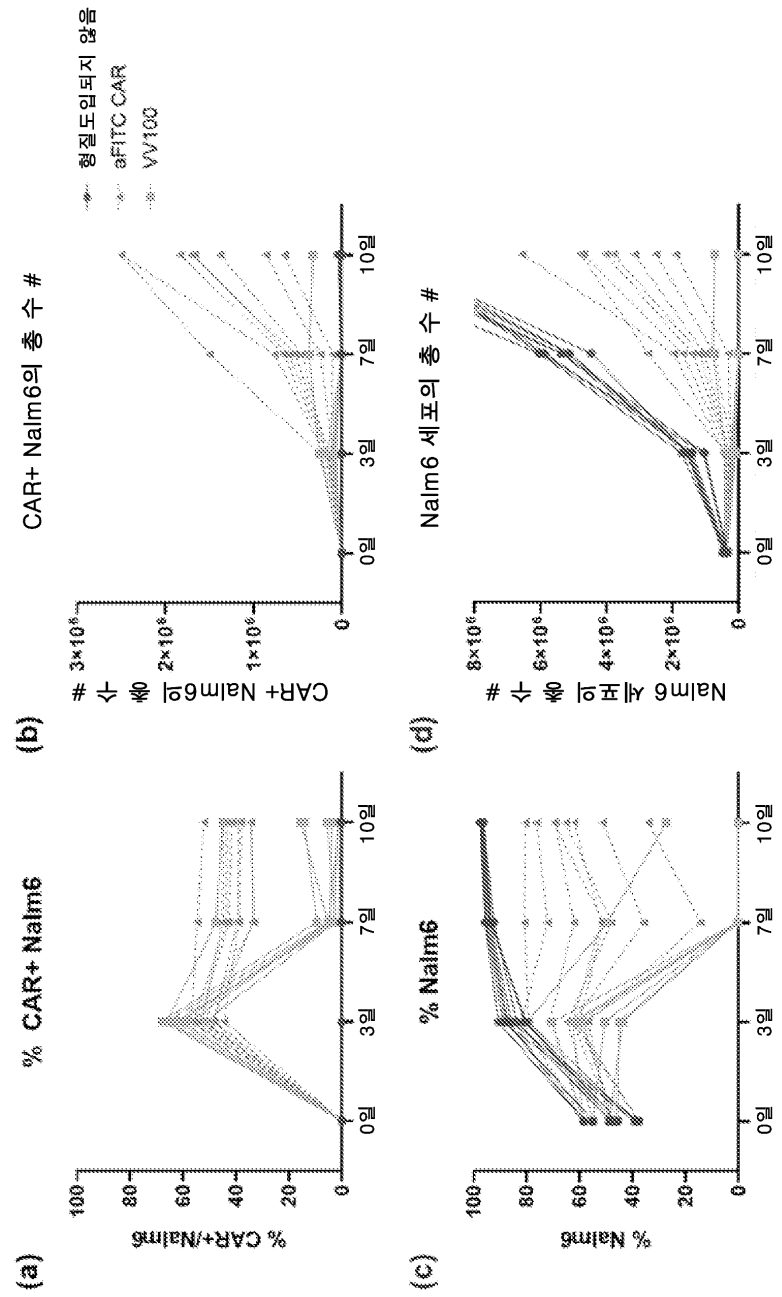
도면49


CAR+ Nalm6
Nalm6 부모
Nalm6 KO
HD 96BW
HD 56BW
HD 48AC
죽인 Nalm6 세포의 백분율 %
CAR-T:Nalm6 비율
0.165
0.082
0.041
0.021
0.010
0.38
0.19
0.095
0.048
0.024
0.156
0.078
0.039
0.02
0.01
0
20
40
60
80
100

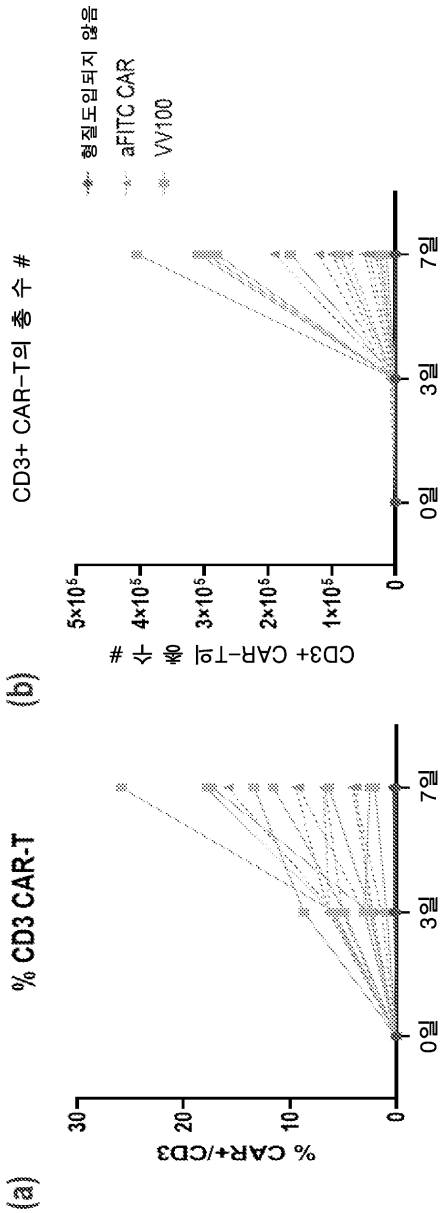
도면50



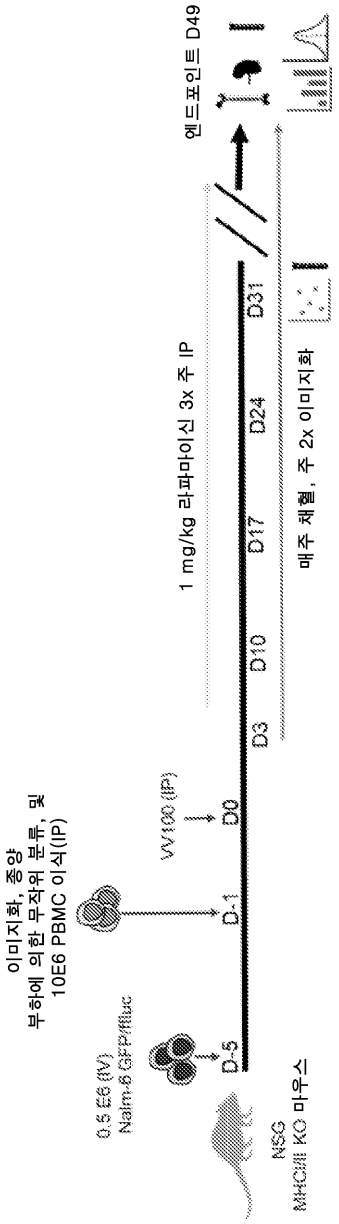
도면51


(a)
% CAR+ Nalm6
% CAR+/Nalm6
0
20
40
60
80
100
0일
3일
7일
10일
(b)
CAR+ Nalm6의 총 수 #
CAR+ Nalm6의 수 #
0
1×10⁸
2×10⁸
3×10⁸
형질도입되지 않음
aFITC CAR
VV100
(c)
% Nalm6
0
20
40
60
80
100
(d)
Nalm6 세포의 총 수 #
Nalm6 세포의 수 #
0
2×10⁸
4×10⁸
6×10⁸
8×10⁸

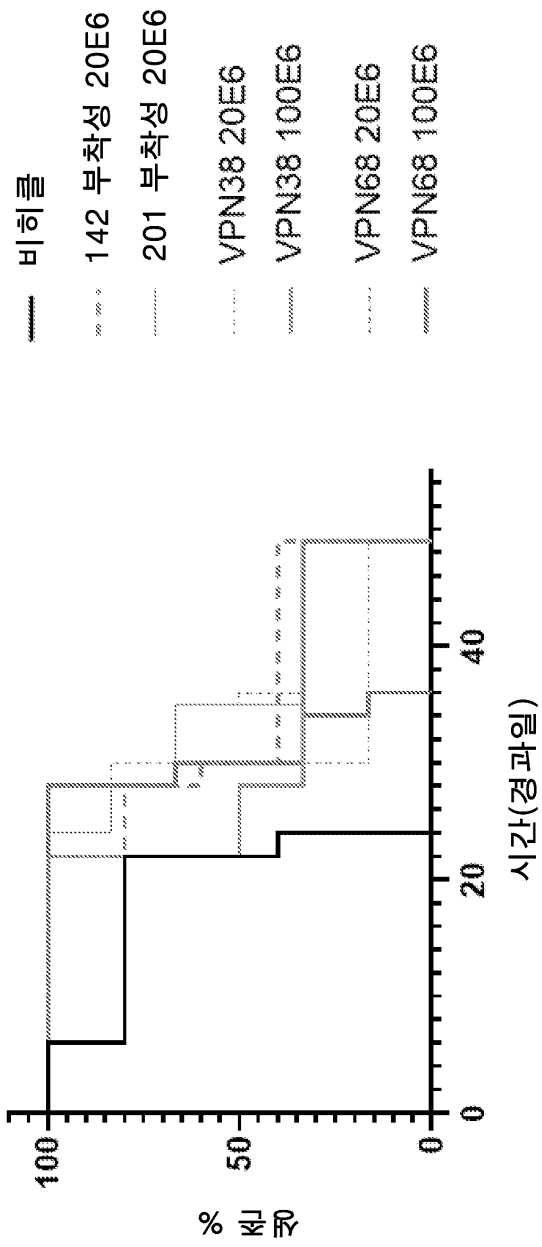
도면52


(a)
% CD3 CAR-T
% CAR+/CD3
30
20
10
0
0일
3일
7일
(b)
CD3+ CAR-T의 총 수 #
CD3+ CAR-T의 수 #
5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
0일
3일
7일
형질도입되지 않음
aFITC CAR
VV100

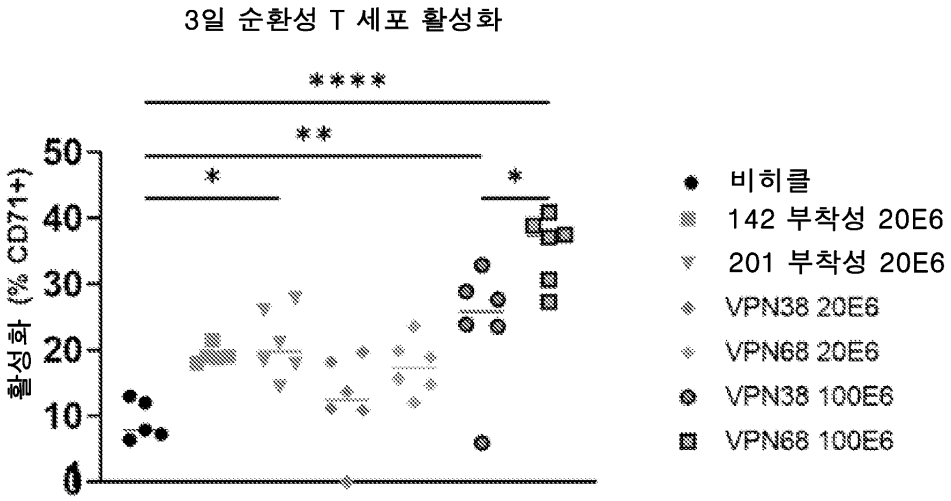
도면53


이미지화, 종양
부하에 의한 무작위 분류, 및
10E6 PBMC 이식(IP)
0.5 E6 (IV)
Nalm-6 GFP/fluc
NSG
MHCI/II KO 마우스
D-5
D-1
D0
VV100 (IP)
D3
D10
D17
D24
D31
1 mg/kg 라파마이신 3x 주 IP
매주 채혈, 주 2x 이미지화
엔드포인트 D49

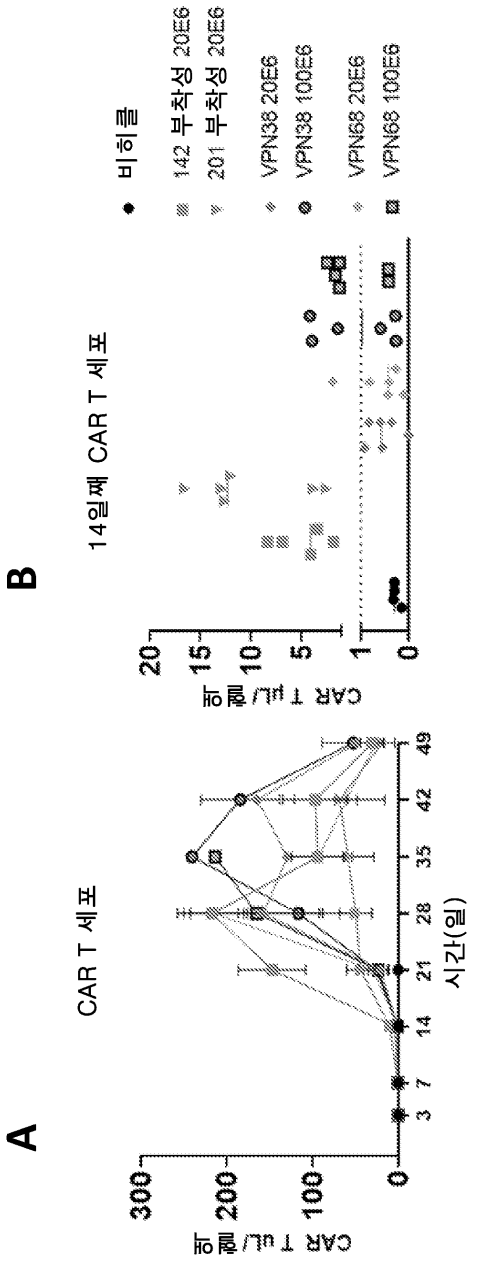
도면54


비히클
142 부착성 20E6
201 부착성 20E6
VPN38 20E6
VPN38 100E6
VPN68 20E6
VPN68 100E6
생존 %
100
50
0
0
20
40
시간(경과일)

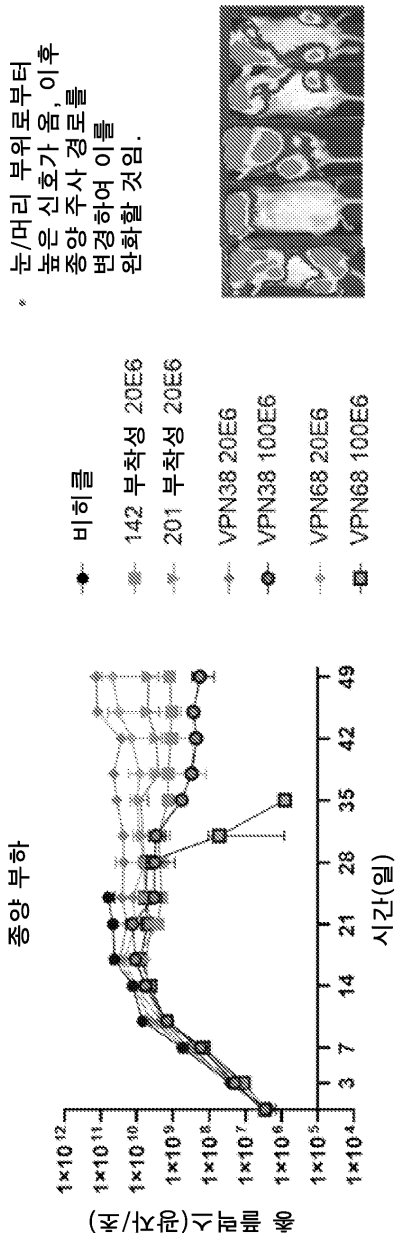
도면55


3일 순환성 T 세포 활성화
****
**
*
*
활성화 (% CD71+)
50
40
30
20
10
0
비히클
142 부착성 20E6
201 부착성 20E6
VPN38 20E6
VPN68 20E6
VPN38 100E6
VPN68 100E6

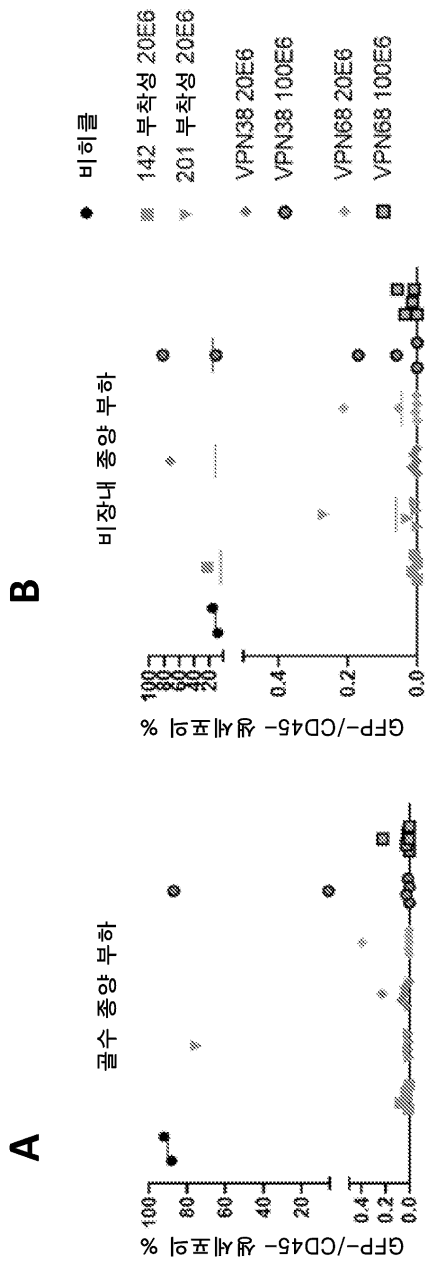
도면56


A
CAR T 세포
CAR T μL/혈액
300
200
100
0
3
7
14
21
28
35
42
49
시간(일)
B
14일째 CAR T 세포
CAR T μL/혈액
20
15
10
5
1
0
비히클
142 부착성 20E6
201 부착성 20E6
VPN38 20E6
VPN38 100E6
VPN68 20E6
VPN68 100E6

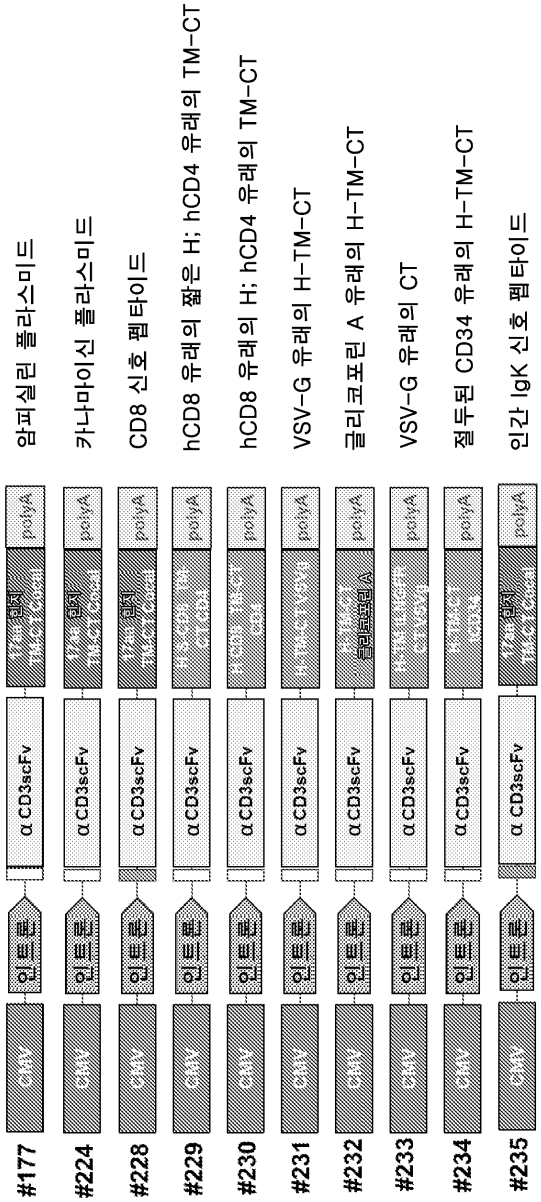
도면57


눈/머리 부위로부터
높은 신호가 옴, 이후
종양 주사 경로를
변경하여 이를
완화할 것임.
종양 부하
바이러스(광자/초)
시간(일)
비히클
142 부착성 20E6
201 부착성 20E6
VPN38 20E6
VPN38 100E6
VPN68 20E6
VPN68 100E6

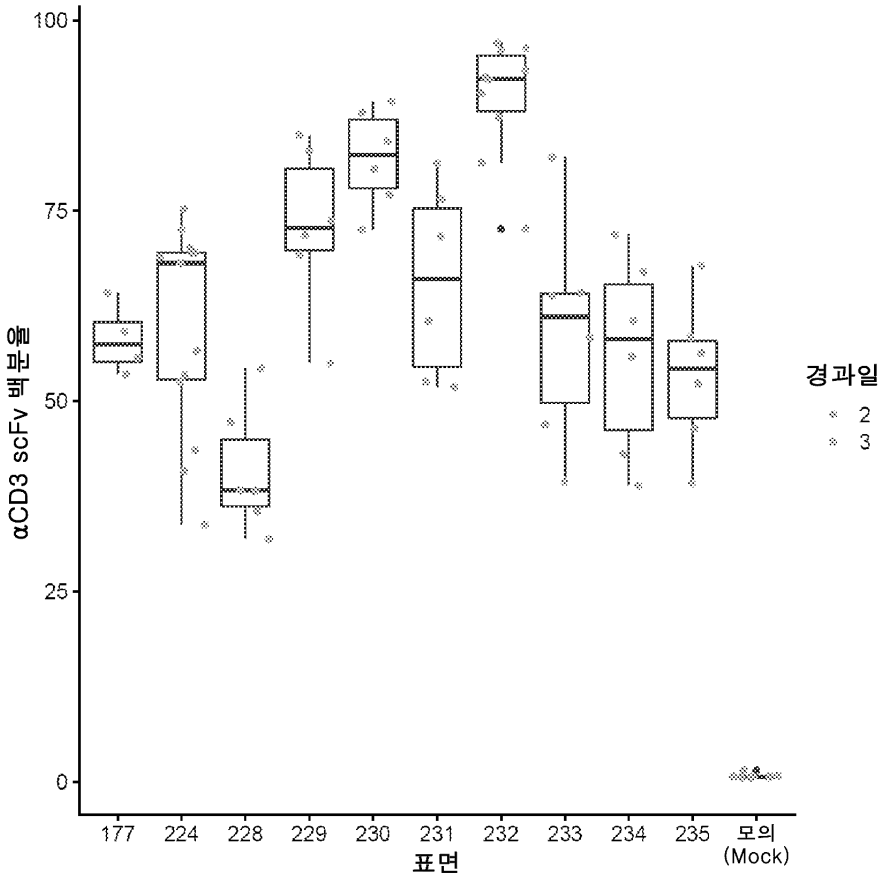
도면58


A
골수 종양 부하
GFP-/CD45- 생세포의 %
100
80
60
40
20
0.4
0.2
0.0
B
비장내 종양 부하
비히클
142 부착성 20E6
201 부착성 20E6
VPN38 20E6
VPN38 100E6
VPN68 20E6
VPN68 100E6

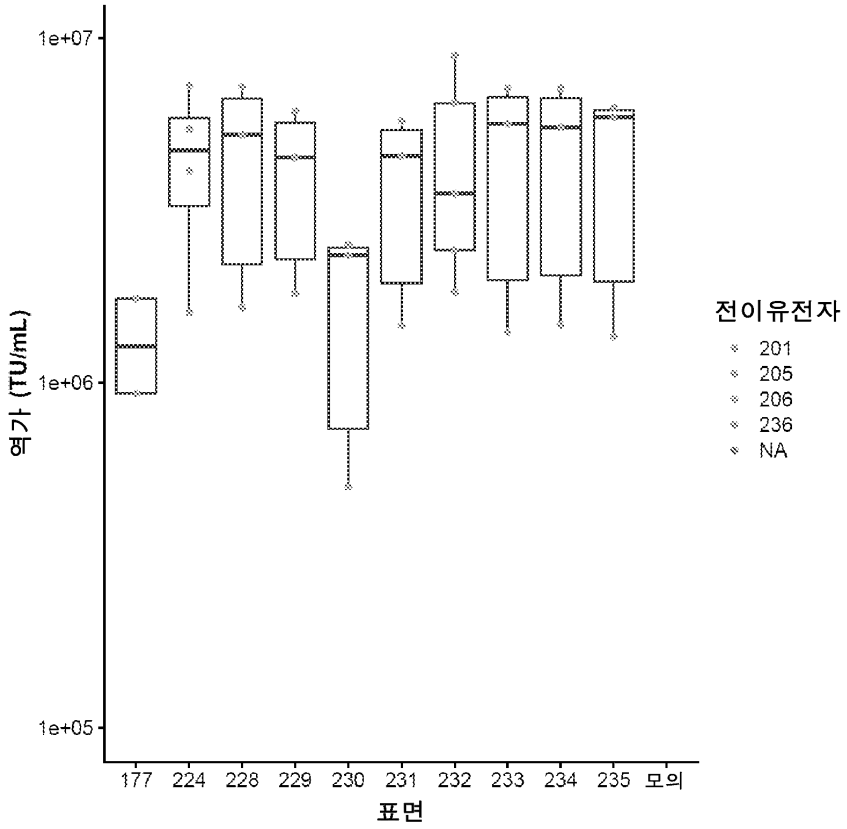
도면59


#177
#224
#228
#229
#230
#231
#232
#233
#234
#235
CMV
인트론
α CD3scFv
polyA
암피실린 플라스미드
카나마이신 플라스미드
CD8 신호 펩타이드
hCD8 유래의 짧은 H; hCD4 유래의 TM-CT
hCD8 유래의 H; hCD4 유래의 TM-CT
VSV-G 유래의 H-TM-CT
글리코포린 A 유래의 H-TM-CT
VSV-G 유래의 CT
절두된 CD34 유래의 H-TM-CT
인간 IgK 신호 펩타이드

