



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0036874
(43) 공개일자 2020년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 38/1709 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004465
(22) 출원일자(국제) 2018년08월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/044740
(87) 국제공개번호 WO 2019/028098
국제공개일자 2019년02월07일
(30) 우선권주장
62/540,901 2017년08월03일 미국(US)

(71) 출원인
타이가 바이오테크놀로지스, 인코포레이티드
미국 80045-7336 콜로라도주 오로라 이스트 몬트
뷰 불리바드 12635
(72) 발명자
레파엘리 요세프
미국 80206 콜로라도주 덴버 스틸 스트리트 1115
터너 브라이언 씨
미국 80246 콜로라도주 덴버 사우스 글렌코 스트
리트 655
버드 그레고리 앨런
미국 80123 콜로라도주 리틀턴 사우스 셰리던 웨
이 5952
(74) 대리인
김진희, 김태홍

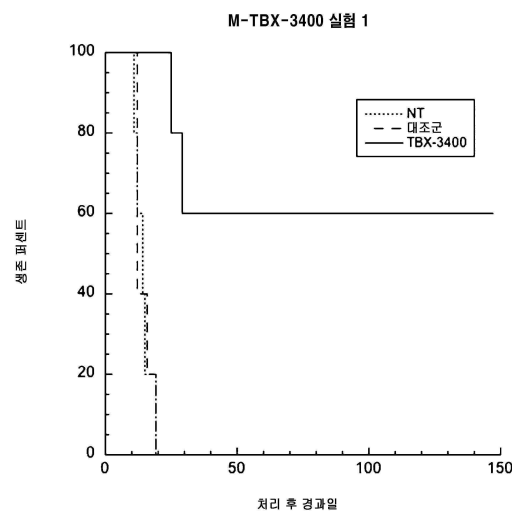
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본원은, 치료적 유효량의 항종양 활성을 갖는 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료를 위한 입양 세포 전달 방법으로서, 대상체에게 투여하기 전에 상기 면역 세포를 단백질 전달 도메인(PTD)-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 것인 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 (i) HIV TAT 단백질 전달 도메인; 및 (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/19 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C07K 14/82 (2013.01)

C12N 5/0634 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C07K 2319/10 (2013.01)

C07K 2319/41 (2013.01)

C12N 2740/16322 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열

을 포함하는 MYC 융합 펩타이드; 및

(b) 고형 종양을 갖는 공여자 대상체로부터 단리된 하나 이상의 일차 면역 세포로서, 상기 하나 이상의 일차 면역 세포는 종양 특이적 항원에 대해 반응성인 것인 하나 이상의 일차 면역 세포

를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 고형 종양이 암종, 선종, 선암종, 모세포종, 육종, 또는 림프종인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 고형 종양이 전이성 종양인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 고형 종양이 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 용모막암종, CNS 암, 결장암, 대장암, 결합 조직 암, 소화기관의 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 위암(gastric cancer), 교세포 종양, 두경부암, 간세포암, 간암종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 상피내 신생물(intra-epithelial neoplasm), 신장암(kidney cancer), 후두암, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 골수종, 신경모세포종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신세포암(renal cancer), 호흡기관의 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선 암종, 편평세포암, 위암(stomach cancer), 고환암, 갑상선암, 자궁암, 비뇨기관의 암, 또는 외음부암인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, MYC 융합 펩타이드가 서열번호: 1을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역 세포가 고형 종양 세포에 대한 항종양 활성을 갖는 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역 세포가 하나 이상의 림프구를 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 하나 이상의 림프구가 T 세포, B 세포, NK 세포, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 하나 이상의 림프구가 종양 침윤 림프구, T-세포 수용체 변형 림프구, 또는 키메라 항원 수용체 변형 림프구인 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 종양 침윤 림프구가 CD8+CD25+ 시그니처(signature) 또는 CD4+CD25+ 시그니처를 갖는 것인 조

성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역 세포가 검출 가능한 모이어티를 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

대상체에서 종양을 치료하는 방법으로서, 하나 이상의 변형된 면역 세포를 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 하나 이상의 변형된 면역 세포는 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드를 포함하고 종양 특이적 항원에 반응성인 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 대상체로부터 단리된 일차 면역 세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 동일한 유형의 암을 갖는 별개의 공여자 대상체로부터 단리된 일차 면역 세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 암종 또는 육종인 방법.

청구항 16

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 전이성 암인 방법.

청구항 17

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 용모막암종, CNS 암, 결장암, 대장암, 결합 조직 암, 소화기관의 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 위암, 교세포종양, 두경부암, 간세포암, 간암종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 골수종, 신경모세포종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신세포암, 호흡기관의 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선 암종, 편평세포암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 비뇨기관의 암, 또는 외음부암인 방법.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는, 단리 후 일차 면역 세포를 시험관내에서 MYC 융합 펩타이드와 접촉시킴으로써 제조되는 것인 방법.