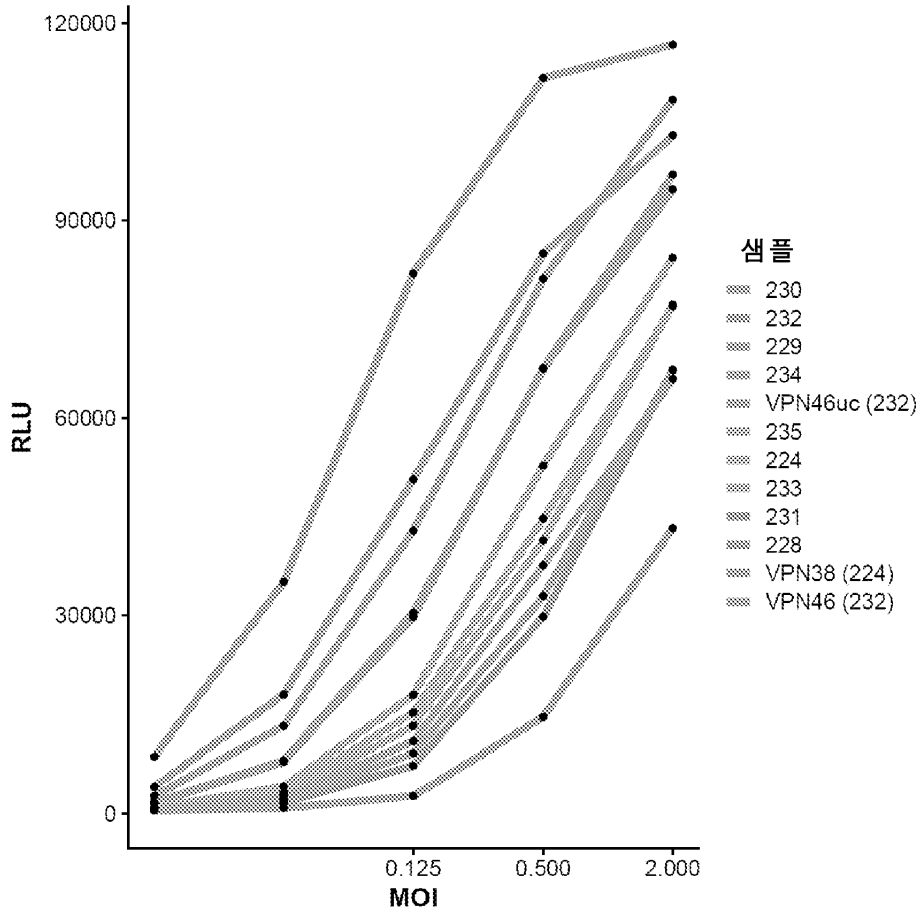
도면60


100
75
50
25
0
αCD3 scFv 백분율
177
224
228
229
230
231
232
233
234
235
모의
(Mock)
표면
경과일
2
3

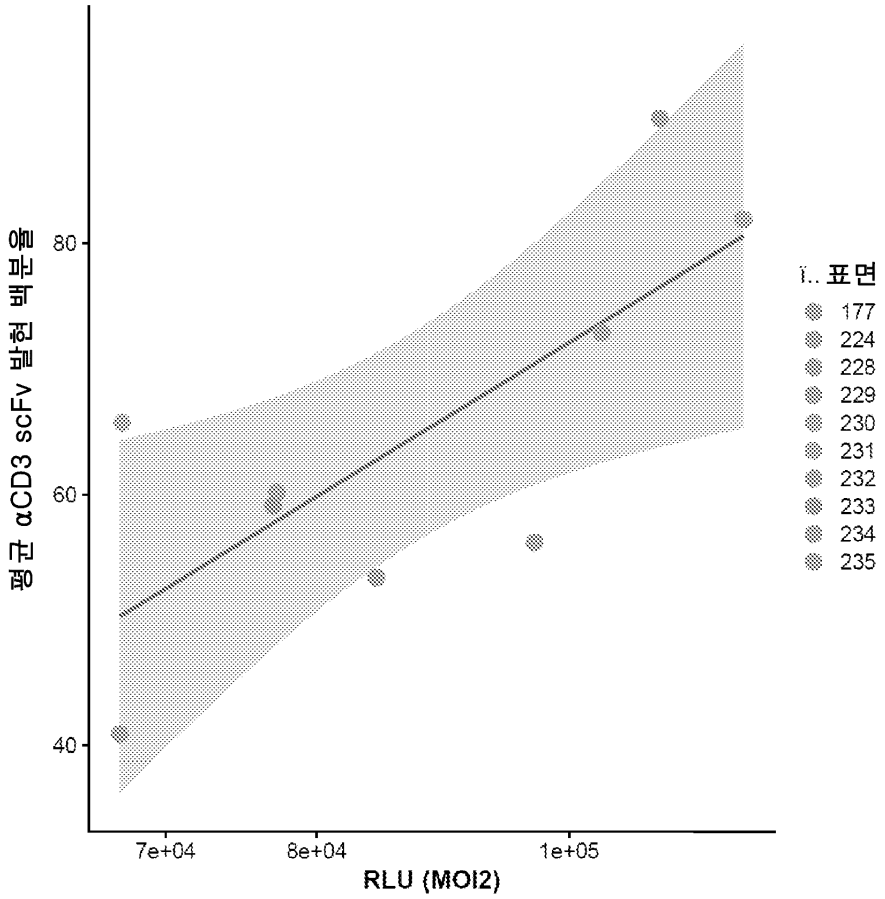
도면61


1e+07
1e+06
1e+05
역가 (TU/mL)
177
224
228
229
230
231
232
233
234
235
모의
표면
전이유전자
201
205
206
236
NA

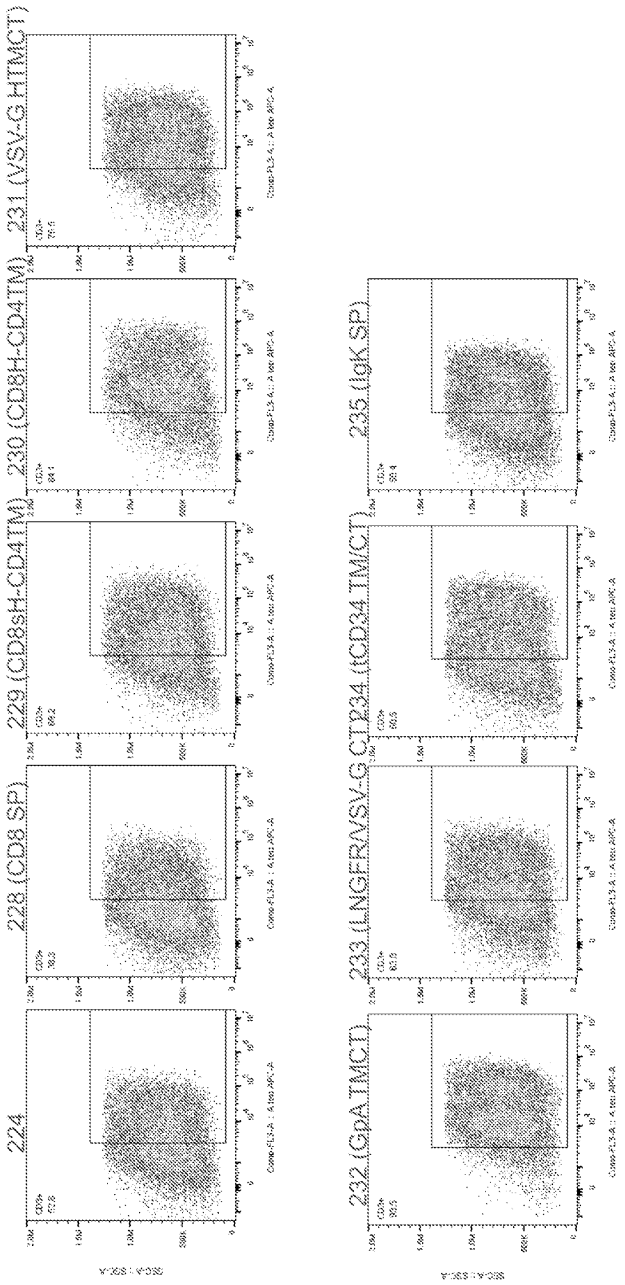
도면62


120000
90000
60000
30000
0
RLU
0.125
0.500
2.000
MOI
샘플
230
232
229
234
VPN46uc (232)
235
224
233
231
228
VPN38 (224)
VPN46 (232)

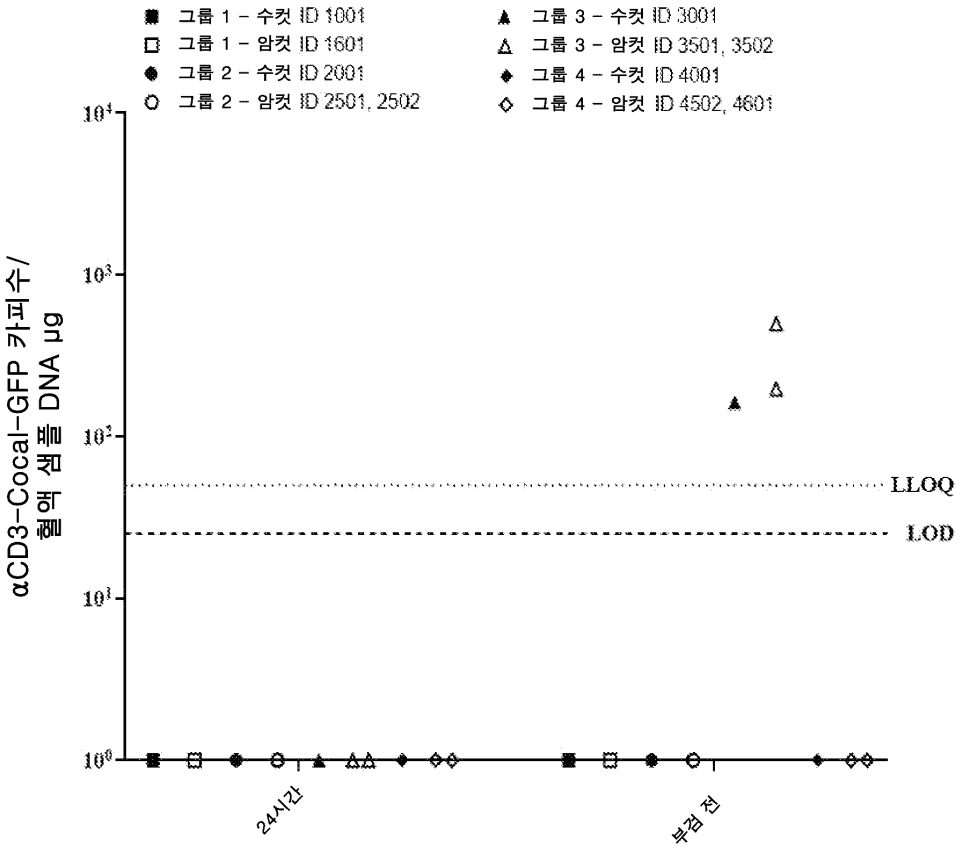
도면63


평균 αCD3 scFv 발현 백분율
80
60
40
7e+04
8e+04
1e+05
RLU (MOI2)
표면
177
224
228
229
230
231
232
233
234
235

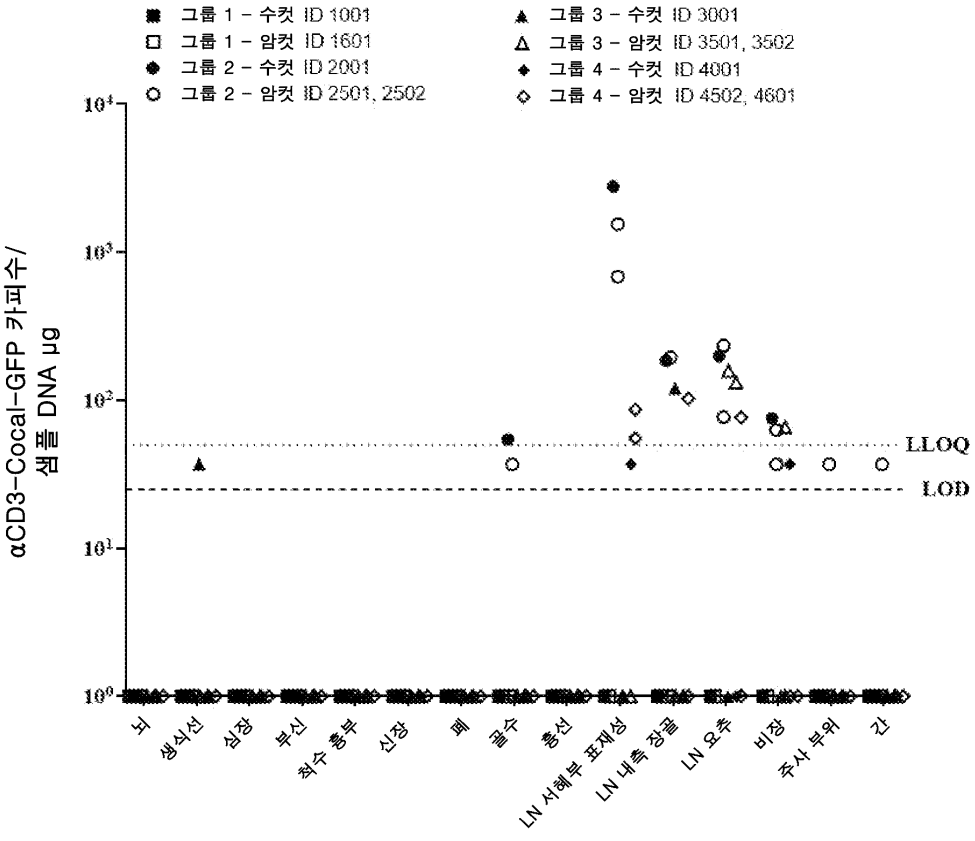
도면64


224
228 (CD8 SP)
229 (CD8sH-CD4TM)
230 (CD8H-CD4TM)
231 (VSV-G HTMCT)
232 (GpA TMCT)
233 (LNGFR/VSV-G CT234 (tCD34 TM/CT)
235 (IgK SP)

도면65


그룹 1 – 수컷 ID 1001
그룹 1 – 암컷 ID 1601
그룹 2 – 수컷 ID 2001
그룹 2 – 암컷 ID 2501, 2502
그룹 3 – 수컷 ID 3001
그룹 3 – 암컷 ID 3501, 3502
그룹 4 – 수컷 ID 4001
그룹 4 – 암컷 ID 4502, 4601
αCD3-Cocal-GFP 카피수/ 혈액 샘플 DNA µg
LLOQ
LOD
24시간
부검 전

도면66


그룹 1 – 수컷 ID 1001
그룹 1 – 암컷 ID 1601
그룹 2 – 수컷 ID 2001
그룹 2 – 암컷 ID 2501, 2502
그룹 3 – 수컷 ID 3001
그룹 3 – 암컷 ID 3501, 3502
그룹 4 – 수컷 ID 4001
그룹 4 – 암컷 ID 4502, 4601
αCD3-Cocal-GFP 카피수/ 샘플 DNA µg
LLOQ
LOD
뇌
생식선
심장
부신
척수 흉부
신장
폐
골수
흉선
LN 서혜부 표재성
LN 내측 장골
LN 오추
비장
주사 부위
간

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Umoja Biopharma, Inc.
Scharenberg, Andrew
Crisman, Ryan
Nicolai, Christopher
Sullivan, Alessandra
Michels, Kathryn
Ryu, Byoung
Green, Shon
Beitz, Laurie
Hernandez Lopez, Susana

<120> LENTIVIRUS FOR GENERATING CELLS EXPRESSING ANTI-CD19 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

<130> UMOJ-024/01WO 337798-2211

<150> 63/142,347

<151> 2021-01-27

<150> 63/185,765

<151> 2021-05-07

<160> 144

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 2

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - anti-CD3 scFv

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
115 120 125

Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
130 135 140

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp
145 150 155 160

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn
165 170 175

Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp
195 200 205

Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr
210 215 220

Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
225 230 235 240
Val Ser Ser Ala Ala Ala Lys Pro
245

<210> 3
<211> 45
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
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 Ser Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Ser Asp
35 40 45

<210> 4
<211> 53
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Made in Lab - CD4 TM, cytoplasmic tail and T2A linker construct
<400> 4
Met Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile
1 5 10 15

Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln
20 25 30
Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
35 40 45
Glu Asn Pro Gly Pro
50

<210> 5
<211> 511
<212> PRT
<213> Cocal virus

<400> 5

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> 6

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding CD8 signal peptide

<400> 6

atggcactgc ctgtgacagc cctgctgctg ccactggccc tgctgctgca cgcagcacgc 60

cca 63

<210> 7

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding anti-cd3 scFv construct

<400> 7

gatatccaga tgacccagtc cccaagctcc ctgagcgcct ccgtgggcga ccgggtgaca 60

atcacctgca gcgcctctag ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gacacctggc 120

aaggccccaa agagatggat ctacgatacc agcaagctgg cctccggcgt gccttctagg 180

ttttctggca gcggctccgg cacagattat acattcacca tctctagcct gcagccagag 240

gacatcgcca cctactattg ccagcagtgg tcctctaatc cctttacatt cggccagggc 300

accaagctgc agatcacaag aacctctgga ggaggaggaa gcggaggagg aggatccggc 360

ggcggcggct ctcaggtgca gctggtgcag agcggaggag gagtggtgca gccaggcaga 420

agcctgaggc tgtcctgtaa ggcctctggc tacacattca ccagatatac aatgcactgg 480

gtgaggcagg caccaggcaa gggactggag tggatcggct acatcaaccc ctccaggggc 540

tacaccaact ataatcagaa ggtgaaggat cggttcacca tcagcaggga caactccaag 600

aataccgcct tcctgcagat ggacagcctg aggccagagg ataccggcgt gtacttttgc 660

gcccggtact atgacgatca ctactgtctg gattattggg gccagggaac accagtgacc 720

gtgagctccg ccgcagcaaa gcct 744

<210> 8

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding cd8 hinge

<400> 8

accacaaccc ctgccccaag gccacctaca cccgccccta ccatcgcctc tcagccactg 60

agcctgaggc cagaggcatc caggcctgcc gcaggggggg ccgtgcacac ccggggcctg 120

gactttgcct ctgat 135

<210> 9

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding cd tm, cytoplasmic tail and T2a linker construct

<400> 9

atggcactga tcgtgctggg aggagtggca ggactgctgc tgttcatcgg actgggcatc 60

ttcttttgcg tgcgctgtag gcaccggaga aggcagggat ctggagaggg aaggggaagc 120

ctgctgacat gcggcgacgt ggaggagaac ccaggacca 159

<210> 10

<211> 1533

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding cocal env

<400> 10

aattttctgc tgctgacctt catcgtgctg cctctgtgca gccacgccaa gttttccatc 60

gtgttcccac agtcccagaa gggcaactgg aagaatgtgc cctctagcta ccactattgc 120

ccttcctcta gcgaccagaa ctggcacaat gatctgctgg gcatcacaat gaaggtgaag 180

atgcccaaga cccacaaggc catccaggca gatggatgga tgtgccacgc agccaagtgg 240

atcacaacct gtgactttcg gtggtacggc cccaagtata tcacacactc catccactct 300

atccagccta cctccgagca gtgcaaggag tctatcaagc agacaaagca gggcacctgg 360

atgagccctg gcttcccacc ccagaactgt ggctacgcca cagtgaccga ctccgtggca 420

gtggtggtgc aggcaacacc tcaccacgtg ctggtggatg agtataccgg cgagtggatc 480

gacagccagt ttccaaacgg caagtgcgag acagaggagt gtgagaccgt gcacaattct 540

acagtgtggt acagcgatta taaggtgaca ggcctgtgcg acgccaccct ggtggataca 600

gagatcacct tcttttctga ggacggcaag aaggagagca tcggcaagcc caacaccggc 660

tacagatcca attacttcgc ctatgagaag ggcgataagg tgtgcaagat gaattattgt 720

aagcacgccg gggtgcggct gcctagcggc gtgtggtttg agttcgtgga ccaggacgtg 780

tacgcagcag caaagctgcc tgagtgccca gtgggagcaa ccatctccgc cccaacacag 840

acctccgtgg acgtgtctct gatcctggat gtggagcgca tcctggacta cagcctgtgc 900

caggagacct ggagcaagat ccggtccaag cagcccgtgt cccctgtgga cctgtcttac 960

ctggcaccaa agaacccagg aaccggacca gcctttacaa tcatcaatgg caccctgaag 1020

tacttcgaga cccgctatat ccggatcgac atcgataacc ctatcatcag caagatggtg 1080

ggcaagatct ctggcagcca gacagagaga gagctgtgga ccgagtggtt cccttacgag 1140

ggcgtggaga tcggcccaaa tggcatcctg aagacaccaa ccggctataa gtttcccctg 1200

ttcatgatcg gccacggcat gctggacagc gatctgcaca agacctccca ggccgaggtg 1260

tttgagcacc cacacctggc agaggcacca aagcagctgc ctgaggagga gacactgttc 1320

tttggcgata ccggcatctc taagaacccc gtggagctga tcgagggctg gttttcctct 1380

tggaagagca cagtggtgac cttctttttc gccatcggcg tgttcatcct gctgtacgtg 1440

gtggccagaa tcgtgatcgc cgtgagatac aggtatcagg gctccaacaa taagaggatc 1500

tataatgaca tcgagatgtc tcgcttccgg aag 1533

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Gaussia species luciferase

<400> 11

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

Ala

<210> 12

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - anti-cd3 scFv construct

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

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

85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu
115 120 125
Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu
130 135 140
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp

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

210 215 220
Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Ala Ser

245

<210> 13

<211> 62

<212> PRT

<213> Cocal virus

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

<210> 14

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding a Gaussia species luciferase signal peptide

<400> 14

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc c 51

<210

> 15

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding anti-cd3 scFv construct

<400> 15

gacatccaga tgacccagtc tcctagcagc ctcagcgcta gcgtgggcga tagagtgacc 60

atcacatgta gcgccagcag cagcgtgtcc tacatgaact ggtaccagca aacacctgga 120

aaggccccta aaaggtggat ctatgacaca tctaagctgg cttctggagt gccatctaga 180

ttttctggca gcggctccgg cactgattat acattcacca tcagcagcct gcagcccgag 240

gatatcgcca cctactactg tcagcagtgg tcctctaatc ccttcacctt cggccagggc 300

accaagctgc agatcaccag aaccagcggc gggggaggaa gcggcggggg aggatctggc 360

ggcggcggca gccaggtgca gctggtgcag agcggcggcg gcgtggtgca acctggcaga 420

agcctgagac tgagctgcaa ggcctctggc tacaccttca cccggtacac catgcattgg 480

gtgcggcagg cccctggcaa gggcctggaa tggattggat acatcaaccc cagcagaggc 540

tacaccaact acaaccagaa ggtgaaggac agattcacaa tttctcggga caacagcaag 600

aataccgcct tcctgcaaat ggactccctg cgcccagaag ataccggcgt gtacttctgc 660

gctagatatt acgacgacca ctactgcctg gactactggg gccagggcac ccctgtgacc 720

gtgtccagcg cctcc 735

<210> 16

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding short hinge-TM-CT from Cocal Env

<400> 16

ggagtggaac tgatcgaggg ctggttcagc agctggaaaa gcaccgtggt tacattcttt 60

ttcgccatcg gcgtgttcat cctgctgtac gtggtcgcca gaattgtgat cgccgtgcgg 120

tatagatacc agggcagcaa caacaagcgg atctacaacg acatcgagat gagcagattc 180

agaaag 186

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - anti-cd3 scFv construct

<400> 18

000

<210> 19

<211> 93

<212> PRT

<213> Cocal virus

<400> 19

Ser Gly Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys Gln Leu Pro
1 5 10 15

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

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

35 40 45

Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr Val Val Ala
50 55 60

Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser Asn Asn Lys
65 70 75 80

Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys
85 90

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<211> 0

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Polynucleotide encoding anti-cd3 scFv construct

<400> 21

000

<210> 22

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding long hinge-TM-CT from Cocal
Env

<400> 22

tccggattcg agcaccccca cctggccgag gcccctaagc agctgcctga agaagagaca 60

ctgtttttcg gagataccgg catcagcaaa aaccccgtgg agctgatcga gggctggttc 120

agctcttgga agagcaccgt ggtcacattc tttttcgcca tcggcgtctt tatcctgctg 180

tacgtggtag ccagaatcgt gatcgccgtg cggtacagat accagggcag caacaacaag 240

cggatctaca acgacatcga gatgagccgg ttcagaaag 279

<210> 23

<400> 23

000

<210> 24

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Anti-CD3 scFv construct

<400> 24

000

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - human Glycophorin A ecto-TM_HIV Env CT construct

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Thr Lys Gly Pro Glu Ile Thr Leu Ile Ile Phe Gly Val Met Ala

20 25 30

Gly Val Ile Gly Thr Ile Leu Leu Ile Ser Tyr Gly Ile Arg Arg Leu

35 40 45

Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu

50 55 60

Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala

65 70 75 80

Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala

85 90 95

Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu

100 105 110

Leu

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<211> 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding anti-cd3 scFv

<400> 27

000

<210> 28

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding human Glycophorin A ecto-TM_HIV Env CT construct

<400> 28

tccggaggat ctacaagcgg ctctggcaag cctggcagcg gagaaggcag caccaagggc 60

cctgagatca cactgatcat cttcggcgtg atggccggcg tcatcggcac catcctgctg 120

atcagctacg gcatcagaag actggctctg aagtactggt ggaatctgct gcaatactgg 180

agccaggagc tgaaaaacag cgccgtgtcc ctgctcaacg ccaccgccat cgccgtggcc 240

gagggcaccg acagagtgat cgaggtggtg cagggagcct gcagagctat tcggcacatc 300

cccagacgga tcaggcaggg cctggaaaga atcctgctg 339

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - anti-cd3 scFv construct

<400> 30

000

<210> 31

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 218 linker_HIV Env-TM-CT construct

<400> 31

Ser Gly Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
1 5 10 15

Ser Thr Lys Gly Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Ile Phe Ile Ile Ile
20 25 30

Val Gly Ser Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
35 40 45

Val Asn Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln
50 55 60

Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala
65 70 75 80

Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val
85 90 95

Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln
100 105 110

Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
115

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<211> 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding anti-cd3 scFv construct

<400> 33

000

<210> 34

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding 218 linker_HIV Env-TM-CT construct

<400> 34

tccggaggaa gcaccagcgg ctctggcaag cctggcagcg gcgagggctc taccaagggc 60

aattggctgt ggtacatcag aatcttcatc atcatcgtgg gcagcctgat cggcctgaga 120

atcgtgttcg ccgtgctgag cctggtgaac cggggctggg aagctctgaa gtactggtgg 180

aacctgctgc aatactggtc ccaggagctg aaaaacagcg ctgtgtccct gctcaacgcc 240

accgccatcg ccgtcgccga gggaacagac agagtgatcg aggtggtgca gggagcctgc 300

agagccattc ggcacatccc cagacgcatc agacagggcc tggaaagaat cctgctg 357

<210> 35

<211> 353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic MND promoter

<400> 35

gaacagagaa acaggagaat atgggccaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc 60

cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt 120

aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccgccc 180

tcagcagttt ctagagaacc atcagatgtt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc 240

ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc 300

tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgct agc 353

<210> 36

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - anti-cd3 scFv construct

<400> 36

000

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - G4Sx3 linker_HIV Env-TM-CT construct

<400> 37

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Arg Ile Phe Ile Ile Ile Val Gly Ser Leu Ile Gly Leu

20 25 30

Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu Val Asn Arg Gly Trp Glu Ala
35 40 45

Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys
50 55 60

Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu
65 70 75 80

Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile

85 90 95

Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
100 105 110

<210> 38

<400> 38

000

<210> 39

<211> 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynulceotide encoding anti-cd3 scFv construct

<400> 39

000

<210> 40

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding G4Sx3 linker_HIV Env-TM-CT

construct

<400> 40

tccggaggcg gtggaggctc tggtggcgga gggagcggtg gcggaggcag ctacatcaga 60

atcttcatca tcatcgtggg cagcctgatc ggcctgagaa tcgtgttcgc cgttctgagc 120

ctggtgaacc ggggctggga agccctgaag tactggtgga atctgctcca gtactggtct 180

caggagctga agaacagcgc cgtgtccctg ctgaacgcta cagctatcgc cgtcgccgag 240

ggcaccgaca gagtgatcga ggtggtgcag ggcgcctgca gagccatccg gcacatccct 300

agaaggattc ggcaaggcct ggaaagaatc ctgctg 336

<210> 41

<400> 41

000

<210> 42

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - anti-cd3 scFv construct

<400> 42

000

<210> 43

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Short hinge-TM-CT from Cocal Env_T2A construct

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

<210> 44
<211> 0
<212> PRT
<213> Cocal virus
<400> 44
000
<210> 45

<400> 45
000
<210> 46
<211> 0
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding anti-cd3 scFv construct
<400> 46
000
<210> 47
<211> 249
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding Short hinge-TM-CT from
Cocal Env_T2A construct
<400> 47
ggagtggaac tgatcgaggg ctggttcagc agctggaaaa gcaccgtggt tacattcttt 60

ttcgccatcg gcgtgttcat cctgctgtac gtggtcgcca gaattgtgat cgccgtgcgg 120

tatagatacc agggcagcaa caacaagcgg atctacaacg acatcgagat gagcagattc 180

agaaagggat ctggagaggg aaggggaagc ctgctgacat gcggcgacgt ggaggagaac 240

ccaggacca 249

<210> 48

<211> 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding Cocal Env

<400> 48

000

<210> 49

<211> 1296

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - CD19 CAR_FRB_RACR lentiviral vector construct

<400> 49

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

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

115 120 125

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

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

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

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
325 330 335
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
340 345 350
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
355 360 365

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
370 375 380

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
385 390 395 400
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
405 410 415
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
420 425 430
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
435 440 445

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly
450 455 460
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
465 470 475 480
Pro Gly Pro Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu
485 490 495
Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro
500 505 510

Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser
515 520 525
Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys
530 535 540
Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp
545 550 555 560
Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gly Ser Gly Ala
565 570 575

Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
580 585 590
Gly Pro Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly
595 600 605
Ala Leu His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

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

785 790 795 800

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

805 810 815

Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro

820 825 830

Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr Gly Ser Gly

835 840 845

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

850 855 860

Pro Gly Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala
865 870 875 880
Leu Leu Leu His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His
885 890 895

Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val
900 905 910
Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg
915 920 925
Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg
930 935 940
Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly
945 950 955 960

Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe
965 970 975
Arg Arg Ile Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu
980 985 990
Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu
995 1000 1005
Leu Ile Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu
1010 1015 1020

Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser
1025 1030 1035
Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe
1040 1045 1050
Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser
1055 1060 1065
Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu
1070 1075 1080

Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His
1085 1090 1095
Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His

1100 1105 1110

Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr Phe Thr

1115 1120 1125

Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala Gly

1130 1135 1140

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

1145 1150 1155

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

1160 1165 1170

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

1175 1180 1185

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

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

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

1265 1270 1275

Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr

1280 1285 1290

His Leu Val

1295

<210> 50

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 51
<211> 245
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Made in Lab - VL-linker-VH construct
<400> 51
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

165 170 175

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

Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 52
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Made in Lab - IgG4 linker-CD28 TM construct
<400> 52
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val
1 5 10 15
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
20 25 30
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
35 40

<210> 53
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 53
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2A synthetic construct

<400> 55

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 56

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala
20 25 30

Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln
35 40 45

Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr
50 55 60

Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr
65 70 75 80

Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys
85

<210> 57

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide-FKBP12 synthetic construct

<400> 57

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
115 120 125

<210> 58
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-2R gamma TM-Cytoplasmic domain synthetic construct
<400> 58
Gly Glu Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu
1 5 10 15
Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu
20 25 30
Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr
35 40 45

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

Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
115 120 125
<210> 59
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide-FRB synthetic construct

<400> 59

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

<210> 60

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro Ala Ser

100 105 110

Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr

115 120 125

Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

305 310 315

<210> 61

<211> 3891

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide encoding CD19 CAR_FRB_RACR lentiviral vector construct

<400> 61

atgctgctgc tggtgacctc cctgctgctg tgcgagctgc ctcacccagc ctttctgctg 60

atccccgaca tccagatgac acagaccaca agctccctgt ctgccagcct gggcgacaga 120

gtgaccatct cctgtagggc ctctcaggat atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagccagatg gcacagtgaa gctgctgatc taccacacct ccaggctgca ctctggagtg 240

ccaagccggt tctccggatc tggaagcggc accgactatt ccctgacaat ctctaacctg 300

gagcaggagg atatcgccac atacttttgc cagcagggca ataccctgcc atatacattc 360

ggcggaggaa ccaagctgga gatcaccgga tccacatctg gaagcggcaa gccaggaagc 420

ggagagggat ccacaaaggg agaggtgaag ctgcaggaga gcggaccagg actggtggca 480

ccatcccagt ctctgagcgt gacctgtaca gtgtccggcg tgtctctgcc tgactacggc 540

gtgtcctgga tcaggcagcc acctaggaag ggactggagt ggctgggcgt gatctggggc 600

tctgagacca catactataa ttctgccctg aagagccgcc tgaccatcat caaggacaac 660

tccaagtctc aggtgtttct gaagatgaat agcctgcaga ccgacgatac agccatctac 720

tattgcgcca agcactacta ttacggcggc tcctacgcca tggattattg gggccagggc 780

acctccgtga cagtgtctag cgagtctaag tatggcccac cctgccctcc atgtccaatg 840

ttctgggtgc tggtggtggt gggaggcgtg ctggcctgtt actccctgct ggtgaccgtg 900

gcctttatca tcttctgggt gaagagaggc aggaagaagc tgctgtatat ctttaagcag 960

cccttcatgc gccctgtgca gaccacacag gaggaggacg gctgcagctg tcggtttcca 1020

gaggaggagg agggaggatg cgagctgcgc gtgaagttca gccggtccgc cgatgccccc 1080

gcctaccagc agggccagaa ccagctgtat aacgagctga atctgggccg gagagaggag 1140

tacgacgtgc tggataagag gaggggaagg gacccagaga tgggaggcaa gcctcggaga 1200

aagaacccac aggagggcct gtacaatgag ctgcagaagg acaagatggc cgaggcctat 1260

tctgagatcg gcatgaaggg agagaggcgc cggggcaagg gacacgatgg cctgtaccag 1320

ggcctgagca ccgccacaaa ggacacatat gatgccctgc acatgcaggc cctgccacct 1380

aggggatctg gagccaccaa ctttagcctg ctgaagcagg caggcgatgt ggaggagaat 1440

ccaggacctg agatgtggca cgagggactg gaggaggcaa gcaggctgta ctttggcgag 1500

cggaatgtga agggcatgtt cgaggtgctg gagccactgc acgcaatgat ggagagggga 1560
ccacagaccc tgaaggagac atccttcaac caggcatacg gaagggacct gatggaggca 1620
caggagtggt gccggaagta tatgaagtct ggcaatgtga aggacctgct gcaggcctgg 1680
gatctgtatt accacgtgtt tagaaggatc agcaagggct ccggcgccac caacttctcc 1740
ctgctgaagc aggccggcga tgtggaagaa aatccaggac caatgcctct gggactgctg 1800
tggctgggac tggccctgct gggcgccctg cacgcccagg ccggcgtgca ggtggagaca 1860
atcagccctg gcgacggcag aacctttcca aagaggggcc agacatgcgt ggtgcactac 1920

accggcatgc tggaggatgg caagaagttc gactcctctc gcgatcggaa caagcccttt 1980
aagttcatgc tgggcaagca ggaagtgatc agaggctggg aggagggcgt ggcccagatg 2040
tctgtgggcc agagggccaa gctgacaatc agcccagact atgcatacgg agcaaccgga 2100
caccctggaa tcatcccacc acacgccaca ctggtgttcg atgtggagct gctgaagctg 2160
ggcgagggct ctaacaccag caaggagaat ccatttctgt tcgcactgga ggcagtggtc 2220
atctccgtgg gctctatggg cctgatcatc tccctgctgt gcgtgtactt ttggctggag 2280
agaacaatgc caaggatccc caccctgaag aacctggagg acctggtgac cgagtaccac 2340

ggcaatttca gcgcctggtc cggcgtgtct aagggactgg cagagtccct gcagccagat 2400
tattctgagc ggctgtgcct ggtgagcgag atccctccaa agggaggcgc cctgggagag 2460
ggaccaggag ccagcccctg caaccagcac tccccttact gggccccccc ttgttatacc 2520
ctgaagccag agacaggctc tggcgccacc aacttcagcc tgctgaagca agccggcgac 2580
gtggaagaaa acccaggacc aatggcactg ccagtgaccg ccctgctgct gcctctggcc 2640
ctgctgctgc acgcagccag acccatcctg tggcacgaaa tgtggcatga aggcctggag 2700
gaggcaagca gactgtactt tggcgagaga aatgtgaaag gaatgtttga ggtgctggag 2760

cctctgcacg ccatgatgga gaggggccct cagaccctga aggagacatc ctttaaccag 2820
gcctacggca gagacctgat ggaggcccag gagtggtgca ggaagtatat gaagagcgga 2880
aatgtgaaag acctgctgca ggcctgggat ctgtactacc acgtgttccg ccggatctct 2940
aagggcaagg atacaatccc ttggctggga cacctgctgg tgggactgag cggagccttt 3000
ggcttcatca tcctggtgta tctgctgatc aactgcagaa atacaggccc atggctgaag 3060
aaggtgctga agtgtaacac ccctgaccca tccaagttct tttctcagct gagctccgag 3120
cacggcggcg atgtgcagaa gtggctgtct agccccctttc cttcctctag cttcagccct 3180

ggaggactgg cacctgagat ctccccactg gaggtgctgg agagggacaa ggtgacccag 3240

ctgctgctgc agcaggataa ggtgccagag cccgcctccc tgtcctctaa ccacagcctg 3300

acctcctgct ttacaaatca gggctacttc ttttttccacc tgccagacgc actggagatc 3360

gaggcatgtc aggtgtattt cacatacgat ccctatagcg aggaggaccc tgatgaggga 3420

gtggccggcg ccccaaccgg aagctcccct cagccactgc agccactgag cggagaggac 3480

gatgcatatt gtacatttcc ttcccgcgac gatctgctgc tgttctctcc aagcctgctg 3540

ggaggaccat ctccacccag caccgcacct ggaggatccg gggcagggga ggagcggatg 3600

cctccatctc tgcaggagag agtgccaagg gactgggatc cacagcctct gggaccacct 3660

acccctggag tgccagacct ggtggatttc cagccacccc ctgagctggt gctgcgggag 3720

gcaggagagg aggtgccaga cgcaggacct agagagggcg tgagctttcc ctggtccagg 3780

ccaccaggac agggagagtt ccgcgccctg aacgcccggc tgcccctgaa tacagacgcc 3840

tacctgtctc tgcaggagct gcagggccag gatcctaccc acctggtgtg a 3891

<210> 62

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding signal peptide (human CSF2r)

<400> 62

atgctgctgc tggtgacctc cctgctgctg tgcgagctgc ctcacccagc ctttctgctg 60

atcccc 66

<210> 63

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding CD19 scFv (VL-linker-VH)

<400> 63

gacatccaga tgacacagac cacaagctcc ctgtctgcca gcctgggcga cagagtgacc 60

atctcctgta gggcctctca ggatatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagcca 120

gatggcacag tgaagctgct gatctaccac acctccaggc tgcactctgg agtgccaagc 180

cggttctccg gatctggaag cggcaccgac tattccctga caatctctaa cctggagcag 240

gaggatatcg ccacatactt ttgccagcag ggcaataccc tgccatatac attcggcgga 300

ggaaccaagc tggagatcac cggatccaca tctggaagcg gcaagccagg aagcggagag 360

ggatccacaa agggagaggt gaagctgcag gagagcggac caggactggt ggcaccatcc 420

cagtctctga gcgtgacctg tacagtgtcc ggcgtgtctc tgcctgacta cggcgtgtcc 480

tggatcaggc agccacctag gaagggactg gagtggctgg gcgtgatctg gggctctgag 540

accacatact ataattctgc cctgaagagc cgcctgacca tcatcaagga caactccaag 600

tctcaggtgt ttctgaagat gaatagcctg cagaccgacg atacagccat ctactattgc 660

gccaagcact actattacgg cggctcctac gccatggatt attggggcca gggcacctcc 720

gtgacagtgt ctagc 735

<210> 64

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding IgG4 linker-CD28 TM part of vector construct

<400> 64

gagtctaagt atggcccacc ctgccctcca tgtccaatgt tctgggtgct ggtggtggtg 60

ggaggcgtgc tggcctgtta ctccctgctg gtgaccgtgg cctttatcat cttctgggtg 120

<210> 65

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding "4-1BB signal domain part of vector construct

<400> 65

aagagaggca ggaagaagct gctgtatatc tttaagcagc ccttcatgcg ccctgtgcag 60

accacacagg aggaggacgg ctgcagctgt cggtttccag aggaggagga gggaggatgc 120

gagctg 126

<210> 66

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding CD3zeta part of vector

construct

<400> 66

cgcgtgaagt tcagccggtc cgccgatgcc cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg 60

tataacgagc tgaatctggg ccggagagag gagtacgacg tgctggataa gaggagggga 120

agggacccag agatgggagg caagcctcgg agaaagaacc cacaggaggg cctgtacaat 180

gagctgcaga aggacaagat ggccgaggcc tattctgaga tcggcatgaa gggagagagg 240

cgccggggca agggacacga tggcctgtac cagggcctga gcaccgccac aaaggacaca 300

tatgatgccc tgcacatgca ggccctgcca cctagg 336

<210> 67

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucloetide encoding P@A self-cleaving peptide part of vector construct

<400> 67

ggatctggag ccaccaactt tagcctgctg aagcaggcag gcgatgtgga ggagaatcca 60

ggacct 66

<210> 68

<211> 267

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide enconding Naked FRB part of vector construct

<400> 68

gagatgtggc acgagggact ggaggaggca agcaggctgt actttggcga gcggaatgtg 60

aagggcatgt tcgaggtgct ggagccactg cacgcaatga tggagagggg accacagacc 120

ctgaaggaga catccttcaa ccaggcatac ggaagggacc tgatggaggc acaggagtgg 180

tgccggaagt atatgaagtc tggcaatgtg aaggacctgc tgcaggcctg ggatctgtat 240

taccacgtgt ttagaaggat cagcaag 267

<210> 69

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding P2A self-cleaving peptide part of vector construct

<400> 69

ggctccggcg ccaccaactt ctccctgctg aagcaggccg gcgatgtgga agaaaatcca 60

ggacca 66

<210> 70

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding signal peptide FKBP12 part of vector construct

<400> 70

atgcctctgg gactgctgtg gctgggactg gccctgctgg gcgccctgca cgcccaggcc 60

ggcgtgcagg tggagacaat cagccctggc gacggcagaa cctttccaaa gaggggccag 120

acatgcgtgg tgcactacac cggcatgctg gaggatggca agaagttcga ctcctctcgc 180

gatcggaaca agccctttaa gttcatgctg ggcaagcagg aagtgatcag aggctgggag 240

gagggcgtgg cccagatgtc tgtgggccag agggccaagc tgacaatcag cccagactat 300

gcatacggag caaccggaca ccctggaatc atcccaccac acgccacact ggtgttcgat 360

gtggagctgc tgaagctg 378

<210> 71

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding "IL-2R gamma TM-Cytoplasmic domain part of vector construct

<400> 71

ggcgagggct ctaacaccag caaggagaat ccatttctgt tcgcactgga ggcagtggtc 60

atctccgtgg gctctatggg cctgatcatc tccctgctgt gcgtgtactt ttggctggag 120

agaacaatgc caaggatccc caccctgaag aacctggagg acctggtgac cgagtaccac 180

ggcaatttca gcgcctggtc cggcgtgtct aagggactgg cagagtccct gcagccagat 240

tattctgagc ggctgtgcct ggtgagcgag atccctccaa agggaggcgc cctgggagag 300

ggaccaggag ccagcccctg caaccagcac tccccttact gggccccccc ttgttatacc 360

ctgaagccag agaca 375

<210> 72

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding P2A self-cleaving peptide

part of vector construct

<400> 72

ggctctggcg ccaccaactt cagcctgctg aagcaagccg gcgacgtgga agaaaaccca 60

ggacca 66

<210> 73

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding signal peptideFRB part of vector construct

<400> 73

atggcactgc cagtgaccgc cctgctgctg cctctggccc tgctgctgca cgcagccaga 60

cccatcctgt ggcacgaaat gtggcatgaa ggcctggagg aggcaagcag actgtacttt 120

ggcgagagaa atgtgaaagg aatgtttgag gtgctggagc ctctgcacgc catgatggag 180

aggggccctc agaccctgaa ggagacatcc tttaaccagg cctacggcag agacctgatg 240

gaggcccagg agtggtgcag gaagtatatg aagagcggaa atgtgaaaga cctgctgcag 300

gcctgggatc tgtactacca cgtgttccgc cggatctcta ag 342

<210> 74

<211> 945

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding "IL-2R beta TM-Cytoplasmic domain part of vector construct

<400> 74

ggcaaggata caatcccttg gctgggacac ctgctggtgg gactgagcgg agcctttggc 60

ttcatcatcc tggtgtatct gctgatcaac tgcagaaata caggcccatg gctgaagaag 120

gtgctgaagt gtaacacccc tgacccatcc aagttctttt ctcagctgag ctccgagcac 180

ggcggcgatg tgcagaagtg gctgtctagc ccctttcctt cctctagctt cagccctgga 240

ggactggcac ctgagatctc cccactggag gtgctggaga gggacaaggt gacccagctg 300

ctgctgcagc aggataaggt gccagagccc gcctccctgt cctctaacca cagcctgacc 360

tcctgcttta caaatcaggg ctacttcttt ttccacctgc cagacgcact ggagatcgag 420

gcatgtcagg tgtatttcac atacgatccc tatagcgagg aggaccctga tgagggagtg 480

gccggcgccc caaccggaag ctcccctcag ccactgcagc cactgagcgg agaggacgat 540

gcatattgta catttccttc ccgcgacgat ctgctgctgt tctctccaag cctgctggga 600

ggaccatctc cacccagcac cgcacctgga ggatccgggg caggggagga gcggatgcct 660

ccatctctgc aggagagagt gccaagggac tgggatccac agcctctggg accacctacc 720

cctggagtgc cagacctggt ggatttccag ccacccccctg agctggtgct gcgggaggca 780

ggagaggagg tgccagacgc aggacctaga gagggcgtga gctttccctg gtccaggcca 840

ccaggacagg gagagttccg cgccctgaac gcccggctgc ccctgaatac agacgcctac 900

ctgtctctgc aggagctgca gggccaggat cctacccacc tggtg 945

<210> 75

<211> 1297

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB_RACR_CD19 CAR lentiviral vector Construct

<400> 75

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

Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His
20 25 30

Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn
35 40 45

Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys
50 55 60

Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu
65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gly Ser Gly Ala Thr Asn
85 90 95

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr Gly Ser Gly Ala Thr

355 360 365

Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly

370 375 380

Pro Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

Ile Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val

500 505 510

Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile

515 520 525

Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn

530 535 540

Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly

545 550 555 560

Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe

565 570 575

Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu

580 585 590

Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu
595 600 605
Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn

610 615 620
Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala
625 630 635 640
Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp
645 650 655
Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln
660 665 670
Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp

675 680 685
Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro
690 695 700
Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro
705 710 715 720
Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly
725 730 735
Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro

740 745 750
Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro
755 760 765
Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu
770 775 780
Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu
785 790 795 800
Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val Gly Ser

805 810 815
Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu
820 825 830
Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu

835 840 845

Leu Pro His Pro Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln

850 855 860

Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser

865 870 875 880

Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln

885 890 895

Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu

900 905 910

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

915 920 925

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr

930 935 940

Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr

945 950 955 960

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

965 970 975

Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro

980 985 990

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

995 1000 1005

Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro

1010 1015 1020

Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu

1025 1030 1035

Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile

1040 1045 1050

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu

1055 1060 1065

Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr

1070 1075 1080

Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

1085 1090 1095

Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

1100 1105 1110

Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala

1115 1120 1125

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

1130 1135 1140

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe

1145 1150 1155

Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys

1160 1165 1170

Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys

1175 1180 1185

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn

1190 1195 1200

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

1205 1210 1215

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

1220 1225 1230

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

1235 1240 1245

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

1250 1255 1260

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

1265 1270 1275

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

1280 1285 1290

Leu Pro Pro Arg

1295

<210> 76

<211

> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Naked FRB_P2A part of construct

<400> 76

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

Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His
20 25 30

Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn
35 40 45

Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys
50 55 60

Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu
65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gly Ser Gly Ala Thr Asn
85 90 95

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
100 105 110

<210> 77

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - RACRg (FKBP12_IL-2R gamma)_P2A part of construct

<400> 77

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 Gly Ser Gly Ala Thr
245 250 255
Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
260 265 270
Pro

<210> 78
<211> 451
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - RACRb (FRB_IL-2R beta)_P2A part of construct

<400> 78

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 Gly Ser Gly
420 425 430
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
435 440 445
Pro Gly Pro
450

<210> 79
<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - CD19 scFv part of construct

<400> 79

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50 55 60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145 150 155 160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165 170 175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180 185 190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln

210 215 220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

260 265

<210> 80

<211> 194

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - IgG4 linker-CD28 TM_4-1BB-CD3zeta part of construct

<400> 80

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu

50 55 60

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys

65 70 75 80

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
165 170 175
Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
180 185 190
Pro Arg