청구항 19

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, MYC 융합 펩타이드와 접촉시키기 전 또는 후에, 일차 면역 세포를 시험관내에서 증식시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제12항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, MYC 융합 펩타이드가 서열번호: 1을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제12항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 대상체에서 암 세포에 대한 항종양 활성을 갖는 것인 방법.

청구항 22

제12항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 하나 이상의 아네르기(anergic) 면역 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제12항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역 세포가 하나 이상의 림프구를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 하나 이상의 림프구가 T 세포, B 세포, NK, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 하나 이상의 림프구가 종양 침윤 림프구, T-세포 수용체 변형 림프구, 또는 키메라 항원 수용체 변형 림프구인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 림프구가 $CD8^+CD28^-CD152^-$ 시그니처, $CD8+CD25+$ 시그니처, 또는 $CD4+CD25+$ 시그니처를 갖는 것인 방법.

청구항 27

제13항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 대상체로부터 일차 면역 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제12항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 정맥내로, 복강내로, 피하로, 근육내로, 또는 종양내로 투여되는 것인 방법.

청구항 29

제12항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포의 투여 전에 대상체에 대해 림프구 제거(lymphodepletion)을 실시하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

제12항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제12항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간 또는 동물인 방법.

청구항 32

제12항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 암 치료법을 실시하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 33

암 치료법을 위한 변형된 면역 세포를 제조하는 방법으로서, 하나 이상의 면역 세포를 시험관내에서 MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 면역 세포는 하나 이상의 종양 항원에 노출된 적이 있는 공여자로부터 유래된 것이고, 상기 MYC 융합 펩타이드는 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하고 종양 특이적 항원에 반응성인 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 암을 갖는 대상체로부터 분리된 일차 면역 세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, MYC 융합 펩타이드와 접촉시키기 전 또는 후에, 일차 면역 세포를 시험관내에서 증식시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, MYC 융합 펩타이드가 서열번호: 1을 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제33항 또는 제34항에 있어서, 하나 이상의 변형된 면역 세포가 항종양 활성을 갖는 것인 방법.

청구항 38

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역 세포가 T 세포, B 세포, NK, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역 세포가 종양 침윤 림프구, T-세포 수용체 변형 림프구, 또는 키메라 항원 수용체 변형 림프구인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 입양 세포 요법 또는 T-세포 요법의 효능을 증가시키는 방법.

청구항 41

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암을 치료하는 데 사용하기 위한 조성물.

청구항 42

암 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 8월 3일에 출원된 미국 가출원 제62/540,901호의 우선권의 이익을 주장하며, 그 전체 내용은 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출되고 그 전체가 본원에 참조로 편입되는 서열 목록을 포함한다. 2018년 7월 24일에 작성된 상기 ASCII 카피의 명칭은 106417-0333_SL.txt이며 크기는 22,015 바이트이다.

배경 기술

[0005] 입양 세포 전달(adoptive cell transfer; ACT)은 항종양 활성을 갖는 면역 세포를 환자 내로 전달하는 것을 포함하는 면역요법의 한 형태이다. ACT는 전형적으로 환자로부터 항종양 활성을 갖는 림프구를 분리하고, 림프구를 시험관내에서 배양하여 집단을 증식시킨 다음, 림프구를 암을 갖는 숙주 내로 주입하는 것을 포함한다. 입양 전달에 사용되는 림프구는 절개된 종양의 기질(stroma)로부터(예컨대, 종양 침윤성 림프구), 림프관 또는 림프절로부터, 또는 혈액으로부터 유래될 수 있다. 일부 경우, 분리된 림프구는 항종양 T 세포 수용체(T cell receptor; TCR) 또는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)를 발현하도록 유전적으로 조작된다. 주입에 사용되는 림프구는 공여자로부터(동종이계 ACT), 또는 암을 갖는 숙주로부터(자가 ACT) 분리될 수 있다.