<210> 81
<211> 3894
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding FRB_RACR_CD19 CAR lentiviral vector construct
<400> 81
atggagatgt ggcacgaggg actggaggag gcaagcagac tgtactttgg cgagaggaac 60

gtgaagggca tgttcgaggt gctggagcca ctgcacgcaa tgatggagag gggaccacag 120
accctgaagg agacatcttt caaccaggca tacggaaggg acctgatgga ggcacaggag 180
tggtgccgga agtatatgaa gagcggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc ctgggatctg 240
tactatcacg tgtttcggag aatctccaag ggctctggcg ccaccaactt ctccctgctg 300
aagcaggccg gcgatgtgga ggagaatcct ggaccaatgc cactgggact gctgtggctg 360
ggactggccc tgctgggcgc cctgcacgcc caggccggcg tgcaggtgga gacaatcagc 420
cctggcgacg gacgcacctt tccaaagagg ggacagacat gcgtggtgca ctacaccggc 480

atgctggagg atggcaagaa gttcgacagc tccagagata ggaataagcc ctttaagttc 540
atgctgggca agcaggaagt gatcagggga tgggaggagg gagtggcaca gatgtctgtg 600
ggacagcggg ccaagctgac aatcagccca gactatgcat acggagcaac cggacaccct 660
ggaatcatcc cacctcacgc cacactggtg tttgatgtgg agctgctgaa gctgggcgag 720
ggcagcaaca cctccaagga gaatccattt ctgttcgccc tggaggccgt ggtcatctct 780
gtgggcagca tgggcctgat catctccctg ctgtgcgtgt acttttggct ggagcgcaca 840
atgccacgga tccccaccct gaagaacctg gaggacctgg tgaccgagta ccacggcaat 900

ttctccgcct ggtctggcgt gagcaaggga ctggcagagt ctctgcagcc agattatagc 960
gagcggctgt gcctggtgag cgagatccca cccaagggag gcgccctggg agagggacca 1020

ggagcctccc cttgcaacca gcactctcct tactgggccc ctccatgtta taccctgaag 1080

ccagagacag gcagcggagc tactaacttc tccctgctga agcaagcagg cgacgtggaa 1140

gaaaatcctg gaccaatggc actgccagtg accgccctgc tgctgcctct ggccctgctg 1200

ctgcacgcag ccagacccat cctgtggcac gaaatgtggc atgaaggcct ggaggaggca 1260

agcaggctgt actttggcga gcggaatgtg aaaggaatgt ttgaagtgct ggagcctctg 1320

cacgccatga tggagagggg ccctcagacc ctgaaggaga catcctttaa ccaggcctac 1380

ggcagagacc tgatggaggc ccaggagtgg tgcaggaagt atatgaagtc tggaaatgtg 1440

aaagacctgc tgcaggcctg ggatctgtat tatcacgtgt tcaggcgcat ctctaagggc 1500

aaggatacaa tcccttggct gggacacctg ctggtgggac tgagcggagc ctttggcttc 1560

atcatcctgg tgtatctgct gatcaactgc cgcaatacag gcccatggct gaagaaggtg 1620

ctgaagtgta acacccccga cccttccaag ttcttttctc agctgtctag cgagcacggc 1680

ggcgatgtgc agaagtggct gtcctctcca tttcccagct cctctttcag cccaggagga 1740

ctggcaccag agatctcccc actggaggtg ctggagaggg acaaggtgac ccagctgctg 1800

ctgcagcagg ataaggtgcc tgagccagcc tccctgagct ccaaccactc cctgacctct 1860

tgctttacaa atcagggcta cttctttttc cacctgccag acgcactgga gatcgaggca 1920

tgtcaggtgt atttcacata cgatccctat agcgaggagg accctgatga gggagtggcc 1980

ggcgccccaa ccggatctag cccacagcct ctgcagccac tgagcggaga ggacgatgca 2040

tattgtacat ttccttcccg cgacgatctg ctgctgttct ctccaagcct gctgggagga 2100

ccaagcccac cttccaccgc accaggcggc tccggggcag gggaggagcg gatgccaccc 2160

tctctgcagg agagagtgcc aagggactgg gatccacagc cactgggacc tccaacccct 2220

ggagtgccag acctggtgga tttccagccc cctccagagc tggtgctgag agaggcagga 2280

gaggaggtgc ctgacgcagg accaagagag ggcgtgagct ttccttggtc caggccacct 2340

ggacagggag agttcagagc cctgaacgcc aggctgcccc tgaatacaga cgcctacctg 2400

tctctgcagg agctgcaggg ccaggatcct acacacctgg tcggatctgg cgccaccaac 2460

tttagcctgc tgaagcaggc aggcgacgtg gaagagaacc ctggaccaat gctgctgctg 2520

gtgaccagcc tgctgctgtg cgagctgcca caccctgcct tcctgctgat cccagatatc 2580

cagatgacac agaccacatc ctctctgtcc gcctctctgg gcgacagagt gaccatctct 2640

tgtagggcca gccaggatat ctccaagtac ctgaactggt atcagcagaa gcctgacggc 2700

acagtgaagc tgctgatcta ccacacctct aggctgcaca gcggagtgcc atcccggttc 2760

agcggatccg gatctggaac agactattct ctgaccatca gcaacctgga gcaggaggat 2820

atcgccacat acttttgcca gcagggcaat accctgccat atacattcgg cggaggaacc 2880

aagctggaga tcaccggaag cacatccgga tctggcaagc caggatccgg agagggatct 2940

acaaagggag aggtgaagct gcaggagagc ggaccaggac tggtggcacc cagccagtcc 3000

ctgtctgtga cctgtacagt gtctggcgtg agcctgcccg attacggcgt gtcctggatc 3060

agacagccac caaggaaggg actggagtgg ctgggcgtga tctggggctc tgagaccaca 3120

tactataata gcgccctgaa gtcccggctg accatcatca aggacaacag caagtcccag 3180

gtgtttctga agatgaatag cctgcagacc gacgatacag ccatctacta ttgcgccaag 3240

cactactatt acggcggctc ctacgccatg gattattggg gccagggcac ctccgtgaca 3300

gtgagctccg agtctaagta tggccctcca tgccccccct gtcctatgtt ctgggtgctg 3360

gtggtggtgg gaggcgtgct ggcctgttac tccctgctgg tgaccgtggc ctttatcatc 3420

ttctgggtga agcgcggccg gaagaagctg ctgtatatct ttaagcagcc cttcatgaga 3480

cctgtgcaga ccacacagga ggaggacggc tgcagctgta ggtttccaga ggaggaggag 3540

ggaggatgcg agctgcgcgt gaagttctct cggagcgccg atgcccctgc ctaccagcag 3600

ggacagaacc agctgtataa cgagctgaat ctgggccgga gagaggagta cgacgtgctg 3660

gataagagga ggggaagaga cccagagatg ggaggcaagc ctcggagaaa gaacccacag 3720

gagggcctgt acaatgagct gcagaaggac aagatggccg aggcctattc cgagatcggc 3780

atgaagggag agaggcgccg gggcaaggga cacgatggcc tgtaccaggg cctgagcacc 3840

gccacaaagg acacctatga tgccctgcac atgcaggccc tgccacccag gtga 3894

<210> 82

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding Naked FRB_P2A part of vector construct

<400> 82

atggagatgt ggcacgaggg actggaggag gcaagcagac tgtactttgg cgagaggaac 60

gtgaagggca tgttcgaggt gctggagcca ctgcacgcaa tgatggagag gggaccacag 120

accctgaagg agacatcttt caaccaggca tacggaaggg acctgatgga ggcacaggag 180

tggtgccgga agtatatgaa gagcggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc ctgggatctg 240

tactatcacg tgtttcggag aatctccaag ggctctggcg ccaccaactt ctccctgctg 300

aagcaggccg gcgatgtgga ggagaatcct ggacca 336

<210> 83

<211> 819

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding RACRg (FKBP12_IL-2R gamma)_P2A part of vector construct

<400> 83

atgccactgg gactgctgtg gctgggactg gccctgctgg gcgccctgca cgcccaggcc 60

ggcgtgcagg tggagacaat cagccctggc gacggacgca cctttccaaa gaggggacag 120

acatgcgtgg tgcactacac cggcatgctg gaggatggca agaagttcga cagctccaga 180

gataggaata agccctttaa gttcatgctg ggcaagcagg aagtgatcag gggatgggag 240

gagggagtgg cacagatgtc tgtgggacag cgggccaagc tgacaatcag cccagactat 300

gcatacggag caaccggaca ccctggaatc atcccacctc acgccacact ggtgtttgat 360

gtggagctgc tgaagctggg cgagggcagc aacacctcca aggagaatcc atttctgttc 420

gccctggagg ccgtggtcat ctctgtgggc agcatgggcc tgatcatctc cctgctgtgc 480

gtgtactttt ggctggagcg cacaatgcca cggatcccca ccctgaagaa cctggaggac 540

ctggtgaccg agtaccacgg caatttctcc gcctggtctg gcgtgagcaa gggactggca 600

gagtctctgc agccagatta tagcgagcgg ctgtgcctgg tgagcgagat cccacccaag 660

ggaggcgccc tgggagaggg accaggagcc tccccttgca accagcactc tccttactgg 720

gcccctccat gttataccct gaagccagag acaggcagcg gagctactaa cttctccctg 780

ctgaagcaag caggcgacgt ggaagaaaat cctggacca 819

<210> 84

<211> 1353

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding RACRb (FRB_IL-2R beta)_P2A part of vector construct

<400> 84

atggcactgc cagtgaccgc cctgctgctg cctctggccc tgctgctgca cgcagccaga 60

cccatcctgt ggcacgaaat gtggcatgaa ggcctggagg aggcaagcag gctgtacttt 120

ggcgagcgga atgtgaaagg aatgtttgaa gtgctggagc ctctgcacgc catgatggag 180

aggggccctc agaccctgaa ggagacatcc tttaaccagg cctacggcag agacctgatg 240

gaggcccagg agtggtgcag gaagtatatg aagtctggaa atgtgaaaga cctgctgcag 300

gcctgggatc tgtattatca cgtgttcagg cgcatctcta agggcaagga tacaatccct 360

tggctgggac acctgctggt gggactgagc ggagcctttg gcttcatcat cctggtgtat 420

ctgctgatca actgccgcaa tacaggccca tggctgaaga aggtgctgaa gtgtaacacc 480

cccgaccctt ccaagttctt ttctcagctg tctagcgagc acggcggcga tgtgcagaag 540

tggctgtcct ctccatttcc cagctcctct ttcagcccag gaggactggc accagagatc 600

tccccactgg aggtgctgga gagggacaag gtgacccagc tgctgctgca gcaggataag 660

gtgcctgagc cagcctccct gagctccaac cactccctga cctcttgctt tacaaatcag 720

ggctacttct ttttccacct gccagacgca ctggagatcg aggcatgtca ggtgtatttc 780

acatacgatc cctatagcga ggaggaccct gatgagggag tggccggcgc cccaaccgga 840

tctagcccac agcctctgca gccactgagc ggagaggacg atgcatattg tacatttcct 900

tcccgcgacg atctgctgct gttctctcca agcctgctgg gaggaccaag cccaccttcc 960

accgcaccag gcggctccgg ggcaggggag gagcggatgc caccctctct gcaggagaga 1020

gtgccaaggg actgggatcc acagccactg ggacctccaa cccctggagt gccagacctg 1080

gtggatttcc agcccccctcc agagctggtg ctgagagagg caggagagga ggtgcctgac 1140

gcaggaccaa gagagggcgt gagctttcct tggtccaggc cacctggaca gggagagttc 1200

agagccctga acgccaggct gcccctgaat acagacgcct acctgtctct gcaggagctg 1260

cagggccagg atcctacaca cctggtcgga tctggcgcca ccaactttag cctgctgaag 1320

caggcaggcg acgtggaaga gaaccctgga cca 1353

<210> 85

<211> 801

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding CD19 scFv part of vector construct

<400> 85

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgcgagctgc cacaccctgc cttcctgctg 60

atcccagata tccagatgac acagaccaca tcctctctgt ccgcctctct gggcgacaga 120

gtgaccatct cttgtagggc cagccaggat atctccaagt acctgaactg gtatcagcag 180

aagcctgacg gcacagtgaa gctgctgatc taccacacct ctaggctgca cagcggagtg 240

ccatcccggt tcagcggatc cggatctgga acagactatt ctctgaccat cagcaacctg 300

gagcaggagg atatcgccac atacttttgc cagcagggca ataccctgcc atatacattc 360

ggcggaggaa ccaagctgga gatcaccgga agcacatccg gatctggcaa gccaggatcc 420

ggagagggat ctacaaaggg agaggtgaag ctgcaggaga gcggaccagg actggtggca 480

cccagccagt ccctgtctgt gacctgtaca gtgtctggcg tgagcctgcc cgattacggc 540

gtgtcctgga tcagacagcc accaaggaag ggactggagt ggctgggcgt gatctggggc 600

tctgagacca catactataa tagcgccctg aagtcccggc tgaccatcat caaggacaac 660

agcaagtccc aggtgtttct gaagatgaat agcctgcaga ccgacgatac agccatctac 720

tattgcgcca agcactacta ttacggcggc tcctacgcca tggattattg gggccagggc 780

acctccgtga cagtgagctc c 801

<210> 86

<211> 582

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding IgG4 linker-CD28 TM_4-1BB-CD3zeta part of vector construct

<400> 86

gagtctaagt atggccctcc atgccccct tgtcctatgt tctgggtgct ggtggtggtg 60

ggaggcgtgc tggcctgtta ctccctgctg gtgaccgtgg cctttatcat cttctgggtg 120

aagcgcggcc ggaagaagct gctgtatatc tttaagcagc ccttcatgag acctgtgcag 180

accacacagg aggaggacgg ctgcagctgt aggtttccag aggaggagga gggaggatgc 240

gagctgcgcg tgaagttctc tcggagcgcc gatgcccctg cctaccagca gggacagaac 300

cagctgtata acgagctgaa tctgggccgg agagaggagt acgacgtgct ggataagagg 360

aggggaagag acccagagat gggaggcaag cctcggagaa agaacccaca ggagggcctg 420

tacaatgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctatt ccgagatcgg catgaaggga 480

gagaggcgcc ggggcaaggg acacgatggc ctgtaccagg gcctgagcac cgccacaaag 540

gacacctatg atgccctgca catgcaggcc ctgccaccca gg 582

<210> 87

<211> 794

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB_CD19 CAR_TGFbDN lentiviral vector Construct

<400> 87

Met Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe

1 5 10 15

Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys

50 55 60

Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu

65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gly Ser Gly Ala Thr Asn

85 90 95

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

100 105 110

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

115 120 125

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser

130 135 140

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

145 150 155 160

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly

165 170 175

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val

180 185 190

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr

195 200 205

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
260 265 270
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
275 280 285
Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu

290 295 300
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
305 310 315 320
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
325 330 335
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
340 345 350
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

355 360 365
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
370 375 380
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
385 390 395 400
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
405 410 415
Phe Trp Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln

420 425 430
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
435 440 445
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
450 455 460
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
465 470 475 480
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

485 490 495
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg

500 505 510

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Gly Ser Gly

565 570 575

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

580 585 590

Pro Gly Pro Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His

595 600 605

Ile Val Leu Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln

610 615 620

Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val

625 630 635 640

Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys

645 650 655

Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys

660 665 670

Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu

675 680 685

Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His

690 695 700

Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu

705 710 715 720

Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp

725 730 735

Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn

740 745 750

Pro Asp Leu Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu
755 760 765

Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr
770 775 780

Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Arg Arg Arg
785 790

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Naked FRB_P2A part of construct

<400> 88

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

Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His
20 25 30

Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn
35 40 45

Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys
50 55 60

Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu
65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys Gly Ser Gly Ala Thr Asn
85 90 95

Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
100 105 110

<210> 89

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - CD19 scFv part of construct

<400> 89

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

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

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

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195 200 205
Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210 215 220
Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
260 265

<210> 90

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - IgG4 linker-CD28 TM_4-1BB-CD3zeta_P2A part of construct

<400> 90

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Met Phe Trp Val
1 5 10 15
Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr
20 25 30

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

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

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser

165 170 175

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

180 185 190

Pro Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly

195 200 205

Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

210 215

<210> 91

<211> 199

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - TGF beta DN part of construct

<400> 91

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

35 40 45

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln

50 55 60

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro

65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

85 90 95

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile

100 105 110

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys

115 120 125

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn

130 135 140

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Leu

145 150 155 160

Leu Leu Val Ile Phe Gln Val Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu

165 170 175

Gly Val Ala Ile Ser Val Ile Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn

180 185 190

Arg Gln Gln Lys Arg Arg Arg

195

<210> 92

<211> 2385

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding FRB_CD19 CAR_TGFbDN lentiviral vector construct

<400> 92

atggagatgt ggcacgaggg actggaggag gcatccagac tgtacttcgg cgagaggaac 60

gtgaagggca tgtttgaggt gctggagcca ctgcacgcca tgatggagag aggcccccag 120

accctgaagg agacatcttt caaccaggcc tatggaaggg acctgatgga ggcacaggag 180

tggtgccgga agtacatgaa gagcggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc ctgggatctg 240

tactatcacg tgttccggag aatcagcaag ggctccggcg ccaccaactt tagcctgctg 300

aagcaggcag gcgacgtgga ggagaatcca ggacctatgc tgctgctggt gacatccctg 360

ctgctgtgcg agctgccaca cccagccttc ctgctgatcc ccgatatcca gatgacccag 420

accacaagct ccctgagcgc ctccctgggc gacagggtga caatctcttg tcgggccagc 480

caggatatct ccaagtatct gaattggtac cagcagaagc ccgacggcac cgtgaagctg 540

ctgatctatc acacatctag actgcacagc ggcgtgcctt ccaggttttc tggcagcggc 600

tccggcaccg actactctct gacaatcagc aacctggagc aggaggatat cgccacctat 660

ttctgccagc agggcaatac cctgccttac acatttggcg gcggcacaaa gctggagatc 720

accggctcta caagcggatc cggcaagcca ggatccggag agggatctac caagggagag 780

gtgaagctgc aggagagcgg acctggactg gtggcaccat ctcagagcct gtccgtgacc 840

tgtacagtgt ctggcgtgag cctgccagat tatggcgtga gctggatcag gcagccacct 900

aggaagggac tggagtggct gggcgtgatc tggggctccg agaccacata ctataacagc 960

gccctgaagt cccgcctgac catcatcaag gacaactcta agagccaggt gttcctgaag 1020

atgaattccc tgcagaccga cgatacagcc atctactatt gcgccaagca ctactattac 1080

ggcggctctt atgccatgga ttactggggc cagggcacca gcgtgacagt gtctagcgag 1140

tccaagtacg gcccaccctg ccctccatgt cccatgtttt gggtgctggt ggtggtggga 1200

ggcgtgctgg cctgttattc cctgctggtg accgtggcct tcatcatctt ttgggtgaag 1260

cgcggccgga agaagctgct gtacatcttc aagcagccct tcatgagacc cgtgcagacc 1320

acacaggagg aggacggctg cagctgtagg ttcccagagg aggaggaggg aggatgcgag 1380

ctgagggtga agttttcccg gtctgccgat gcccctgcct atcagcaggg ccagaatcag 1440

ctgtacaacg agctgaatct gggcaggcgc gaggagtacg acgtgctgga taagaggaga 1500

ggaagggacc ctgagatggg aggcaagcca aggcgcaaga accctcagga gggcctgtat 1560

aatgagctgc agaaggacaa gatggccgag gcctactccg agatcggcat gaagggagag 1620

cggagaaggg gcaagggaca cgatggcctg tatcagggcc tgagcaccgc cacaaaggac 1680

acctacgatg cactgcacat gcaggccctg ccacctagag gatctggagc cacaaacttc 1740

agcctgctga agcaggccgg cgatgtggag gagaatcctg gaccaatggg aagaggactg 1800

ctgaggggac tgtggccact gcacatcgtg ctgtggacca ggatcgcctc tacaatccca 1860

ccccacgtgc agaagagcgt gaacaatgac atgatcgtga ccgataacaa tggcgccgtg 1920

aagtttcccc agctgtgcaa gttctgtgac gtgcgctttt ccacctgtga taaccagaag 1980

tcctgcatgt ctaattgtag catcacatcc atctgcgaga agcctcagga ggtgtgcgtg 2040

gccgtgtggc ggaagaacga cgagaatatc accctggaga cagtgtgcca cgatcccaag 2100

ctgccttatc acgacttcat cctggaggat gccgcctctc ctaagtgtat catgaaggag 2160

aagaagaagc caggcgagac cttctttatg tgcagctgtt cctctgacga gtgcaacgat 2220

aatatcatct tctccgagga gtacaacacc tctaatcctg acctgctgct ggtcatcttt 2280

caggtgacag gcatctccct gctgcctcca ctgggcgtgg ccatctctgt gatcatcatc 2340

ttttattgtt acagagtgaa caggcagcag aagcgccggc gctag 2385

<210> 93

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding Naked FRB_P2A part of vector construct

<400> 93

atggagatgt ggcacgaggg actggaggag gcatccagac tgtacttcgg cgagaggaac 60

gtgaagggca tgtttgaggt gctggagcca ctgcacgcca tgatggagag aggcccccag 120

accctgaagg agacatcttt caaccaggcc tatggaaggg acctgatgga ggcacaggag 180

tggtgccgga agtacatgaa gagcggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc ctgggatctg 240

tactatcacg tgttccggag aatcagcaag ggctccggcg ccaccaactt tagcctgctg 300

aagcaggcag gcgacgtgga ggagaatcca ggacct 336

<210> 94

<211> 801

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding CD19 scFv part of vector construct

<400> 94

atgctgctgc tggtgacatc cctgctgctg tgcgagctgc cacacccagc cttcctgctg 60

atccccgata tccagatgac ccagaccaca agctccctga gcgcctccct gggcgacagg 120

gtgacaatct cttgtcgggc cagccaggat atctccaagt atctgaattg gtaccagcag 180

aagcccgacg gcaccgtgaa gctgctgatc tatcacacat ctagactgca cagcggcgtg 240

ccttccaggt tttctggcag cggctccggc accgactact ctctgacaat cagcaacctg 300

gagcaggagg atatcgccac ctatttctgc cagcagggca ataccctgcc ttacacattt 360

ggcggcggca caaagctgga gatcaccggc tctacaagcg gatccggcaa gccaggatcc 420

ggagagggat ctaccaaggg agaggtgaag ctgcaggaga gcggacctgg actggtggca 480

ccatctcaga gcctgtccgt gacctgtaca gtgtctggcg tgagcctgcc agattatggc 540

gtgagctgga tcaggcagcc acctaggaag ggactggagt ggctgggcgt gatctggggc 600

tccgagacca catactataa cagcgccctg aagtcccgcc tgaccatcat caaggacaac 660

tctaagagcc aggtgttcct gaagatgaat tccctgcaga ccgacgatac agccatctac 720

tattgcgcca agcactacta ttacggcggc tcttatgcca tggattactg gggccagggc 780

accagcgtga cagtgtctag c 801

<210> 95

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding IgG4 linker-CD28 TM_4-1BB-CD3zeta_P2A part of vector construct

<400> 95

gagtccaagt acggcccacc ctgccctcca tgtcccatgt tttgggtgct ggtggtggtg 60

ggaggcgtgc tggcctgtta ttccctgctg gtgaccgtgg ccttcatcat cttttgggtg 120

aagcgcggcc ggaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc ccttcatgag acccgtgcag 180

accacacagg aggaggacgg ctgcagctgt aggttcccag aggaggagga gggaggatgc 240

gagctgaggg tgaagttttc ccggtctgcc gatgcccctg cctatcagca gggccagaat 300

cagctgtaca acgagctgaa tctgggcagg cgcgaggagt acgacgtgct ggataagagg 360

agaggaaggg accctgagat gggaggcaag ccaaggcgca agaaccctca ggagggcctg 420

tataatgagc tgcagaagga caagatggcc gaggcctact ccgagatcgg catgaaggga 480

gagcggagaa ggggcaaggg acacgatggc ctgtatcagg gcctgagcac cgccacaaag 540

gacacctacg atgcactgca catgcaggcc ctgccaccta gaggatctgg agccacaaac 600

ttcagcctgc tgaagcaggc cggcgatgtg gaggagaatc ctggacca 648

<210> 96

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - polynucleotide encoding TGF beta DNpart of vector

construct

<400> 96

atgggaagag gactgctgag gggactgtgg ccactgcaca tcgtgctgtg gaccaggatc 60

gcctctacaa tcccacccca cgtgcagaag agcgtgaaca atgacatgat cgtgaccgat 120

aacaatggcg ccgtgaagtt tccccagctg tgcaagttct gtgacgtgcg cttttccacc 180

tgtgataacc agaagtcctg catgtctaat tgtagcatca catccatctg cgagaagcct 240

caggaggtgt gcgtggccgt gtggcggaag aacgacgaga atatcaccct ggagacagtg 300

tgccacgatc ccaagctgcc ttatcacgac ttcatcctgg aggatgccgc ctctcctaag 360

tgtatcatga aggagaagaa gaagccaggc gagaccttct ttatgtgcag ctgttcctct 420

gacgagtgca acgataatat catcttctcc gaggagtaca acacctctaa tcctgacctg 480

ctgctggtca tctttcaggt gacaggcatc tccctgctgc ctccactggg cgtggccatc 540

tctgtgatca tcatctttta ttgttacaga gtgaacaggc agcagaagcg ccggcgctag 600

<210> 97

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Glycophorin A TM_ CT

<400> 97

Ser Gly His Phe Ser Glu Pro Glu Ile Thr Leu Ile Ile Phe Gly Val
1 5 10 15

Met Ala Gly Val Ile Gly Thr Ile Leu Leu Ile Ser Tyr Gly Ile Arg

20 25 30

Arg Leu Ile Lys Lys Ser Pro Ser Asp Val Lys Pro Leu Pro Ser Pro
35 40 45

Asp Thr Asp Val Pro Leu Ser Ser Val Glu Ile Glu Asn Pro Glu Thr
50 55 60

Ser Asp Gln
65

<210> 98

<211> 201

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 218 linker_human Glycophorin A ecto-TM_HIV Env CT

<400> 98

tccggacact tcagcgagcc tgagatcacc ctgatcatct tcggcgtgat ggccggagtg 60

atcggcacaa tcctgctgat cagctacggc atcagaagac tgattaagaa atccccatct 120

gatgtgaagc ctctgccttc tcctgacacc gacgtccccc tgagcagcgt ggaaatcgag 180

aaccccgaaa ccagcgacca g 201

<210> 99

<211> 500

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gag protein

<400> 99

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys

20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro

35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu

50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn

65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp

85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys

100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val

115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His

130 135 140

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu

145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser

165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly

180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu

195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala

210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr

225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr His Asn Pro Pro Ile

245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys

260 265 270

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

275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu

290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr

305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala

325 330 335

Leu Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly

340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser

355 360 365

Gln Val Thr Asn Pro Ala Thr Ile Met Ile Gln Lys Gly Asn Phe Arg

370 375 380

Asn Gln Arg Lys Thr Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His

385 390 395 400

Ile Ala Lys Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys

405 410 415

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn

420 425 430

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe

435 440 445

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg

450 455 460

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

465 470 475 480

Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Ser Asp

485 490 495

Pro Ser Ser Gln

500

<210> 100

<211> 1003

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pol protein

<400> 100

Phe Phe Arg Glu Asp Leu Ala Phe Pro Gln Gly Lys Ala Arg Glu Phe
1 5 10 15

Ser Ser Glu Gln Thr Arg Ala Asn Ser Pro Thr Arg Arg Glu Leu Gln

20 25 30

Val Trp Gly Arg Asp Asn Asn Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Asp Arg
35 40 45

Gln Gly Thr Val Ser Phe Ser Phe Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg
50 55 60

Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile Gly Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu
65 70 75 80

Asp Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu Met Asn Leu Pro Gly

85 90 95

Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val
100 105 110

Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile
115 120 125

Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn
130 135 140

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

145 150 155 160

Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val
165 170 175

Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val Glu Ile
180 185 190

Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro Glu
195 200 205

Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr

210 215 220

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

275 280 285

Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu
290 295 300
Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Cys Ser Met Thr
305 310 315 320
Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr
325 330 335
Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln

340 345 350

His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly
355 360 365
Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Trp
370 375 380
Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Val
385 390 395 400
Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val

405 410 415

Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Ala Gly Ile Lys Val Arg
420 425 430
Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Val
435 440 445
Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile

450 455 460

Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu

465 470 475 480

Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile

485 490 495

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

500 505 510

Lys Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln

515 520 525

Lys Ile Ala Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro Lys Phe

530 535 540

Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Ala Trp Trp Thr Glu Tyr

545 550 555 560

Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr Pro Pro

565 570 575

Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu Pro Ile Ile Gly Ala

580 585 590

Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly

595 600 605

Lys Ala Gly Tyr Val Thr Asp Arg Gly Arg Gln Lys Val Val Pro Leu

610 615 620

Thr Asp Thr Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile His Leu Ala

625 630 635 640

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

645 650 655

Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu

660 665 670

Val Ser Gln Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu

675 680 685

Ala Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp

690 695 700

Lys Leu Val Ser Ala Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile
705 710 715 720
Asp Lys Ala Gln Glu Glu His Glu Lys Tyr His Ser Asn Trp Arg Ala

725 730 735
Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu Ile Val
740 745 750
Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly Gln
755 760 765
Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp Cys Thr His Leu Glu
770 775 780
Gly Lys Val Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu

785 790 795 800
Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu
805 810 815
Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Thr Val His Thr Asp Asn
820 825 830
Gly Ser Asn Phe Thr Ser Thr Thr Val Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala
835 840 845
Gly Ile Lys Gln Glu Phe Gly Ile Pro Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly

850 855 860
Val Ile Glu Ser Met Asn Lys Glu Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val
865 870 875 880
Arg Asp Gln Ala Glu His Leu Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe
885 890 895
Ile His Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly
900 905 910
Glu Arg Ile Val Asp Ile Ile Ala Thr Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu

915 920 925
Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp
930 935 940
Ser Arg Asp Pro Val Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly

945 950 955 960

Glu Gly Ala Val Val Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro

965 970 975

Arg Arg Lys Ala Lys Ile Ile Arg Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly

980 985 990

Asp Asp Cys Val Ala Ser Arg Gln Asp Glu Asp

995 1000

<210> 101

<211> 4307

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gag-pol nucleic acid

<400> 101

atgggcgccc gcgccagcgt gctttctggc ggcgagctgg acaggtggga gaagattcgc 60

ctgcggcctg gaggaaagaa aaagtacaag ctgaagcaca tcgtgtgggc ttctcgggaa 120

ctggaaagat tcgccgtgaa ccctggactg ctagagacct ccgaaggctg cagacagatc 180

ctgggacagc tgcaacctag cctgcagacc ggcagcgagg agctgagaag cctgtacaac 240

accgtcgcca ccctgtattg tgtgcaccaa agaatcgaga tcaaggacac caaggaggct 300

ctggataaga tcgaggaaga gcagaacaag agcaagaaaa aagcccagca ggccgccgct 360

gataccggcc attctaatca ggtgtcccag aactacccca ttgtgcaaaa tatccagggc 420

cagatggtcc accaggccat cagccctaga accctgaatg cctgggtgaa ggtggtggaa 480

gagaaggcct tttctccaga ggtgatccct atgttcagcg ccctgagcga gggcgctacc 540

cctcaggacc tgaacacaat gctgaacacc gtgggcggcc accaggccgc catgcagatg 600

ctgaaagaaa ccatcaacga ggaggccgcc gaatgggacc gggtgcaccc cgttcacgcc 660

ggcccaatcg cccctggcca gatgcgggaa cctagaggca gcgacatcgc cggcacaacc 720

agcacactgc aagagcagat cggatggatg acacacaacc cccccatccc cgtgggcgaa 780

atctacaagc ggtggatcat tctgggactg aacaaaatcg ttagaatgta cagccctacc 840

agcatcctgg atatcagaca gggcccaaag gagcctttcc gggactacgt ggacagattt 900

tacaagaccc tgagagccga acaggcctcc caagaggtga agaactggat gacagagacc 960

ctgctggtgc agaatgccaa ccctgattgt aagacaatcc tgaaggccct cggacctggc 1020

gctacactgg aagaaatgat gaccgcctgc cagggcgtgg gcggccccgg ccacaaggcc 1080

agagtgctgg ccgaggctat gagccaggtg acaaaccccg ccacaatcat gatccagaag 1140

ggcaacttca gaaaccagcg gaagaccgtg aaatgcttca actgcggcaa ggaaggccac 1200

atcgcaaaga actgcagagc ccctaggaag aaaggctgtt ggaagtgcgg aaaggaagga 1260

caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320

cacaagggaa ggccagggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380

gagagcttca ggtttgggga agagacaaca actccctctc agaagcagga gccgatagac 1440

aaggaactgt atcctttagc ttccctcaga tcactctttg gcagcgaccc ctcgtcacaa 1500

taaagatcgg cggacagctg aaagaggcct tgctggacac cggagccgat gacaccgtgc 1560

tggaagaaat gaacctgcct ggaagatgga aacctaagat gatcggtggc atcggcggat 1620

ttatcaaagt gcgacagtat gaccagatcc tgatcgagat ttgcggccac aaagctatcg 1680

gaacagtgct ggtcggcccg acccccgtga acatcattgg ccgcaacctg ctgacacaga 1740

tcggttgtac actgaacttt cctatcagcc ctatcgaaac cgtgccggtc aagctgaagc 1800

ccggcatgga tggccctaag gtgaagcagt ggcccctgac agaggaaaag atcaaggcac 1860

tggtggaaat ctgcacagaa atggaaaaag agggcaagat ttctaaaatc ggcccagaga 1920

acccctacaa cacccctgtt ttcgccatca agaagaaaga ttccaccaag tggaggaagc 1980

tggtggactt tcgggaactg aacaagcgga cccaggattt ctgggaggtg cagctgggca 2040

tcccccaccc tgccggcctg aaacaaaaaa aaagcgtgac cgtgctggac gtgggcgacg 2100

cctatttcag cgtgcctctg gataaggact tccggaaata caccgccttt accatcccta 2160

gcatcaacaa cgagacccct ggcatccggt accagtacaa cgtgctccca cagggctgga 2220

agggctcacc cgccatcttc cagtgcagca tgaccaagat cctggagcct ttcagaaagc 2280

agaatcctga catcgtgatc taccagtaca tggacgacct gtacgtgggc tctgatctgg 2340

agatcggaca gcacagaaca aagatcgaag agctgagaca gcatctgctg agatggggtt 2400

tcaccacccc cgacaagaag caccagaagg aacctccttt tctgtggatg ggctacgagc 2460

tgcaccccga taagtggaca gtgcagccca tcgtgctgcc cgagaaggac tcctggaccg 2520

tgaacgacat tcagaagctg gtcggaaagc tgaattgggc ttcccaaatc tacgccggca 2580

tcaaggtgcg gcagctgtgc aagcttctgc gcggcacaaa ggccctgacg gaagtcgtgc 2640

cactgaccga ggaagccgaa ttagagctgg ccgaaaacag agaaattctg aaagaacctg 2700

tgcacggcgt ttactacgac ccttctaagg acctgatcgc cgaaatccag aaacaaggcc 2760

agggccagtg gacttaccaa atctaccagg agcctttcaa aaacctcaag accggcaagt 2820

acgccagaat gaagggagcc catacaaacg acgtgaagca gctgacagag gctgttcaga 2880

agatcgccac agaaagcatc gtgatctggg gcaagacccc aaagttcaag ctgcctatcc 2940

aaaaggaaac ctgggaggcc tggtggaccg agtactggca ggccacctgg attcctgaat 3000

gggagttcgt gaacacacca cctcttgtga agctgtggta ccagctggaa aaggagccaa 3060

tcatcggcgc cgagacattc tacgtggacg gcgccgccaa ccgggagacc aaactgggaa 3120

aggccggata tgtgaccgac agaggcagac aaaaggtggt gcctctgacc gatacaacta 3180

accagaaaac agagctgcag gccattcacc tggccctgca agacagcggc ctggaagtga 3240

atatcgtgac agacagtcag tacgccctgg gcatcatcca ggctcagcct gacaagagcg 3300

agagcgagct ggtgtcccag atcatcgagc agctgatcaa aaaggagaag gtttatctgg 3360

cctgggtgcc cgcccacaag ggcatcggag gcaacgagca ggtggacaag ctggtcagcg 3420

ccggcatccg gaaggtgctg ttcctggacg gcatcgacaa ggcccaggag gaacacgaga 3480

agtaccacag caactggcgg gccatggcca gcgacttcaa cctgccacct gtggttgcta 3540

aggagatcgt cgcctcttgt gataagtgcc agctgaaggg cgaggccatg cacggccaag 3600

tggattgcag ccctgggatc tggcagctag actgtaccca cctggagggc aaggtgatcc 3660

tggtggcagt gcacgtggcc agcggctaca tcgaggctga ggtgatcccc gccgaaacgg 3720

gccaggagac cgcctacttt ctgctgaagc tagccggccg gtggcctgtg aagaccgtgc 3780

acaccgataa cggcagcaat ttcaccagca caaccgtgaa ggctgcctgc tggtgggctg 3840

gaatcaagca ggagttcggc atcccataca atcctcagtc tcagggcgtg atcgagagca 3900

tgaacaagga actgaagaag atcattggtc aggtcagaga tcaggccgag cacctgaaaa 3960

ccgccgttca aatggctgtg ttcatccata acttcaaaag aaaaggcggc atcggcggct 4020

acagcgccgg cgaaagaatc gtggatatca tcgcgaccga catccaaaca aaagagctgc 4080

aaaagcaaat caccaagatc cagaacttca gagtgtacta cagagatagc agagatcctg 4140

tgtggaaggg acctgccaag ctgctgtgga agggcgaggg cgccgtggtg atccaggaca 4200

atagcgacat caaggtcgtg cccagaagaa aggctaaaat cattagagac tacggcaaac 4260

agatggccgg agatgattgc gtggcttcta gacaggacga ggactga 4307

<210> 102

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev protein

<400> 102

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

1 5 10 15

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

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

<210> 103
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rev nucleic acid
<400> 103
atggccggca gaagcggcga cagcgacgag gatctgctga aagccgtgcg gctgatcaag 60

ttcctgtacc agagcaaccc tcctcctaac cccgagggca ccagacaggc tagacggaac 120
cgcagaagaa ggtggcggga acggcaaaga cagatccact ctatcagcga gagaatcctg 180
agcacctacc tgggaagatc cgccgagcct gtccccctgc agctgcctcc actggaaaga 240
ctgaccctgg attgtaatga ggactgcggc acaagcggaa cccagggcgt gggcagcccc 300
cagattctgg tggaatcccc tacaatcctc gagtctggcg ccaaggaatg a 351
<210> 104
<211> 1539
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Cocal glycoprotein
<400> 104

atgaactttc tgctgctgac cttcatcgtg ctgcctctgt gcagccacgc caagttttcc 60

atcgtgttcc cacagtccca gaagggcaac tggaagaatg tgcccagctc ctaccactat 120

tgtccttcta gctccgacca gaactggcac aatgatctgc tgggcatcac catgaaggtg 180

aagatgccta agacacacaa ggccatccag gcagatggat ggatgtgcca cgcagccaag 240

tggatcacca catgtgactt tcggtggtac ggccccaagt atatcaccca cagcatccac 300

tccatccagc ctacaagcga gcagtgcaag gagtccatca agcagaccaa gcagggcaca 360

tggatgtctc ccggcttccc ccctcagaac tgtggctacg ccaccgtgac agatagcgtg 420

gcagtggtgg tgcaggcaac cccacaccac gtgctggtgg atgagtatac aggcgagtgg 480

atcgacagcc agtttcccaa cggcaagtgc gagaccgagg agtgtgagac agtgcacaat 540

tctaccgtgt ggtacagcga ttataaggtg accggcctgt gcgacgccac actggtggat 600

accgagatca cattcttttc cgaggacggc aagaaggagt ctatcggcaa gcccaacacc 660

ggctacaggt ctaattactt cgcctatgag aagggcgata aggtgtgcaa gatgaattat 720

tgtaagcacg ccggggtgcg gctgccaagc ggcgtgtggt ttgagttcgt ggaccaggac 780

gtgtacgcag cagcaaagct gccagagtgc ccagtgggag caaccatcag cgcccccacc 840

cagacatctg tggacgtgag cctgatcctg gatgtggaga gaatcctgga ctactccctg 900

tgccaggaga catggtccaa gatccgctct aagcagcccg tgagcccagt ggacctgtct 960

tacctggcac caaagaaccc tggaacagga cctgccttta ccatcatcaa tggcacactg 1020

aagtacttcg agacccggta tatcagaatc gacatcgata acccaatcat ctccaagatg 1080

gtgggcaaga tctccggctc tcagaccgag agagagctgt ggacagagtg gttcccatac 1140

gagggcgtgg agatcggccc caatggcatc ctgaagaccc ctacaggcta taagtttcca 1200

ctgttcatga tcggccacgg catgctggac tctgatctgc acaagaccag ccaggccgag 1260

gtgtttgagc acccacacct ggcagaggca ccaaagcagc tgcccgagga ggagaccctg 1320

ttctttggcg atacaggcat ctccaagaac cctgtggagc tgatcgaggg ctggttttct 1380

agctggaagt ctaccgtggt gacattcttt ttcgccatcg gcgtgttcat cctgctgtac 1440

gtggtggcaa ggatcgtgat cgccgtgcgg tacagatatc agggcagcaa caataagaga 1500

atctataatg acatcgagat gtccaggttc cgcaagtga 1539

<210> 105

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Glycophorin A hinge-TM-CT

<400> 105

His Phe Ser Glu Pro Glu Ile Thr Leu Ile Ile Phe Gly Val Met Ala

1 5 10 15

Gly Val Ile Gly Thr Ile Leu Leu Ile Ser Tyr Gly Ile Arg Arg Leu

20 25 30

Ile Lys Lys Ser Pro Ser Asp Val Lys Pro Leu Pro Ser Pro Asp Thr

35 40 45

Asp Val Pro Leu Ser Ser Val Glu Ile Glu Asn Pro Glu Thr Ser Asp

50 55 60

Gln

65

<210> 106

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human Glycophorin A hinge-TM-CT - nucleic acid

<400> 106

cacttcagcg agcctgagat caccctgatc atcttcggcg tgatggccgg agtgatcggc 60

acaatcctgc tgatcagcta cggcatcaga agactgatta agaaatcccc atctgatgtg 120

aagcctctgc cttctcctga caccgacgtc cccctgagca gcgtggaaat cgagaacccc 180

gaaaccagcg accag 195

<210> 107

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_short hinge-TM-CT

<400> 107

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr

35 40 45

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile

50 55 60

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

85 90 95

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe

100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln

130 135 140

Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg

145 150 155 160

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile

180 185 190

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg

195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val

245 250 255

Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser

260 265 270

Ser Trp Lys Ser Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe

275 280 285

Ile Leu Leu Tyr Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg
290 295 300

Tyr Gln Gly Ser Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser
305 310 315 320

Arg Phe Arg Lys

<210> 108

<211> 972

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_short hinge-TM-CT - nucleic acid

<400> 108

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60

atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggccct 180

aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240

agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300

acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360

cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420

agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctccggag tggaactgat cgagggctgg ttcagcagct ggaaaagcac cgtggttaca 840

ttcttttttcg ccatcggcgt gttcatcctg ctgtacgtgg tcgccagaat tgtgatcgcc 900

gtgcggtata gataccaggg cagcaacaac aagcggatct acaacgacat cgagatgagc 960

agattcagaa ag 972

<210> 109

<211> 355

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_long hinge_TM_CT

<400> 109

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr

35 40 45

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile

50 55 60

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

85 90 95

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe

100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln

130 135 140

Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg

145 150 155 160

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile

180 185 190

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg

195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met

210 215 220

Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr
225 230 235 240
Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val
245 250 255
Thr Val Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Glu His Pro His Leu Ala Glu

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

325 330 335
Gln Gly Ser Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser Arg
340 345 350
Phe Arg Lys
355

<210> 110
<211> 1062
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3scFv_long hinge_TM_CT - nucleic acid
<400> 110
atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60
atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggcccct 180
aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240
agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300
acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360
cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420
agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctccggat tcgagcaccc ccacctggcc gaggccccta agcagctgcc tgaagaagag 840

acactgtttt tcggagatac cggcatcagc aaaaaccccg tggagctgat cgagggctgg 900

ttcagctctt ggaagagcac cgtggtcaca ttctttttcg ccatcggcgt ctttatcctg 960

ctgtacgtgg tagccagaat cgtgatcgcc gtgcggtaca gataccaggg cagcaacaac 1020

aagcggatct acaacgacat cgagatgagc cggttcagaa ag 1062

<210> 111

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_ hGlycophorinA_TM_HIV Env CT

<400> 111

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15

Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
35 40 45

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile
50 55 60

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
85 90 95

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe
100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln

130 135 140

Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg

145 150 155 160

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile

180 185 190

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg

195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val

245 250 255

Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gly Ile Arg Arg Leu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr

305 310 315 320

Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr

325 330 335

Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln

340 345 350

Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly

355 360 365

Leu Glu Arg Ile Leu Leu

370

<210> 112

<211> 1122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_ hGlycophorinA_TM_HIV Env CT

<400> 112

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60

atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggccct 180

aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240

agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300

acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360

cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420

agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctccggag gatctacaag cggctctggc aagcctggca gcggagaagg cagcaccaag 840

ggccctgaga tcacactgat catcttcggc gtgatggccg gcgtcatcgg caccatcctg 900

ctgatcagct acggcatcag aagactggct ctgaagtact ggtggaatct gctgcaatac 960

tggagccagg agctgaaaaa cagcgccgtg tccctgctca acgccaccgc catcgccgtg 1020

gccgagggca ccgacagagt gatcgaggtg gtgcagggag cctgcagagc tattcggcac 1080

atccccagac ggatcaggca gggcctggaa agaatcctgc tg 1122

<210> 113

<211> 380

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_ 218 linker_HIV Env ecto-TM-CT

<400> 113

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15
Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
20 25 30

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

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

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

Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr
225 230 235 240

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val
245 250 255
Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro
260 265 270
Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg
275 280 285

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

Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro
355 360 365
Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
370 375 380

<210> 114
<211> 1140
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> anti-CD3scFv_ 218 linker_HIV Env ecto-TM-CT - nucleic acid
<400> 114

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60
atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggcccct 180
aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240
agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300
acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360
cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420
agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctccggag gaagcaccag cggctctggc aagcctggca gcggcgaggg ctctaccaag 840

ggcaattggc tgtggtacat cagaatcttc atcatcatcg tgggcagcct gatcggcctg 900

agaatcgtgt tcgccgtgct gagcctggtg aaccggggct gggaagctct gaagtactgg 960

tggaacctgc tgcaatactg gtcccaggag ctgaaaaaca gcgctgtgtc cctgctcaac 1020

gccaccgcca tcgccgtcgc cgagggaaca gacagagtga tcgaggtggt gcagggagcc 1080

tgcagagcca ttcggcacat ccccagacgc atcagacagg gcctggaaag aatcctgctg 1140

<210> 115

<211> 373

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_ G4S linker_HIV Env ecto-TM-CT

<400> 115

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
35 40 45

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile
50 55 60

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

85 90 95

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe
100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln

130 135 140

Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg

145 150 155 160

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile

180 185 190

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg

195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val

245 250 255

Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Arg Ile Phe Ile Ile Ile Val Gly

275 280 285

Ser Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu Val Asn

290 295 300

Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly

340 345 350

Ala Cys Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu

355 360 365

Glu Arg Ile Leu Leu

370

<210> 116

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_ G4S linker_HIV Env ecto-TM-CT - nucleic acid

<400> 116

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60

atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggccct 180

aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240

agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300

acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360

cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420

agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctccggag gcggtggagg ctctggtggc ggagggagcg gtggcggagg cagctacatc 840

agaatcttca tcatcatcgt gggcagcctg atcggcctga gaatcgtgtt cgccgttctg 900

agcctggtga accggggctg ggaagccctg aagtactggt ggaatctgct ccagtactgg 960

tctcaggagc tgaagaacag cgccgtgtcc ctgctgaacg ctacagctat cgccgtcgcc 1020

gagggcaccg acagagtgat cgaggtggtg cagggcgcct gcagagccat ccggcacatc 1080

cctagaagga ttcggcaagg cctggaaaga atcctgctg 1119

<210> 117

<211> 856

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_short hinge_TM_CT _T2A_ Cocal envelope

<400> 117

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
35 40 45

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile
50 55 60

Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

85 90 95

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe
100 105 110

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
130 135 140

Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg

145 150 155 160

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
180 185 190

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg
195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val

245 250 255

Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Val Glu Leu Ile Glu Gly Trp Phe Ser

260 265 270

Ser Trp Lys Ser Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala Ile Gly Val Phe

275 280 285

Ile Leu Leu Tyr Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala Val Arg Tyr Arg

290 295 300

Tyr Gln Gly Ser Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp Ile Glu Met Ser

305 310 315 320

Arg Phe Arg Lys Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys

325 330 335

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

340 345 350

Ile Val Leu Pro Leu Cys Ser His Ala Lys Phe Ser Ile Val Phe Pro

355 360 365

Gln Ser Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Ser Tyr His Tyr

370 375 380

Cys Pro Ser Ser Ser Asp Gln Asn Trp His Asn Asp Leu Leu Gly Ile

385 390 395 400

Thr Met Lys Val Lys Met Pro Lys Thr His Lys Ala Ile Gln Ala Asp

405 410 415

Gly Trp Met Cys His Ala Ala Lys Trp Ile Thr Thr Cys Asp Phe Arg

420 425 430

Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His Ser Ile His Ser Ile Gln Pro

435 440 445

Thr Ser Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Lys Gln Thr Lys Gln Gly Thr

450 455 460

Trp Met Ser Pro Gly Phe Pro Pro Gln Asn Cys Gly Tyr Ala Thr Val

465 470 475 480

Thr Asp Ser Val Ala Val Val Val Gln Ala Thr Pro His His Val Leu
485 490 495
Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Ile Asp Ser Gln Phe Pro Asn Gly
500 505 510
Lys Cys Glu Thr Glu Glu Cys Glu Thr Val His Asn Ser Thr Val Trp
515 520 525
Tyr Ser Asp Tyr Lys Val Thr Gly Leu Cys Asp Ala Thr Leu Val Asp

530 535 540
Thr Glu Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp Gly Lys Lys Glu Ser Ile Gly
545 550 555 560
Lys Pro Asn Thr Gly Tyr Arg Ser Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Lys Gly
565 570 575
Asp Lys Val Cys Lys Met Asn Tyr Cys Lys His Ala Gly Val Arg Leu
580 585 590
Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Phe Val Asp Gln Asp Val Tyr Ala Ala

595 600 605
Ala Lys Leu Pro Glu Cys Pro Val Gly Ala Thr Ile Ser Ala Pro Thr
610 615 620
Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile Leu Asp Val Glu Arg Ile Leu
625 630 635 640
Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Gln
645 650 655
Pro Val Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly

660 665 670
Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu
675 680 685
Thr Arg Tyr Ile Arg Ile Asp Ile Asp Asn Pro Ile Ile Ser Lys Met
690 695 700
Val Gly Lys Ile Ser Gly Ser Gln Thr Glu Arg Glu Leu Trp Thr Glu
705 710 715 720
Trp Phe Pro Tyr Glu Gly Val Glu Ile Gly Pro Asn Gly Ile Leu Lys

725 730 735

Thr Pro Thr Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Phe Met Ile Gly His Gly Met

740 745 750

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

755 760 765

Pro His Leu Ala Glu Ala Pro Lys Gln Leu Pro Glu Glu Glu Thr Leu

770 775 780

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

785 790 795 800

Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Thr Val Val Thr Phe Phe Phe Ala

805 810 815

Ile Gly Val Phe Ile Leu Leu Tyr Val Val Ala Arg Ile Val Ile Ala

820 825 830

Val Arg Tyr Arg Tyr Gln Gly Ser Asn Asn Lys Arg Ile Tyr Asn Asp

835 840 845

Ile Glu Met Ser Arg Phe Arg Lys

850 855

<210> 118

<211> 2568

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_short hinge_TM_CT _T2A_ Cocal envelope - nucleic acid

<400> 118

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60

atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggcccct 180

aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240

agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300

acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360

cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420

agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctccggag tggaactgat cgagggctgg ttcagcagct ggaaaagcac cgtggttaca 840

ttctttttcg ccatcggcgt gttcatcctg ctgtacgtgg tcgccagaat tgtgatcgcc 900

gtgcggtata gataccaggg cagcaacaac aagcggatct acaacgacat cgagatgagc 960

agattcagaa agggatctgg agagggaagg ggaagcctgc tgacatgcgg cgacgtggag 1020

gagaacccag gaccaaattt tctgctgctg accttcatcg tgctgcctct gtgcagccac 1080

gccaagtttt ccatcgtgtt cccacagtcc cagaagggca actggaagaa tgtgccctct 1140

agctaccact attgcccttc ctctagcgac cagaactggc acaatgatct gctgggcatc 1200

acaatgaagg tgaagatgcc caagacccac aaggccatcc aggcagatgg atggatgtgc 1260

cacgcagcca agtggatcac aacctgtgac tttcggtggt acggccccaa gtatatcaca 1320

cactccatcc actctatcca gcctacctcc gagcagtgca aggagtctat caagcagaca 1380

aagcagggca cctggatgag ccctggcttc ccaccccaga actgtggcta cgccacagtg 1440

accgactccg tggcagtggt ggtgcaggca acacctcacc acgtgctggt ggatgagtat 1500

accggcgagt ggatcgacag ccagtttcca aacggcaagt gcgagacaga ggagtgtgag 1560

accgtgcaca attctacagt gtggtacagc gattataagg tgacaggcct gtgcgacgcc 1620

accctggtgg atacagagat caccttcttt tctgaggacg gcaagaagga gagcatcggc 1680

aagcccaaca ccggctacag atccaattac ttcgcctatg agaagggcga taaggtgtgc 1740

aagatgaatt attgtaagca cgccggggtg cggctgccta gcggcgtgtg gtttgagttc 1800

gtggaccagg acgtgtacgc agcagcaaag ctgcctgagt gcccagtggg agcaaccatc 1860

tccgccccaa cacagacctc cgtggacgtg tctctgatcc tggatgtgga gcgcatcctg 1920

gactacagcc tgtgccagga gacctggagc aagatccggt ccaagcagcc cgtgtccct 1980

gtggacctgt cttacctggc accaaagaac ccaggaaccg gaccagcctt tacaatcatc 2040

aatggcaccc tgaagtactt cgagacccgc tatatccgga tcgacatcga taaccctatc 2100

atcagcaaga tggtgggcaa gatctctggc agccagacag agagagagct gtggaccgag 2160

tggttccctt acgagggcgt ggagatcggc ccaaatggca tcctgaagac accaaccggc 2220

tataagtttc ccctgttcat gatcggccac ggcatgctgg acagcgatct gcacaagacc 2280

tcccaggccg aggtgtttga gcacccacac ctggcagagg caccaaagca gctgcctgag 2340

gaggagacac tgttctttgg cgataccggc atctctaaga accccgtgga gctgatcgag 2400

ggctggtttt cctcttggaa gagcacagtg gtgaccttct ttttcgccat cggcgtgttc 2460

atcctgctgt acgtggtggc cagaatcgtg atcgccgtga gatacaggta tcagggctcc 2520

aacaataaga ggatctataa tgacatcgag atgtctcgct tccggaag 2568

<210> 119

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_human Glycophorin A hinge-TM-CT

<400> 119

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
1 5 10 15
Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

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

85 90 95
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe
100 105 110
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg Thr Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
130 135 140
Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg

145 150 155 160
Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His

165 170 175

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile

180 185 190

Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys Asp Arg

195 200 205

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Phe Leu Gln Met

210 215 220

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

225 230 235 240

Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val

245 250 255

Thr Val Ser Ser Ala Ser His Phe Ser Glu Pro Glu Ile Thr Leu Ile

260 265 270

Ile Phe Gly Val Met Ala Gly Val Ile Gly Thr Ile Leu Leu Ile Ser

275 280 285

Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Ile Lys Lys Ser Pro Ser Asp Val Lys Pro

290 295 300

Leu Pro Ser Pro Asp Thr Asp Val Pro Leu Ser Ser Val Glu Ile Glu

305 310 315 320

Asn Pro Glu Thr Ser Asp Gln

325

<210> 120

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3scFv_human Glycophorin A hinge-TM-CT - nucleic acid

<400> 120

atgggcgtga aagtgctgtt cgccctgatc tgcatcgcag ttgctgaagc cgacatccag 60

atgacccagt ctcctagcag cctcagcgct agcgtgggcg atagagtgac catcacatgt 120

agcgccagca gcagcgtgtc ctacatgaac tggtaccagc aaacacctgg aaaggccct 180

aaaaggtgga tctatgacac atctaagctg gcttctggag tgccatctag attttctggc 240

agcggctccg gcactgatta tacattcacc atcagcagcc tgcagcccga ggatatcgcc 300

acctactact gtcagcagtg gtcctctaat cccttcacct tcggccaggg caccaagctg 360

cagatcacca gaaccagcgg cgggggagga agcggcgggg gaggatctgg cggcggcggc 420

agccaggtgc agctggtgca gagcggcggc ggcgtggtgc aacctggcag aagcctgaga 480

ctgagctgca aggcctctgg ctacaccttc acccggtaca ccatgcattg ggtgcggcag 540

gcccctggca agggcctgga atggattgga tacatcaacc ccagcagagg ctacaccaac 600

tacaaccaga aggtgaagga cagattcaca atttctcggg acaacagcaa gaataccgcc 660

ttcctgcaaa tggactccct gcgcccagaa gataccggcg tgtacttctg cgctagatat 720

tacgacgacc actactgcct ggactactgg ggccagggca cccctgtgac cgtgtccagc 780

gcctcccact tcagcgagcc tgagatcacc ctgatcatct tcggcgtgat ggccggagtg 840

atcggcacaa tcctgctgat cagctacggc atcagaagac tgattaagaa atccccatct 900

gatgtgaagc ctctgccttc tcctgacacc gacgtccccc tgagcagcgt ggaaatcgag 960

aaccccgaaa ccagcgacca g 981

<210> 121

<211> 7145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> payload plasmid 142 - CAR comprising anti-CD19, cytosolic FRB, RACR

<400> 121

tgtagtctta tgcaatactc ttgtagtctt gcaacatggt aacgatgagt tagcaacatg 60

ccttacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgattggt ggaagtaagg tggtacgatc 120

gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat tggacgaacc actgaattgc 180

cgcattgcag agatattgta tttaagtgcc tagctcgata cataaacggg tctctctggt 240

tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaacccactg cttaagcctc 300

aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta 360

actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt ggcgcccgaa 420

cagggacttg aaagcgaaag ggaaaccaga ggagctctct cgacgcagga ctcggcttgc 480

tgaagcgcgc acggcaagag gcgaggggcg gcgactggtg agtacgccaa aaattttgac 540

tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc agtattaagc gggggagaat 600

tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat ataaattaaa 660

acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga 720

aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc 780

agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc atcaaaggat 840

agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa 900

gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg aggaggagat atgagggaca 960

attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac 1020

ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag agcagtggga ataggagctt 1080

tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg cgcagcgtca atgacgctga 1140

cggtacaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca gcagaacaat ttgctgaggg 1200

ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg gggcatcaag cagctccagg 1260

caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctgggg atttggggtt 1320

gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa tgctagttgg agtaataaat 1380

ctctggaaca gatttggaat cacacgacct ggatggagtg ggacagagaa attaacaatt 1440

acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa aagaatgaac 1500

aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac ataacaaatt 1560

ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttggtaggt ttaagaatag 1620

tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca ttatcgtttc 1680

agacccacct cccaaccccg aggggacccg acaggcccga aggaatagaa gaagaaggtg 1740

gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atctcgacgg tatcggttaa 1800

cttttaaaag aaaaggggggg attgggggggt acagtgcagg ggaaagaata gtagacataa 1860

tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt caaaatttta 1920

tcggccgcgg ggtacctagg aacagagaaa caggagaata tgggccaaac aggatatctg 1980

tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc caagaacagt tggaacagca gaatatgggc 2040

caaacaggat atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagatggtc 2100

cccagatgcg gtcccgccct cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc 2160

ccaaggacct gaaatgaccc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct 2220

tctgttcgcg cgcttctgct ccccgagctc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt 2280

cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacttcc atagaagcct gcagggccgc 2340

caccatgctg ctgctggtga cctccctgct gctgtgcgag ctgcctcacc cagcctttct 2400

gctgatcccc gacatccaga tgacacagac cacaagctcc ctgtctgcca gcctgggcga 2460

cagagtgacc atctcctgta gggcctctca ggatatcagc aagtacctga actggtatca 2520

gcagaagcca gatggcacag tgaagctgct gatctaccac acctccaggc tgcactctgg 2580

agtgccaagc cggttctccg gatctggaag cggcaccgac tattccctga caatctctaa 2640

cctggagcag gaggatatcg ccacatactt ttgccagcag ggcaataccc tgccatatac 2700
attcggcgga ggaaccaagc tggagatcac cggatccaca tctggaagcg gcaagccagg 2760
aagcggagag ggatccacaa agggagaggt gaagctgcag gagagcggac caggactggt 2820
ggcaccatcc cagtctctga gcgtgacctg tacagtgtcc ggcgtgtctc tgcctgacta 2880
cggcgtgtcc tggatcaggc agccacctag gaagggactg gagtggctgg gcgtgatctg 2940
gggctctgag accacatact ataattctgc cctgaagagc cgcctgacca tcatcaagga 3000
caactccaag tctcaggtgt ttctgaagat gaatagcctg cagaccgacg atacagccat 3060

ctactattgc gccaagcact actattacgg cggctcctac gccatggatt attggggcca 3120
gggcacctcc gtgacagtgt ctagcgagtc taagtatggc ccaccctgcc ctccatgtcc 3180
aatgttctgg gtgctggtgg tggtgggagg cgtgctggcc tgttactccc tgctggtgac 3240
cgtggccttt atcatcttct gggtgaagag aggcaggaag aagctgctgt atatctttaa 3300
gcagcccttc atgcgccctg tgcagaccac acaggaggag gacggctgca gctgtcggtt 3360
tccagaggag gaggagggag gatgcgagct gcgcgtgaag ttcagccggt ccgccgatgc 3420
ccctgcctac cagcagggcc agaaccagct gtataacgag ctgaatctgg gccggagaga 3480

ggagtacgac gtgctggata agaggagggg aagggaccca gagatgggag gcaagcctcg 3540
gagaaagaac ccacaggagg gcctgtacaa tgagctgcag aaggacaaga tggccgaggc 3600
ctattctgag atcggcatga agggagagag gcgccggggc aagggacacg atggcctgta 3660
ccagggcctg agcaccgcca caaaggacac atatgatgcc ctgcacatgc aggccctgcc 3720
acctagggga tctggagcca ccaactttag cctgctgaag caggcaggcg atgtggagga 3780
gaatccagga cctgagatgt ggcacgaggg actggaggag gcaagcaggc tgtactttgg 3840
cgagcggaat gtgaagggca tgttcgaggt gctggagcca ctgcacgcaa tgatggagag 3900

gggaccacag accctgaagg agacatcctt caaccaggca tacggaaggg acctgatgga 3960
ggcacaggag tggtgccgga agtatatgaa gtctggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc 4020
ctgggatctg tattaccacg tgtttagaag gatcagcaag ggctccggcg ccaccaactt 4080
ctccctgctg aagcaggccg gcgatgtgga agaaaatcca ggaccaatgc ctctgggact 4140
gctgtggctg ggactggccc tgctgggcgc cctgcacgcc caggccggcg tgcaggtgga 4200
gacaatcagc cctggcgacg gcagaacctt tccaaagagg ggccagacat gcgtggtgca 4260
ctacaccggc atgctggagg atggcaagaa gttcgactcc tctcgcgatc ggaacaagcc 4320

ctttaagttc atgctgggca agcaggaagt gatcagaggc tgggaggagg gcgtggccca 4380

gatgtctgtg ggccagaggg ccaagctgac aatcagccca gactatgcat acggagcaac 4440

cggacaccct ggaatcatcc caccacacgc cacactggtg ttcgatgtgg agctgctgaa 4500

gctgggcgag ggctctaaca ccagcaagga gaatccattt ctgttcgcac tggaggcagt 4560

ggtcatctcc gtgggctcta tgggcctgat catctccctg ctgtgcgtgt acttttggct 4620

ggagagaaca atgccaagga tccccaccct gaagaacctg gaggacctgg tgaccgagta 4680

ccacggcaat ttcagcgcct ggtccggcgt gtctaaggga ctggcagagt ccctgcagcc 4740

agattattct gagcggctgt gcctggtgag cgagatccct ccaaagggag gcgccctggg 4800

agagggacca ggagccagcc cctgcaacca gcactcccct tactgggccc ccccttgtta 4860

taccctgaag ccagagacag gctctggcgc caccaacttc agcctgctga agcaagccgg 4920

cgacgtggaa gaaaacccag gaccaatggc actgccagtg accgccctgc tgctgcctct 4980

ggccctgctg ctgcacgcag ccagacccat cctgtggcac gaaatgtggc atgaaggcct 5040

ggaggaggca agcagactgt actttggcga gagaaatgtg aaaggaatgt ttgaggtgct 5100

ggagcctctg cacgccatga tggagagggg ccctcagacc ctgaaggaga catcctttaa 5160

ccaggcctac ggcagagacc tgatggaggc ccaggagtgg tgcaggaagt atatgaagag 5220

cggaaatgtg aaagacctgc tgcaggcctg ggatctgtac taccacgtgt tccgccggat 5280

ctctaagggc aaggatacaa tcccttggct gggacacctg ctggtgggac tgagcggagc 5340

ctttggcttc atcatcctgg tgtatctgct gatcaactgc agaaatacag gcccatggct 5400

gaagaaggtg ctgaagtgta acacccctga cccatccaag ttcttttctc agctgagctc 5460

cgagcacggc ggcgatgtgc agaagtggct gtctagcccc tttccttcct ctagcttcag 5520

ccctggagga ctggcacctg agatctcccc actggaggtg ctggagaggg acaaggtgac 5580

ccagctgctg ctgcagcagg ataaggtgcc agagcccgcc tccctgtcct ctaaccacag 5640

cctgacctcc tgctttacaa atcagggcta cttctttttc cacctgccag acgcactgga 5700

gatcgaggca tgtcaggtgt atttcacata cgatccctat agcgaggagg accctgatga 5760

gggagtggcc ggcgccccaa ccggaagctc ccctcagcca ctgcagccac tgagcggaga 5820

ggacgatgca tattgtacat ttccttcccg cgacgatctg ctgctgttct ctccaagcct 5880

gctgggagga ccatctccac ccagcaccgc acctggagga tccggggcag gggaggagcg 5940

gatgcctcca tctctgcagg agagagtgcc aagggactgg gatccacagc ctctgggacc 6000

acctacccct ggagtgccag acctggtgga tttccagcca ccccctgagc tggtgctgcg 6060

ggaggcagga gaggaggtgc cagacgcagg acctagagag ggcgtgagct ttccctggtc 6120

caggccacca ggacagggag agttccgcgc cctgaacgcc cggctgcccc tgaatacaga 6180

cgcctacctg tctctgcagg agctgcaggg ccaggatcct acccacctgg tgtgacgccg 6240

gcgctagtgt cgacaatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtattc 6300

ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgctgc tttaatgcct ttgtatcatg 6360

ctattgcttc ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc 6420

tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg 6480

acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc gggactttcg 6540

ctttcccct ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga 6600

caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaag ctgacgtcct 6660

ttccatggct gctcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg 6720

tcccttcggc cctcaatcca gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg gctctgcggc 6780

ctcttccgcg tcttcgcctt cgccctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc 6840

cgcctgttta agaccaatga cttacaaggc agctgtagat cttagccact ttttaaaaga 6900

aaaggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaga caagatctgc tttttgcttg 6960

tactgggtct ctctggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct aactagggaa 7020

cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgctt caagtagtgt gtgcccgtct 7080

gttgtgtgac tctggtaact agagatccct cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc 7140

tagca 7145

<210> 122

<211> 6926

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> payload plasmid - 201 comprising an anti-CD19 CAR, cytosolic FRB, and RACR

<400> 122

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480

ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa 540

tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccggg 600

tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaacccactg 660

cttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt 720

gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt 780

ggcgcccgaa cagggacttg aaagcgaaag ggaaaccaga ggagctctct cgacgcagga 840

ctcggcttgc tgaagcgcgc acggcaagag gcgaggggcg gcgactggtg agtacgccaa 900

aaattttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc agtattaagc 960

gggggagaat tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaaat 1020

ataaattaaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg 1080

gcctgttaga aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc 1140

agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tattgtgtgc 1200

atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa 1260

acaaaagtaa gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg aggaggagat 1320

atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta 1380

ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag agcagtggga 1440

ataggagctt tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg cgcagcgtca 1500

atgacgctga cggtacaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca gcagaacaat 1560

ttgctgaggg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg gggcatcaag 1620

cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctgggg 1680

atttggggtt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa tgctagttgg 1740

agtaataaat ctctggaaca gatttggaat cacacgacct ggatggagtg ggacagagaa 1800

attaacaatt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa 1860

aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac 1920

ataacaaatt ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttggtaggt 1980

ttaagaatag tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca 2040

ttatcgtttc agacccacct cccaaccccg aggggacccg acaggcccga aggaatagaa 2100

gaagaaggtg gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atctcgacgg 2160

tatcggttaa cttttaaaag aaaaggggggg attgggggggt acagtgcagg ggaaagaata 2220

gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 2280

caaaatttta tcgattgcct gacgcgtaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct 2340

aggatcaagg tcaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggta 2400

agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagttggaa cagcagaata tgggccaaac 2460

aggatatctg tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggtccccag 2520

atgcggtccc gccctcagca gtttctagag aaccatcaga tgtttccagg gtgccccaag 2580

gacctgaaat gaccctgtgc cttatttgaa ctaaccaatc agttcgcttc tcgcttctgt 2640

tcgcgcgctt ctgctccccg agctctatat aagagcccac aacccctcac tcggcgcgtg 2700

aacacaattc tgcagtcgaa ggcgtaccgt cacttacgag tcggtagcct gcagggccgc 2760

caccatgctg ctgctggtga cctccctgct gctgtgcgag ctgcctcacc cagcctttct 2820

gctgatcccc gacatccaga tgacacagac cacaagctcc ctgtctgcca gcctgggcga 2880

cagagtgacc atctcctgta gggcctctca ggatatcagc aagtacctga actggtatca 2940

gcagaagcca gatggcacag tgaagctgct gatctaccac acctccaggc tgcactctgg 3000

agtgccaagc cggttctccg gatctggaag cggcaccgac tattccctga caatctctaa 3060

cctggagcag gaggatatcg ccacatactt ttgccagcag ggcaataccc tgccatatac 3120

attcggcgga ggaaccaagc tggagatcac cggatccaca tctggaagcg gcaagccagg 3180

aagcggagag ggatccacaa agggagaggt gaagctgcag gagagcggac caggactggt 3240

ggcaccatcc cagtctctga gcgtgacctg tacagtgtcc ggcgtgtctc tgcctgacta 3300

cggcgtgtcc tggatcaggc agccacctag gaagggactg gagtggctgg gcgtgatctg 3360

gggctctgag accacatact ataattctgc cctgaagagc cgcctgacca tcatcaagga 3420

caactccaag tctcaggtgt ttctgaagat gaatagcctg cagaccgacg atacagccat 3480

ctactattgc gccaagcact actattacgg cggctcctac gccatggatt attggggcca 3540

gggcacctcc gtgacagtgt ctagcgagtc taagtatggc ccaccctgcc ctccatgtcc 3600

aatgttctgg gtgctggtgg tggtgggagg cgtgctggcc tgttactccc tgctggtgac 3660

cgtggccttt atcatcttct gggtgaagag aggcaggaag aagctgctgt atatctttaa 3720

gcagcccttc atgcgccctg tgcagaccac acaggaggag gacggctgca gctgtcggtt 3780

tccagaggag gaggagggag gatgcgagct gcgcgtgaag ttcagccggt ccgccgatgc 3840

ccctgcctac cagcagggcc agaaccagct gtataacgag ctgaatctgg gccggagaga 3900

ggagtacgac gtgctggata agaggagggg aagggaccca gagatgggag gcaagcctcg 3960

gagaaagaac ccacaggagg gcctgtacaa tgagctgcag aaggacaaga tggccgaggc 4020

ctattctgag atcggcatga agggagagag gcgccggggc aagggacacg atggcctgta 4080

ccagggcctg agcaccgcca caaaggacac atatgatgcc ctgcacatgc aggccctgcc 4140

acctagggga tctggagcca ccaactttag cctgctgaag caggcaggcg atgtggagga 4200
gaatccagga cctgagatgt ggcacgaggg actggaggag gcaagcaggc tgtactttgg 4260
cgagcggaat gtgaagggca tgttcgaggt gctggagcca ctgcacgcaa tgatggagag 4320
gggaccacag accctgaagg agacatcctt caaccaggca tacggaaggg acctgatgga 4380
ggcacaggag tggtgccgga agtatatgaa gtctggcaat gtgaaggacc tgctgcaggc 4440
ctgggatctg tattaccacg tgtttagaag gatcagcaag ggctccggcg ccaccaactt 4500
ctccctgctg aagcaggccg gcgatgtgga agaaaatcca ggaccaatgc ctctgggact 4560

gctgtggctg ggactggccc tgctgggcgc cctgcacgcc caggccggcg tgcaggtgga 4620
gacaatcagc cctggcgacg gcagaacctt tccaaagagg ggccagacat gcgtggtgca 4680
ctacaccggc atgctggagg atggcaagaa gttcgactcc tctcgcgatc ggaacaagcc 4740
ctttaagttc atgctgggca agcaggaagt gatcagaggc tgggaggagg gcgtggccca 4800
gatgtctgtg ggccagaggg ccaagctgac aatcagccca gactatgcat acggagcaac 4860
cggacaccct ggaatcatcc caccacacgc cacactggtg ttcgatgtgg agctgctgaa 4920
gctgggcgag ggctctaaca ccagcaagga gaatccattt ctgttcgcac tggaggcagt 4980

ggtcatctcc gtgggctcta tgggcctgat catctccctg ctgtgcgtgt acttttggct 5040
ggagagaaca atgccaagga tccccaccct gaagaacctg gaggacctgg tgaccgagta 5100
ccacggcaat ttcagcgcct ggtccggcgt gtctaaggga ctggcagagt ccctgcagcc 5160
agattattct gagcggctgt gcctggtgag cgagatccct ccaaagggag gcgccctggg 5220
agagggacca ggagccagcc cctgcaacca gcactcccct tactgggccc ccccttgtta 5280
taccctgaag ccagagacag gctctggcgc caccaacttc agcctgctga agcaagccgg 5340
cgacgtggaa gaaaacccag gaccaatggc actgccagtg accgccctgc tgctgcctct 5400

ggccctgctg ctgcacgcag ccagacccat cctgtggcac gaaatgtggc atgaaggcct 5460
ggaggaggca agcagactgt actttggcga gagaaatgtg aaaggaatgt ttgaggtgct 5520
ggagcctctg cacgccatga tggagagggg ccctcagacc ctgaaggaga catcctttaa 5580
ccaggcctac ggcagagacc tgatggaggc ccaggagtgg tgcaggaagt atatgaagag 5640
cggaaatgtg aaagacctgc tgcaggcctg ggatctgtac taccacgtgt tccgccggat 5700
ctctaagggc aaggatacaa tcccttggct gggacacctg ctggtgggac tgagcggagc 5760
ctttggcttc atcatcctgg tgtatctgct gatcaactgc agaaatacag gcccatggct 5820

gaagaaggtg ctgaagtgta acacccctga cccatccaag ttcttttctc agctgagctc 5880

cgagcacggc ggcgatgtgc agaagtggct gtctagcccc tttccttcct ctagcttcag 5940

ccctggagga ctggcacctg agatctcccc actggaggtg ctggagaggg acaaggtgac 6000

ccagctgctg ctgcagcagg ataaggtgcc agagcccgcc tccctgtcct ctaaccacag 6060

cctgacctcc tgctttacaa atcagggcta cttctttttc cacctgccag acgcactgga 6120

gatcgaggca tgtcaggtgt atttcacata cgatccctat agcgaggagg accctgatga 6180

gggagtggcc ggcgccccaa ccggaagctc ccctcagcca ctgcagccac tgagcggaga 6240

ggacgatgca tattgtacat ttccttcccg cgacgatctg ctgctgttct ctccaagcct 6300

gctgggagga ccatctccac ccagcaccgc acctggagga tccggggcag gggaggagcg 6360

gatgcctcca tctctgcagg agagagtgcc aagggactgg gatccacagc ctctgggacc 6420

acctacccct ggagtgccag acctggtgga tttccagcca ccccctgagc tggtgctgcg 6480

ggaggcagga gaggaggtgc cagacgcagg acctagagag ggcgtgagct ttccctggtc 6540

caggccacca ggacagggag agttccgcgc cctgaacgcc cggctgcccc tgaatacaga 6600

cgcctacctg tctctgcagg agctgcaggg ccaggatcct acccacctgg tgtgacgccg 6660

gcgctagtgt cgacgtagtg gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc 6720

ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac tggaagggct aattcactcc caacgaagac 6780

aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc 6840

tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct tgagtgcttc 6900

aatgtgtgtg ttggtttttt gtgtgt 6926

<210> 123

<211> 3020

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cocal envelope plasmid - 209

<400> 123

ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 60

gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 120

tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 180

aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 240

caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt 300

acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 360

ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 420

gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 480

gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 540
tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac 600
gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccgggc gagctcggat cctgagaact 660
tcagggtgag tctatgggac ccttgatgtt ttctttcccc ttcttttcta tggttaagtt 720
catgtcatag gaaggggaga agtaacaggg tacacatatt gaccaaatca gggtaatttt 780
gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata ctttttgtt tatcttattt 840
ctaatacttt ccctaatctc tttctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgcctct 900

ttgcaccatt ctaaagaata acagtgataa tttctgggtt aaggcaatag caatatttct 960
gcatataaat atttctgcat ataaattgta actgatgtaa gaggtttcat attgctaata 1020
gcagctacaa tccagctacc attctgcttt tattttatgg ttgggataag gctggattat 1080
tctgagtcca agctaggccc ttttgctaat catgttcata cctcttatct tcctcccaca 1140
gctcctgggc aacgtgctgg tctgtgtgct ggcccatcac tttggcaaag cacgtgagat 1200
ctgtctgaca tcctgcaggg ccgccaccat gaactttctg ctgctgacct tcatcgtgct 1260
gcctctgtgc agccacgcca agttttccat cgtgttccca cagtcccaga agggcaactg 1320

gaagaatgtg cccagctcct accactattg tccttctagc tccgaccaga actggcacaa 1380
tgatctgctg ggcatcacca tgaaggtgaa gatgcctaag acacacaagg ccatccaggc 1440
agatggatgg atgtgccacg cagccaagtg gatcaccaca tgtgactttc ggtggtacgg 1500
ccccaagtat atcacccaca gcatccactc catccagcct acaagcgagc agtgcaagga 1560
gtccatcaag cagaccaagc agggcacatg gatgtctccc ggcttccccc ctcagaactg 1620
tggctacgcc accgtgacag atagcgtggc agtggtggtg caggcaaccc cacaccacgt 1680
gctggtggat gagtatacag gcgagtggat cgacagccag tttcccaacg gcaagtgcga 1740

gaccgaggag tgtgagacag tgcacaattc taccgtgtgg tacagcgatt ataaggtgac 1800
cggcctgtgc gacgccacac tggtggatac cgagatcaca ttcttttccg aggacggcaa 1860
gaaggagtct atcggcaagc ccaacaccgg ctacaggtct aattacttcg cctatgagaa 1920
gggcgataag gtgtgcaaga tgaattattg taagcacgcc ggggtgcggc tgccaagcgg 1980
cgtgtggttt gagttcgtgg accaggacgt gtacgcagca gcaaagctgc cagagtgccc 2040
agtgggagca accatcagcg cccccaccca gacatctgtg gacgtgagcc tgatcctgga 2100
tgtggagaga atcctggact actccctgtg ccaggagaca tggtccaaga tccgctctaa 2160

gcagcccgtg agcccagtgg acctgtctta cctggcacca aagaaccctg gaacaggacc 2220

tgcctttacc atcatcaatg gcacactgaa gtacttcgag acccggtata tcagaatcga 2280

catcgataac ccaatcatct ccaagatggt gggcaagatc tccggctctc agaccgagag 2340

agagctgtgg acagagtggt tcccatacga gggcgtggag atcggcccca atggcatcct 2400

gaagacccct acaggctata agtttccact gttcatgatc ggccacggca tgctggactc 2460

tgatctgcac aagaccagcc aggccgaggt gtttgagcac ccacacctgg cagaggcacc 2520

aaagcagctg cccgaggagg agaccctgtt ctttggcgat acaggcatct ccaagaaccc 2580

tgtggagctg atcgagggct ggttttctag ctggaagtct accgtggtga cattcttttt 2640

cgccatcggc gtgttcatcc tgctgtacgt ggtggcaagg atcgtgatcg ccgtgcggta 2700

cagatatcag ggcagcaaca ataagagaat ctataatgac atcgagatgt ccaggttccg 2760

caagtgacgc cggcgtcgac gctcaacagc ctcgactgtg ccttctagtt gccagccatc 2820

tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct 2880

ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg 2940

gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg 3000

ggatgcggtg ggctctatgg 3020

<210> 124

<211> 5398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> helper plasmid 300 - gag/pol

<400> 124

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480

ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa 540

tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc 600

agatcactag aagcttagct gcgaagttgg tcgtgaggca ctgggcaggt aagtatcaag 660

gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggct tgtcgagaca gagaagactc 720

ttgcgtttct gataggcacc tattggtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca 780

ggtgtccact cccagttcaa ttacagctct taaggctagg atccgccgcc accatgggcg 840

cccgcgccag cgtgctttct ggcggcgagc tggacaggtg ggagaagatt cgcctgcggc 900

ctggaggaaa gaaaaagtac aagctgaagc acatcgtgtg ggcttctcgg gaactggaaa 960

gattcgccgt gaaccctgga ctgctagaga cctccgaagg ctgcagacag atcctgggac 1020

agctgcaacc tagcctgcag accggcagcg aggagctgag aagcctgtac aacaccgtcg 1080

ccaccctgta ttgtgtgcac caaagaatcg agatcaagga caccaaggag gctctggata 1140

agatcgagga agagcagaac aagagcaaga aaaaagccca gcaggccgcc gctgataccg 1200

gccattctaa tcaggtgtcc cagaactacc ccattgtgca aaatatccag ggccagatgg 1260

tccaccaggc catcagccct agaaccctga atgcctgggt gaaggtggtg gaagagaagg 1320

ccttttctcc agaggtgatc cctatgttca gcgccctgag cgagggcgct acccctcagg 1380

acctgaacac aatgctgaac accgtgggcg gccaccaggc cgccatgcag atgctgaaag 1440

aaaccatcaa cgaggaggcc gccgaatggg accgggtgca ccccgttcac gccggcccaa 1500

tcgcccctgg ccagatgcgg gaacctagag gcagcgacat cgccggcaca accagcacac 1560

tgcaagagca gatcggatgg atgacacaca acccccccat ccccgtgggc gaaatctaca 1620

agcggtggat cattctggga ctgaacaaaa tcgttagaat gtacagccct accagcatcc 1680

tggatatcag acagggccca aaggagcctt tccgggacta cgtggacaga ttttacaaga 1740

ccctgagagc cgaacaggcc tcccaagagg tgaagaactg gatgacagag accctgctgg 1800

tgcagaatgc caaccctgat tgtaagacaa tcctgaaggc cctcggacct ggcgctacac 1860

tggaagaaat gatgaccgcc tgccagggcg tgggcggccc cggccacaag gccagagtgc 1920

tggccgaggc tatgagccag gtgacaaacc ccgccacaat catgatccag aagggcaact 1980

tcagaaacca gcggaagacc gtgaaatgct tcaactgcgg caaggaaggc cacatcgcaa 2040

agaactgcag agcccctagg aagaaaggct gttggaagtg cggaaaggaa ggacaccaaa 2100

tgaaagattg tactgagaga caggctaatt ttttagggaa gatctggcct tcccacaagg 2160

gaaggccagg gaattttctt cagagcagac cagagccaac agccccacca gaagagagct 2220

tcaggtttgg ggaagagaca acaactccct ctcagaagca ggagccgata gacaaggaac 2280

tgtatccttt agcttccctc agatcactct ttggcagcga cccctcgtca caataaagat 2340

cggcggacag ctgaaagagg ccttgctgga caccggagcc gatgacaccg tgctggaaga 2400

aatgaacctg cctggaagat ggaaacctaa gatgatcggt ggcatcggcg gatttatcaa 2460

agtgcgacag tatgaccaga tcctgatcga gatttgcggc cacaaagcta tcggaacagt 2520

gctggtcggc ccgacccccg tgaacatcat tggccgcaac ctgctgacac agatcggttg 2580

tacactgaac tttcctatca gccctatcga aaccgtgccg gtcaagctga agcccggcat 2640

ggatggccct aaggtgaagc agtggcccct gacagaggaa aagatcaagg cactggtgga 2700

aatctgcaca gaaatggaaa aagagggcaa gatttctaaa atcggcccag agaaccccta 2760

caacacccct gttttcgcca tcaagaagaa agattccacc aagtggagga agctggtgga 2820

ctttcgggaa ctgaacaagc ggacccagga tttctgggag gtgcagctgg gcatccccca 2880

ccctgccggc ctgaaacaaa aaaaaagcgt gaccgtgctg gacgtgggcg acgcctattt 2940

cagcgtgcct ctggataagg acttccggaa atacaccgcc tttaccatcc ctagcatcaa 3000

caacgagacc cctggcatcc ggtaccagta caacgtgctc ccacagggct ggaagggctc 3060

acccgccatc ttccagtgca gcatgaccaa gatcctggag cctttcagaa agcagaatcc 3120

tgacatcgtg atctaccagt acatggacga cctgtacgtg ggctctgatc tggagatcgg 3180

acagcacaga acaaagatcg aagagctgag acagcatctg ctgagatggg gtttcaccac 3240

ccccgacaag aagcaccaga aggaacctcc ttttctgtgg atgggctacg agctgcaccc 3300

cgataagtgg acagtgcagc ccatcgtgct gcccgagaag gactcctgga ccgtgaacga 3360

cattcagaag ctggtcggaa agctgaattg ggcttcccaa atctacgccg gcatcaaggt 3420

gcggcagctg tgcaagcttc tgcgcggcac aaaggccctg acggaagtcg tgccactgac 3480

cgaggaagcc gaattagagc tggccgaaaa cagagaaatt ctgaaagaac ctgtgcacgg 3540

cgtttactac gacccttcta aggacctgat cgccgaaatc cagaaacaag gccagggcca 3600

gtggacttac caaatctacc aggagccttt caaaaacctc aagaccggca agtacgccag 3660

aatgaaggga gcccatacaa acgacgtgaa gcagctgaca gaggctgttc agaagatcgc 3720

cacagaaagc atcgtgatct ggggcaagac cccaaagttc aagctgccta tccaaaagga 3780

aacctgggag gcctggtgga ccgagtactg gcaggccacc tggattcctg aatgggagtt 3840

cgtgaacaca ccacctcttg tgaagctgtg gtaccagctg gaaaaggagc caatcatcgg 3900

cgccgagaca ttctacgtgg acggcgccgc caaccgggag accaaactgg gaaaggccgg 3960

atatgtgacc gacagaggca gacaaaaggt ggtgcctctg accgatacaa ctaaccagaa 4020

aacagagctg caggccattc acctggccct gcaagacagc ggcctggaag tgaatatcgt 4080

gacagacagt cagtacgccc tgggcatcat ccaggctcag cctgacaaga gcgagagcga 4140

gctggtgtcc cagatcatcg agcagctgat caaaaaggag aaggtttatc tggcctgggt 4200

gcccgcccac aagggcatcg gaggcaacga gcaggtggac aagctggtca gcgccggcat 4260

ccggaaggtg ctgttcctgg acggcatcga caaggcccag gaggaacacg agaagtacca 4320

cagcaactgg cgggccatgg ccagcgactt caacctgcca cctgtggttg ctaaggagat 4380

cgtcgcctct tgtgataagt gccagctgaa gggcgaggcc atgcacggcc aagtggattg 4440

cagccctggg atctggcagc tagactgtac ccacctggag ggcaaggtga tcctggtggc 4500

agtgcacgtg gccagcggct acatcgaggc tgaggtgatc cccgccgaaa cgggccagga 4560

gaccgcctac tttctgctga agctagccgg ccggtggcct gtgaagaccg tgcacaccga 4620

taacggcagc aatttcacca gcacaaccgt gaaggctgcc tgctggtggg ctggaatcaa 4680

gcaggagttc ggcatcccat acaatcctca gtctcagggc gtgatcgaga gcatgaacaa 4740

ggaactgaag aagatcattg gtcaggtcag agatcaggcc gagcacctga aaaccgccgt 4800

tcaaatggct gtgttcatcc ataacttcaa aagaaaaggc ggcatcggcg gctacagcgc 4860

cggcgaaaga atcgtggata tcatcgcgac cgacatccaa acaaaagagc tgcaaaagca 4920

aatcaccaag atccagaact tcagagtgta ctacagagat agcagagatc ctgtgtggaa 4980

gggacctgcc aagctgctgt ggaagggcga gggcgccgtg gtgatccagg acaatagcga 5040

catcaaggtc gtgcccagaa gaaaggctaa aatcattaga gactacggca aacagatggc 5100

cggagatgat tgcgtggctt ctagacagga cgaggactga taagaattcc atgtcgacgc 5160

tcaacagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctcccccgtg 5220

ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 5280

gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc 5340

aaggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatgg 5398

<210> 125

<211> 1153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> helper plasmid 246 - Rev

<400> 125

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480

ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa 540

tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc 600

agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac cgggccacca 660

tggccggcag aagcggcgac agcgacgagg atctgctgaa agccgtgcgg ctgatcaagt 720

tcctgtacca gagcaaccct cctcctaacc ccgagggcac cagacaggct agacggaacc 780

gcagaagaag gtggcgggaa cggcaaagac agatccactc tatcagcgag agaatcctga 840

gcacctacct gggaagatcc gccgagcctg tccccctgca gctgcctcca ctggaaagac 900

tgaccctgga ttgtaatgag gactgcggca caagcggaac ccagggcgtg ggcagccccc 960

agattctggt ggaatcccct acaatcctcg agtctggcgc caaggaatga taactagcac 1020

ctgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa 1080

taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg 1140

ggaggttttt taa 1153

<210> 126

<211> 2454

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 plasmid 224

<400> 126

ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 60

gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 120

tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 180

aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 240

caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt 300

acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 360

ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 420

gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 480

gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 540

tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac 600

gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccgggc gagctcggat cctgagaact 660

tcagggtgag tctatgggac ccttgatgtt ttctttcccc ttcttttcta tggttaagtt 720

catgtcatag gaaggggaga agtaacaggg tacacatatt gaccaaatca gggtaatttt 780

gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata ctttttttgtt tatcttattt 840

ctaatacttt ccctaatctc tttctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgcctct 900

ttgcaccatt ctaaagaata acagtgataa tttctgggtt aaggcaatag caatatttct 960

gcatataaat atttctgcat ataaattgta actgatgtaa gaggtttcat attgctaata 1020

gcagctacaa tccagctacc attctgcttt tattttatgg ttgggataag gctggattat 1080

tctgagtcca agctaggccc ttttgctaat catgttcata cctcttatct tcctcccaca 1140

gctcctgggc aacgtgctgg tctgtgtgct ggcccatcac tttggcaaag cacgtgagat 1200

ctgccaccat gggcgtgaaa gtgctgttcg ccctgatctg catcgcagtt gctgaagccg 1260

acatccagat gacccagtct cctagcagcc tcagcgctag cgtgggcgat agagtgacca 1320

tcacatgtag cgccagcagc agcgtgtcct acatgaactg gtaccagcaa acacctggaa 1380

aggcccctaa aaggtggatc tatgacacat ctaagctggc ttctggagtg ccatctagat 1440

tttctggcag cggctccggc actgattata cattcaccat cagcagcctg cagcccgagg 1500

atatcgccac ctactactgt cagcagtggt cctctaatcc cttcaccttc ggccagggca 1560

ccaagctgca gatcaccaga accagcggcg ggggaggaag cggcgggggа ggatctggcg 1620

gcggcggcag ccaggtgcag ctggtgcaga gcggcggcgg cgtggtgcaa cctggcagaa 1680

gcctgagact gagctgcaag gcctctggct acaccttcac ccggtacacc atgcattggg 1740

tgcggcaggc ccctggcaag ggcctggaat ggattggata catcaacccc agcagaggct 1800

acaccaacta caaccagaag gtgaaggaca gattcacaat ttctcgggac aacagcaaga 1860

ataccgcctt cctgcaaatg gactccctgc gcccagaaga taccggcgtg tacttctgcg 1920

ctagatatta cgacgaccac tactgcctgg actactgggg ccagggcacc cctgtgaccg 1980

tgtccagcgc ctccggagtg gaactgatcg agggctggtt cagcagctgg aaaagcaccg 2040

tggttacatt ctttttcgcc atcggcgtgt tcatcctgct gtacgtggtc gccagaattg 2100

tgatcgccgt gcggtataga taccagggca gcaacaacaa gcggatctac aacgacatcg 2160

agatgagcag attcagaaag taatgactcg aggtgaattc gcgccggcgt cgacgctcaa 2220

cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt 2280

ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcctttcctа ataaaatgag gaaattgcat 2340

cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg 2400

gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atgg 2454

<210> 127

<211> 2452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 plasmid - 232

<400> 127

ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 60

gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 120

tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 180

aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 240

caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt 300

acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 360

ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 420

gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 480

gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 540

tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc gcctggagac 600

gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccgggc gagctcggat cctgagaact 660

tcagggtgag tctatgggac ccttgatgtt ttctttcccc ttcttttcta tggttaagtt 720

catgtcatag gaaggggaga agtaacaggg tacacatatt gaccaaatca gggtaatttt 780

gcatttgtaa ttttaaaaaa tgctttcttc ttttaatata ctttttttgtt tatcttattt 840

ctaatacttt ccctaatctc tttctttcag ggcaataatg atacaatgta tcatgcctct 900

ttgcaccatt ctaaagaata acagtgataa tttctgggtt aaggcaatag caatatttct 960

gcatataaat atttctgcat ataaattgta actgatgtaa gaggtttcat attgctaata 1020

gcagctacaa tccagctacc attctgcttt tattttatgg ttgggataag gctggattat 1080

tctgagtcca agctaggccc ttttgctaat catgttcata cctcttatct tcctcccaca 1140

gctcctgggc aacgtgctgg tctgtgtgct ggcccatcac tttggcaaag cacgtgagat 1200

ctgccaccat gggcgtgaaa gtgctgttcg ccctgatctg catcgcagtt gctgaagccg 1260

acatccagat gacccagtct cctagcagcc tcagcgctag cgtgggcgat agagtgacca 1320

tcacatgtag cgccagcagc agcgtgtcct acatgaactg gtaccagcaa acacctggaa 1380

aggcccctaa aaggtggatc tatgacacat ctaagctggc ttctggagtg ccatctagat 1440

tttctggcag cggctccggc actgattata cattcaccat cagcagcctg cagcccgagg 1500

atatcgccac ctactactgt cagcagtggt cctctaatcc cttcaccttc ggccagggca 1560

ccaagctgca gatcaccaga accagcggcg ggggaggaag cggcggggga ggatctggcg 1620

gcggcggcag ccaggtgcag ctggtgcaga gcggcggcgg cgtggtgcaa cctggcagaa 1680

gcctgagact gagctgcaag gcctctggct acaccttcac ccggtacacc atgcattggg 1740

tgcggcaggc ccctggcaag ggcctggaat ggattggata catcaacccc agcagaggct 1800

acaccaacta caaccagaag gtgaaggaca gattcacaat ttctcgggac aacagcaaga 1860

ataccgcctt cctgcaaatg gactccctgc gcccagaaga taccggcgtg tacttctgcg 1920

ctagatatta cgacgaccac tactgcctgg actactgggg ccagggcacc cctgtgaccg 1980

tgtccagcgc ctccggacac ttcagcgagc ctgagatcac cctgatcatc ttcggcgtga 2040

tggccggagt gatcggcaca atcctgctga tcagctacgg catcagaaga ctgattaaga 2100

aatccccatc tgatgtgaag cctctgcctt ctcctgacac cgacgtcccc ctgagcagcg 2160

tggaaatcga gaaccccgaa accagcgacc agtgataaga attctagtcg acgctcaaca 2220

gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc 2280

ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg 2340

cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 2400

gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat gg 2452

<210> 128

<211> 3871

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KanR_p57M-MND-(anti)medCD3-Cocal-wPREw-BGHpA-001

<400> 128

gaacagagaa acaggagaat atgggccaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc 60

cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt 120

aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccgccc 180

tcagcagttt ctagagaacc atcagatgtt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc 240

ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc 300

tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc tggagacgcc 360

atccacgctg ttttgacttc catagaagcc tgcagggccg ccaccatggc actgcctgtg 420

acagccctgc tgctgccact ggccctgctg ctgcacgcag cacgcccaga tatccagatg 480

acccagtccc caagctccct gagcgcctcc gtgggcgacc gggtgacaat cacctgcagc 540

gcctctagct ccgtgtccta catgaactgg tatcagcaga cacctggcaa ggccccaaag 600

agatggatct acgataccag caagctggcc tccggcgtgc cttctaggtt ttctggcagc 660

ggctccggca cagattatac attcaccatc tctagcctgc agccagagga catcgccacc 720

tactattgcc agcagtggtc ctctaatccc tttacattcg gccagggcac caagctgcag 780

atcacaagaa cctctggagg aggaggaagc ggaggaggag gatccggcgg cggcggctct 840

caggtgcagc tggtgcagag cggaggagga gtggtgcagc caggcagaag cctgaggctg 900

tcctgtaagg cctctggcta cacattcacc agatatacaa tgcactgggt gaggcaggca 960

ccaggcaagg gactggagtg gatcggctac atcaacccct ccaggggcta caccaactat 1020

aatcagaagg tgaaggatcg gttcaccatc agcagggaca actccaagaa taccgccttc 1080

ctgcagatgg acagcctgag gccagaggat accggcgtgt acttttgcgc ccggtactat 1140

gacgatcact actgtctgga ttattggggc cagggaacac cagtgaccgt gagctccgcc 1200

gcagcaaagc ctaccacaac ccctgcccca aggccaccta cacccgcccc taccatcgcc 1260

tctcagccac tgagcctgag gccagaggca tccaggcctg ccgcaggggg ggccgtgcac 1320

acccggggcc tggactttgc ctctgatatg gcactgatcg tgctgggagg agtggcagga 1380

ctgctgctgt tcatcggact gggcatcttc ttttgcgtgc gctgtaggca ccggagaagg 1440

cagggatctg gagagggaag gggaagcctg ctgacatgcg gcgacgtgga ggagaaccca 1500

ggaccaaatt ttctgctgct gaccttcatc gtgctgcctc tgtgcagcca cgccaagttt 1560

tccatcgtgt tcccacagtc ccagaagggc aactggaaga atgtgccctc tagctaccac 1620

tattgccctt cctctagcga ccagaactgg cacaatgatc tgctgggcat cacaatgaag 1680

gtgaagatgc ccaagaccca caaggccatc caggcagatg gatggatgtg ccacgcagcc 1740

aagtggatca caacctgtga ctttcggtgg tacggcccca agtatatcac acactccatc 1800

cactctatcc agcctacctc cgagcagtgc aaggagtcta tcaagcagac aaagcagggc 1860

acctggatga gccctggctt cccaccccag aactgtggct acgccacagt gaccgactcc 1920

gtggcagtgg tggtgcaggc aacacctcac cacgtgctgg tggatgagta taccggcgag 1980

tggatcgaca gccagtttcc aaacggcaag tgcgagacag aggagtgtga gaccgtgcac 2040

aattctacag tgtggtacag cgattataag gtgacaggcc tgtgcgacgc caccctggtg 2100

gatacagaga tcaccttctt ttctgaggac ggcaagaagg agagcatcgg caagcccaac 2160

accggctaca gatccaatta cttcgcctat gagaagggcg ataaggtgtg caagatgaat 2220

tattgtaagc acgccggggt gcggctgcct agcggcgtgt ggtttgagtt cgtggaccag 2280

gacgtgtacg cagcagcaaa gctgcctgag tgcccagtgg gagcaaccat ctccgcccca 2340

acacagacct ccgtggacgt gtctctgatc ctggatgtgg agcgcatcct ggactacagc 2400
ctgtgccagg agacctggag caagatccgg tccaagcagc ccgtgtcccc tgtggacctg 2460
tcttacctgg caccaaagaa cccaggaacc ggaccagcct ttacaatcat caatggcacc 2520
ctgaagtact tcgagacccg ctatatccgg atcgacatcg ataaccctat catcagcaag 2580
atggtgggca agatctctgg cagccagaca gagagagagc tgtggaccga gtggttccct 2640
tacgagggcg tggagatcgg cccaaatggc atcctgaaga caccaaccgg ctataagttt 2700
cccctgttca tgatcggcca cggcatgctg gacagcgatc tgcacaagac ctcccaggcc 2760

gaggtgtttg agcacccaca cctggcagag gcaccaaagc agctgcctga ggaggagaca 2820
ctgttctttg gcgataccgg catctctaag aaccccgtgg agctgatcga gggctggttt 2880
tcctcttgga agagcacagt ggtgaccttc tttttcgcca tcggcgtgtt catcctgctg 2940
tacgtggtgg ccagaatcgt gatcgccgtg agatacaggt atcagggctc caacaataag 3000
aggatctata atgacatcga gatgtctcgc ttccggaagt gacgccggcg tcgacaatca 3060
acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaactatg ttgctccttt 3120
tacgctatgt ggatacgctg ctttaatgcc tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc 3180

tttcattttc tcctccttgt ataaatcctg gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc 3240
cgttgtcagg caacgtggcg tggtgtgcac tgtgtttgct gacgcaaccc ccactggttg 3300
gggcattgcc accacctgtc agctcctttc cgggactttc gctttccccc tccctattgc 3360
cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc ccgctgctgg acaggggctc ggctgttggg 3420
cactgacaat tccgtggtgt tgtcggggaa gctgacgtcc tttccatggc tgctcgcctg 3480
tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc cttctgctac gtcccttcgg ccctcaatcc 3540
agcggacctt ccttcccgcg gcctgctgcc ggctctgcgg cctcttccgc gtcttcgcct 3600

tcgccctcag acgagtcgga tctccctttg ggccgcctcc ccgcctgtgt gccttctagt 3660
tgccagccat ctgttgtttg cccctccccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact 3720
cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat 3780
tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc 3840
aggcatgctg gggatgcggt gggctctatg g 3871

<210> 129
<211> 4525
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> p57M-CMV-BGi-(anti)-med-hCD3-Cocal-BG-polyA

<

400> 129

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggа 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc 420

ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt 480

ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccca ttgacgcaaa 540

tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc 600

agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat 660

ccagcctccc ctcgaagctt acatgtggta ccgagctcgg atcctgagaa cttcagggtg 720

agtctatggg acccttgatg ttttctttcc ccttcttttc tatggttaag ttcatgtcat 780

aggaagggga gaagtaacag ggtacacata ttgaccaaat cagggtaatt ttgcatttgt 840

aattttaaaa aatgctttct tcttttaata tacttttttg tttatcttat ttctaatact 900

ttccctaatc tctttctttc agggcaataa tgatacaatg tatcatgcct ctttgcacca 960

ttctaaagaa taacagtgat aatttctggg ttaaggcaat agcaatattt ctgcatataa 1020

atatttctgc atataaattg taactgatgt aagaggtttc atattgctaa tagcagctac 1080

aatccagcta ccattctgct tttattttat ggttgggata aggctggatt attctgagtc 1140

caagctaggc ccttttgcta atcatgttca tacctcttat cttcctccca cagctcctgg 1200

gcaacgtgct ggtctgtgtg ctggcccatc actttggcaa agcacgtgag atctgaattc 1260

tgacactcct gcagggccgc caccatggca ctgcctgtga cagccctgct gctgccactg 1320

gccctgctgc tgcacgcagc acgcccagat atccagatga cccagtcccc aagctccctg 1380

agcgcctccg tgggcgaccg ggtgacaatc acctgcagcg cctctagctc cgtgtcctac 1440

atgaactggt atcagcagac acctggcaag gccccaaaga gatggatcta cgataccagc 1500

aagctggcct ccggcgtgcc ttctaggttt tctggcagcg gctccggcac agattataca 1560

ttcaccatct ctagcctgca gccagaggac atcgccacct actattgcca gcagtggtcc 1620

tctaatccct ttacattcgg ccagggcacc aagctgcaga tcacaagaac ctctggagga 1680

ggaggaagcg gaggaggagg atccggcggc ggcggctctc aggtgcagct ggtgcagagc 1740
ggaggaggag tggtgcagcc aggcagaagc ctgaggctgt cctgtaaggc ctctggctac 1800
acattcacca gatatacaat gcactgggtg aggcaggcac caggcaaggg actggagtgg 1860
atcggctaca tcaacccctc caggggctac accaactata atcagaaggt gaaggatcgg 1920
ttcaccatca gcagggacaa ctccaagaat accgccttcc tgcagatgga cagcctgagg 1980
ccagaggata ccggcgtgta cttttgcgcc cggtactatg acgatcacta ctgtctggat 2040
tattggggcc agggaacacc agtgaccgtg agctccgccg cagcaaagcc taccacaacc 2100

cctgccccaa ggccacctac acccgcccct accatcgcct ctcagccact gagcctgagg 2160
ccagaggcat ccaggcctgc cgcaggggggg gccgtgcaca cccggggcct ggactttgcc 2220
tctgatatgg cactgatcgt gctgggagga gtggcaggac tgctgctgtt catcggactg 2280
ggcatcttct tttgcgtgcg ctgtaggcac cggagaaggc agggatctgg agagggaagg 2340
ggaagcctgc tgacatgcgg cgacgtggag gagaacccag gaccaaattt tctgctgctg 2400
accttcatcg tgctgcctct gtgcagccac gccaagtttt ccatcgtgtt cccacagtcc 2460
cagaagggca actggaagaa tgtgccctct agctaccact attgcccttc ctctagcgac 2520

cagaactggc acaatgatct gctgggcatc acaatgaagg tgaagatgcc caagacccac 2580
aaggccatcc aggcagatgg atggatgtgc cacgcagcca agtggatcac aacctgtgac 2640
tttcggtggt acggccccaa gtatatcaca cactccatcc actctatcca gcctacctcc 2700
gagcagtgca aggagtctat caagcagaca aagcagggca cctggatgag ccctggcttc 2760
ccaccccaga actgtggcta cgccacagtg accgactccg tggcagtggt ggtgcaggca 2820
acacctcacc acgtgctggt ggatgagtat accggcgagt ggatcgacag ccagtttcca 2880
aacggcaagt gcgagacaga ggagtgtgag accgtgcaca attctacagt gtggtacagc 2940

gattataagg tgacaggcct gtgcgacgcc accctggtgg atacagagat caccttcttt 3000
tctgaggacg gcaagaagga gagcatcggc aagcccaaca ccggctacag atccaattac 3060
ttcgcctatg agaagggcga taaggtgtgc aagatgaatt attgtaagca cgccggggtg 3120
cggctgccta gcggcgtgtg gtttgagttc gtggaccagg acgtgtacgc agcagcaaag 3180
ctgcctgagt gcccagtggg agcaaccatc tccgccccaa cacagacctc cgtggacgtg 3240
tctctgatcc tggatgtgga gcgcatcctg gactacagcc tgtgccagga gacctggagc 3300
aagatccggt ccaagcagcc cgtgtcccct gtggacctgt cttacctggc accaaagaac 3360

ccaggaaccg gaccagcctt tacaatcatc aatggcaccc tgaagtactt cgagacccgc 3420

tatatccgga tcgacatcga taaccctatc atcagcaaga tggtgggcaa gatctctggc 3480

agccagacag agagagagct gtggaccgag tggttccctt acgagggcgt ggagatcggc 3540

ccaaatggca tcctgaagac accaaccggc tataagtttc ccctgttcat gatcggccac 3600

ggcatgctgg acagcgatct gcacaagacc tcccaggccg aggtgtttga gcacccacac 3660

ctggcagagg caccaaagca gctgcctgag gaggagacac tgttctttgg cgataccggc 3720

atctctaaga accccgtgga gctgatcgag ggctggtttt cctcttggaa gagcacagtg 3780

gtgaccttct ttttcgccat cggcgtgttc atcctgctgt acgtggtggc cagaatcgtg 3840

atcgccgtga gatacaggta tcagggctcc aacaataaga ggatctataa tgacatcgag 3900

atgtctcgct tccggaagtg acgccggcgc tcaaatcctg cacaacagat tcttcatgtt 3960

tggaccaaat caacttgtga taccatgctc aaagaggcct caattatatt tgagttttta 4020

atttttatga aaaaaaaaaa aaaaaacgga attcacccca ccagtgcagg ctgcctatca 4080

gaaagtggtg gctggtgtgg ctaatgccct ggcccacaag tatcactaag ctcgctttct 4140

tgctgtccaa tttctattaa aggttccttt gttccctaag tccaactact aaactggggg 4200

atattatgaa gggccttgag catctggatt ctgcctaata aaaaacattt attttcattg 4260

caatgatgta tttaaattat ttctgaatat tttactaaaa agggaatgtg ggaggtcagt 4320

gcatttaaaa cataaagaaa tgaagagcta gttcaaacct tgggaaaata cactatatct 4380

taaactccat gaaagaaggt gaggctgcaa acagctaatg cacattggca acagcccctg 4440

atgcctatgc cttattcatc cctcagaaaa ggattcaagt agaggcttga tttggaggtt 4500

aaagttttgc taatgctgta tttta 4525

<210> 130

<211> 2773

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cocal envelope plasmid - 143

<400> 130

gaacagagaa acaggagaat atgggccaaa caggatatct gtggtaagca gttcctgccc 60

cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt 120

aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccgccc 180

tcagcagttt ctagagaacc atcagatgtt tccagggtgc cccaaggacc tgaaatgacc 240

ctgtgcctta tttgaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc 300

tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc tggagacgcc 360

atccacgctg ttttgacttc catagaagcc tgcagggccg ccaccatgaa ctttctgctg 420

ctgaccttca tcgtgctgcc tctgtgcagc cacgccaagt tttccatcgt gttcccacag 480

tcccagaagg gcaactggaa gaatgtgccc agctcctacc actattgtcc ttctagctcc 540

gaccagaact ggcacaatga tctgctgggc atcaccatga aggtgaagat gcctaagaca 600

cacaaggcca tccaggcaga tggatggatg tgccacgcag ccaagtggat caccacatgt 660

gactttcggt ggtacggccc caagtatatc acccacagca tccactccat ccagcctaca 720

agcgagcagt gcaaggagtc catcaagcag accaagcagg gcacatggat gtctcccggc 780

ttccccccctc agaactgtgg ctacgccacc gtgacagata gcgtggcagt ggtggtgcag 840

gcaaccccac accacgtgct ggtggatgag tatacaggcg agtggatcga cagccagttt 900

cccaacggca agtgcgagac cgaggagtgt gagacagtgc acaattctac cgtgtggtac 960

agcgattata aggtgaccgg cctgtgcgac gccacactgg tggataccga gatcacattc 1020

ttttccgagg acggcaagaa ggagtctatc ggcaagccca acaccggcta caggtctaat 1080

tacttcgcct atgagaaggg cgataaggtg tgcaagatga attattgtaa gcacgccggg 1140

gtgcggctgc caagcggcgt gtggtttgag ttcgtggacc aggacgtgta cgcagcagca 1200

aagctgccag agtgcccagt gggagcaacc atcagcgccc ccacccagac atctgtggac 1260

gtgagcctga tcctggatgt ggagagaatc ctggactact ccctgtgcca ggagacatgg 1320

tccaagatcc gctctaagca gcccgtgagc ccagtggacc tgtcttacct ggcaccaaag 1380

aaccctggaa caggacctgc ctttaccatc atcaatggca cactgaagta cttcgagacc 1440

cggtatatca gaatcgacat cgataaccca atcatctcca agatggtggg caagatctcc 1500

ggctctcaga ccgagagaga gctgtggaca gagtggttcc catacgaggg cgtggagatc 1560

ggccccaatg gcatcctgaa gacccctaca ggctataagt ttccactgtt catgatcggc 1620

cacggcatgc tggactctga tctgcacaag accagccagg ccgaggtgtt tgagcaccca 1680

cacctggcag aggcaccaaa gcagctgccc gaggaggaga ccctgttctt tggcgataca 1740

ggcatctcca agaaccctgt ggagctgatc gagggctggt tttctagctg gaagtctacc 1800

gtggtgacat tctttttcgc catcggcgtg ttcatcctgc tgtacgtggt ggcaaggatc 1860

gtgatcgccg tgcggtacag atatcagggc agcaacaata agagaatcta taatgacatc 1920

gagatgtcca ggttccgcaa gtgacgccgg cgtcgacaat caacctctgg attacaaaat 1980

ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct tttacgctat gtggatacgc 2040

tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt tctcctcctt 2100

gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca ggcaacgtgg 2160

cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt tggggcattg ccaccacctg 2220

tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc 2280

cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca attccgtggt 2340

gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct 2400

gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc ttccttcccg 2460

cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg 2520

gatctccctt tgggccgcct ccccgcctgt gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 2580

tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa 2640

taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct gggggggtggg 2700

gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg 2760

gtgggctcta tgg 2773

<210> 131

<211> 6468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> helper plasmid gag/pol - 89

<400> 131

ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag 60

cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc 120

caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 180

gactttccat tgacgtcaat gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 240

tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc 300

ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 360

attagtcatc gctattacca tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 420

gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt 480

ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca 540

aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg 600

tcagatcgcc tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg 660

atccagcctc ccctcgaagc ttacatgtgg taccgagctc ggatcctgag aacttcaggg 720

tgagtctatg ggacccttga tgttttcttt ccccttcttt tctatggtta agttcatgtc 780

ataggaaggg gagaagtaac agggtacaca tattgaccaa atcagggtaa ttttgcattt 840

gtaattttaa aaaatgcttt cttcttttaa tatacttttt tgtttatctt atttctaata 900

ctttccctaa tctctttctt tcagggcaat aatgatacaa tgtatcatgc ctctttgcac 960

cattctaaag aataacagtg ataatttctg ggttaaggca atagcaatat ttctgcatat 1020

aaatatttct gcatataaat tgtaactgat gtaagaggtt tcatattgct aatagcagct 1080

acaatccagc taccattctg cttttatttt atggttggga taaggctgga ttattctgag 1140

tccaagctag gccctttgc taatcatgtt catacctctt atcttcctcc cacagctcct 1200

gggcaacgtg ctggtctgtg tgctggccca tcactttggc aaagcacgtg agatctgaat 1260

tcgagatctg ccgccgccat gggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg agaattagat 1320

cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt aaaacatata 1380

gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt agaaacatca 1440

gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg atcagaagaa 1500

cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcatcaaag gatagagata 1560

aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag taagaaaaaa 1620

gcacagcaag cagcagctga cacaggacac agcaatcagg tcagccaaaa ttaccctata 1680

gtgcagaaca tccaggggca aatggtacat caggccatat cacctagaac tttaaatgca 1740

tgggtaaaag tagtagaaga gaaggctttc agcccagaag tgatacccat gttttcagca 1800

ttatcagaag gagccacccc acaagattta aacaccatgc taaacacagt ggggggacat 1860

caagcagcca tgcaaatgtt aaaagagacc atcaatgagg aagctgcaga atgggataga 1920

gtgcatccag tgcatgcagg gcctattgca ccaggccaga tgagagaacc aaggggaagt 1980

gacatagcag gaactactag tacccttcag gaacaaatag gatggatgac acataatcca 2040

cctatcccag taggagaaat ctataaaaga tggataatcc tgggattaaa taaaatagta 2100

agaatgtata gccctaccag cattctggac ataagacaag gaccaaagga acccttaga 2160

gactatgtag accgattcta taaaactcta agagccgagc aagcttcaca agaggtaaaa 2220

aattggatga cagaaacctt gttggtccaa aatgcgaacc cagattgtaa gactatttta 2280

aaagcattgg gaccaggagc gacactagaa gaaatgatga cagcatgtca gggagtgggg 2340

ggacccggcc ataaagcaag agttttggct gaagcaatga gccaagtaac aaatccagct 2400

accataatga tacagaaagg caattttagg aaccaaagaa agactgttaa gtgtttcaat 2460

tgtggcaaag aagggcacat agccaaaaat tgcagggccc ctaggaaaaa gggctgttgg 2520

aaatgtggaa aggaaggaca ccaaatgaaa gattgtactg agagacaggc taatttttta 2580

gggaagatct ggccttccca caagggaagg ccagggaatt ttcttcagag cagaccagag 2640

ccaacagccc caccagaaga gagcttcagg tttggggaag agacaacaac tccctctcag 2700

aagcaggagc cgatagacaa ggaactgtat cctttagctt ccctcagatc actctttggc 2760

agcgacccct cgtcacaata aagatagggg ggcaattaaa ggaagctcta ttagatacag 2820

gagcagatga tacagtatta gaagaaatga atttgccagg aagatggaaa ccaaaaatga 2880

taggggggaat tggaggtttt atcaaagtaa gacagtatga tcagatactc atagaaatct 2940

gcggacataa agctataggt acagtattag taggacctac acctgtcaac ataattggaa 3000

gaaatctgtt gactcagatt ggctgcactt taaattttcc cattagtcct attgagactg 3060

taccagtaaa attaaagcca ggaatggatg gcccaaaagt taaacaatgg ccattgacag 3120

aagaaaaaat aaaagcatta gtagaaattt gtacagaaat ggaaaaggaa ggaaaaattt 3180

caaaaattgg gcctgaaaat ccatacaata ctccagtatt tgccataaag aaaaaagaca 3240

gtactaaatg gagaaaatta gtagatttca gagaacttaa taagagaact caagatttct 3300

gggaagttca attaggaata ccacatcctg cagggttaaa acagaaaaaa tcagtaacag 3360

tactggatgt gggcgatgca tatttttcag ttcccttaga taaagacttc aggaagtata 3420

ctgcatttac catacctagt ataaacaatg agacaccagg gattagatat cagtacaatg 3480

tgcttccaca gggatggaaa ggatcaccag caatattcca gtgtagcatg acaaaaatct 3540

tagagccttt tagaaaacaa aatccagaca tagtcatcta tcaatacatg gatgatttgt 3600

atgtaggatc tgacttagaa atagggcagc atagaacaaa aatagaggaa ctgagacaac 3660

atctgttgag gtggggattt accacaccag acaaaaaaca tcagaaagaa cctccattcc 3720

tttggatggg ttatgaactc catcctgata aatggacagt acagcctata gtgctgccag 3780

aaaaggacag ctggactgtc aatgacatac agaaattagt gggaaaattg aattgggcaa 3840

gtcagattta tgcagggatt aaagtaaggc aattatgtaa acttcttagg ggaaccaaag 3900

cactaacaga agtagtacca ctaacagaag aagcagagct agaactggca gaaaacaggg 3960

agattctaaa agaaccggta catggagtgt attatgaccc atcaaaagac ttaatagcag 4020

aaatacagaa gcaggggcaa ggccaatgga catatcaaat ttatcaagag ccatttaaaa 4080

atctgaaaac aggaaagtat gcaagaatga agggtgccca cactaatgat gtgaaacaat 4140

taacagaggc agtacaaaaa atagccacag aaagcatagt aatatgggga aagactccta 4200

aatttaaatt acccatacaa aaggaaacat gggaagcatg gtggacagag tattggcaag 4260

ccacctggat tcctgagtgg gagtttgtca ataccctcc cttagtgaag ttatggtacc 4320

agttagagaa agaacccata ataggagcag aaactttcta tgtagatggg gcagccaata 4380

gggaaactaa attaggaaaa gcaggatatg taactgacag aggaagacaa aaagttgtcc 4440

ccctaacgga cacaacaaat cagaagactg agttacaagc aattcatcta gctttgcagg 4500

attcgggatt agaagtaaac atagtgacag actcacaata tgcattggga atcattcaag 4560

cacaaccaga taagagtgaa tcagagttag tcagtcaaat aatagagcag ttaataaaaa 4620

aggaaaaagt ctacctggca tgggtaccag cacacaaagg aattggagga aatgaacaag 4680

tagataaatt ggtcagtgct ggaatcagga aagtactatt tttagatgga atagataagg 4740

cccaagaaga acatgagaaa tatcacagta attggagagc aatggctagt gattttaacc 4800

taccacctgt agtagcaaaa gaaatagtag ccagctgtga taaatgtcag ctaaaagggg 4860

aagccatgca tggacaagta gactgtagcc caggaatatg gcagctagat tgtacacatt 4920

tagaaggaaa agttatcttg gtagcagttc atgtagccag tggatatata gaagcagaag 4980

taattccagc agagacaggg caagaaacag catacttcct cttaaaatta gcaggaagat 5040

ggccagtaaa aacagtacat acagacaatg gcagcaattt caccagtact acagttaagg 5100

ccgcctgttg gtgggcgggg atcaagcagg aatttggcat tccctacaat ccccaaagtc 5160

aaggagtaat agaatctatg aataaagaat taaagaaaat tataggacag gtaagagatc 5220

aggctgaaca tcttaagaca gcagtacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa 5280

aaggggggat tggggggtac agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca 5340

tacaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca aaattttcgg gtttattaca 5400

gggacagcag agatccagtt tggaaaggac cagcaaagct cctctggaaa ggtgaagggg 5460

cagtagtaat acaagataat agtgacataa aagtagtgcc aagaagaaaa gcaaagatca 5520

tcagggatta tggaaaacag atggcaggtg atgattgtgt ggcaagtaga caggatgagg 5580

attaacacat ggaattccgg agcggccgca ggagctttgt tccttgggtt cttgggagca 5640

gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag acaattattg 5700

tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca acagcatctg 5760

ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga 5820

tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact catttgcacc 5880

actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat ttggaatcac 5940

acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttccg cggaattcac 6000

cccaccagtg caggctgcct atcagaaagt ggtggctggt gtggctaatg ccctggccca 6060

caagtatcac taagctcgct ttcttgctgt ccaatttcta ttaaaggttc ctttgttccc 6120

taagtccaac tactaaactg ggggatatta tgaagggcct tgagcatctg gattctgcct 6180

aataaaaaac atttattttc attgcaatga tgtatttaaa ttatttctga atattttact 6240

aaaaagggaa tgtgggaggt cagtgcattt aaaacataaa gaaatgaaga gctagttcaa 6300
accttgggaa aatacactat atcttaaact ccatgaaaga aggtgaggct gcaaacagct 6360
aatgcacatt ggcaacagcc cctgatgcct atgccttatt catccctcag aaaaggattc 6420
aagtagaggc ttgatttgga ggttaaagtt ttgctatgct gtatttta 6468

<210> 132
<211> 972
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> helper plasmid 84 - Rev
<400> 132

aatgtagtct tatgcaatac tcttgtagtc ttgcaacatg gtaacgatga gttagcaaca 60
tgccttacaa ggagagaaaa agcaccgtgc atgccgattg gtggaagtaa ggtggtacga 120

tcgtgcctta ttaggaaggc aacagacggg tctgacatgg attggacgaa ccactgaatt 180
ccgcattgca gagatattgt atttaagtgc ctagctcgat acaataaacg ccatttgacc 240
attcaccaca ttggtgtgca cctccaagct cgagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgcc 300
tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg atccagcctc 360
ccctcgaagc tagtcgatta ggcatctcct atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa 420
gacctcctca aggcagtcag actcatcaag tttctctatc aaagcaaccc acctcccaat 480
cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga 540

cagatccatt cgattagtga acggatcctt agcacttatc tgggacgatc tgcggagcct 600
gtgcctcttc agctaccacc gcttgagaga cttactcttg attgtaacga ggattgtgga 660
acttctggga cgcaggggggt gggaagccct caaatattgg tggaatctcc tacaatattg 720
gagtcaggag ctaaagaata gtgctgttag cttgctcaat gccacagcta tagcagtagc 780
tgaggggaca gatagggtta tagaagtagt acaagaagct tggcactggc cgtcgtttta 840
caacgtcgtg atctgagcct gggagatctc tggctaacta gggaacccac tgcttaagcc 900
tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 960

taactagaga tc 972

<210> 133
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3- CDR-L1

<400> 133

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 - CDR-L2

<400> 134

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 - CDR-L3

<400> 135

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

1 5

<210> 136

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 - CDR-H2

<400> 136

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Val Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 - CDR-H3

<400> 137

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 - CDR-L1

<400> 138

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 - CDR-L2

<400> 139

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 - CDR-L3

<400> 140

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 141

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 - CDR-H1

<400> 141

Asp Tyr Gly Val

1

<210> 142

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 - CDR-H2

<400> 142

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 143

<211> 12

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD19 - CDR-H3

<400> 143

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 144

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-CD3 - CDR-H1

<400> 144

Arg Tyr Thr Met His

1 5