발명의 내용

- [0006] 특정 구현예에서, 암 치료를 위한 입양 세포 전달 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 항종양 활성을 갖는 면역 세포의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 면역 세포는 대상체에게 투여하기 전에 단백질 전달 도메인(protein transduction domain; PTD)-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉되는 것인 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 하나 이상의 림프구를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 T 세포 및/또는 B 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 종양 침윤 림프구(tumor-infiltrating lymphocyte)를 포함한다. 일부 구현예에서, 암은 전이성 암이다. 일부 구현예에서, 암은 암종, 선종, 선암종, 모세포종, 육종, 또는 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 기저 세포암종, 담도암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 융모막암종(choriocarcinoma), CNS 암, 결장암, 대장암, 결합 조직암, 소화기관의 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 위암(gastric cancer), 교세포 종양, 두경부암, 간세포암, 간암종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 상피내 신생물(intra-epithelial neoplasm), 신장암(kidney cancer), 후두암, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 골수종, 신경모세포종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신세포암(renal cancer), 호흡기관의 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선 암종, 편평세포암, 위암(stomach cancer), 고환암, 갑상선암, 자궁암, 비뇨기관의 암, 또는 외음부암이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 고형 종양을 갖는 공여자 대상체로부터 입수된다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 전이성 종양이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 흑색종 또는 결장암을 갖는 공여자 대상체로부터 입수된다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체와 면역 세포를 받는 대상체는 동일하다(즉, 자가 ACT). 일부 구현예에서, 공여자 대상체와 면역 세포를 받는 대상체는 상이하다(즉, 동종이계 ACT).
- [0007] 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 (i) HIV TAT 단백질 전달 도메인; 및 (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 면역 세포의 핵으로 전위된다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 MYC의 생물학적 활성, 예컨대 MYC 표적 유전자의 활성화를 나타낸다. 일부 구현예에서, 융합 펩타이드는 서열번호: 1을 포함한다.
- [0008] 특정 구현예에서 (a) (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드; 및 (b) 종양을 갖는 공여자 대상체로부터 단리된 하나 이상의 일차 면역 세포를 포함하는 조성물로서, 하나 이상의 일차 면역 세포는 종양 특이적 항원에 대해 반응성인 것인 조성물이 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 하나 이상의 일차 면역 세포의 핵으로 전위된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 MYC의 생물학적 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 단백질 전달 도메인과 MYC 폴리펩타이드를 연결하는 하나 이상의 분자를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 하기 일반 구조를 갖는 MYC 융합 펩타이드를 포함한다:
- [0009] 단백질 전달 도메인-X-MYC 서열,
- [0010] 상기 식에서, -X-는 단백질 전달 도메인과 MYC 서열을 연결하는 분자이다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인 서열은 TAT 단백질 전달 도메인 서열이다. 일부 구현예에서, TAT 단백질 전달 도메인 서열은 TAT[48-57] 및 TAT[57-48]로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 서열번호: 1을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 아세틸화된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역 세포는 종양 세포에 대해 항종양 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역 세포는 하나 이상의 림프구를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 T 세포, B 세포, NK 세포, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포는 나이브(naive) T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 기억 T 세포, 활성화된 T 세포, 아네르기(anergic) T 세포, 관용(tolerant) T 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, B 세포는 나이브 B 세포, 혈장 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 아네르기 B 세포, 관용 B 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 B 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 종양 침윤 림프구, T-세포 수용체 변형 림프구, 또는 키메라 항원 수용체 변형 림프구이다. 일부 구현예에서, 종양 침윤 림프구는 CD8+CD25+ 시그니처(signature)를 갖는다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD4+CD25+ 시그니처를 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역 세포는 검출 가능한 표지자를 포함한다.
- [0011] 특정 구현예에서 하나 이상의 변형된 면역 세포를 종양의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 종양을 치료하는 방법으로서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드를 포함하며 종양 특이적 항원에 반응성인 것인 방법이 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 대상체로부터 단리된 일차 면역 세포로부터

유래된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 동일한 유형의 종양을 갖는 별개의 공여자 대상체로부터 단리된 일차 면역 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 단리 후 일차 면역 세포를 시험관내에서 MYC 융합 펩타이드와 접촉시킴으로써 제조된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 MYC 융합 펩타이드와 접촉시키기 전에 일차 면역 세포를 시험관내에서 증식시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 MYC 융합 펩타이드와 접촉한 후에 일차 면역 세포를 증식시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD3 항체를 사용하여 증식된다. 일부 구현예에서, 세포는 방사선 조사된 동종이계 피더 세포(feeder cell)를 사용하여 증식된다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 사이토카인의 존재하에 증식된다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 인터루킨-2이다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 면역 세포의 핵으로 전위된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 MYC의 생물학적 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 단백질 전달 도메인과 MYC 폴리펩타이드를 연결하는 하나 이상의 분자를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 하기 일반 구조를 갖는 MYC 융합 펩타이드를 포함한다:

[0012] 단백질 전달 도메인-X-MYC 서열,

[0013] 상기 식에서, -X-는 단백질 전달 도메인과 MYC 서열을 연결하는 분자이다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인 서열은 TAT 단백질 전달 도메인 서열이다. 일부 구현예에서, TAT 단백질 전달 도메인 서열은 TAT[48-57] 및 TAT[57-48]로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 서열번호: 1을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 아세틸화된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 대상체에서 종양 세포에 대해 항종양 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 대상체에서 종양 세포에 대해 항종양 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 암 세포는 고형 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 고형 종양은 전이성 종양이다. 일부 구현예에서, 암 세포는 흑색종 또는 결장 종양 세포이다. 일부 구현예에서, 암 세포는 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 융모막암종, CNS 암, 결장암, 대장암, 결합 조직 암, 소화기관의 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 위암, 교세포 종양, 두경부암, 간세포암, 간암종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 골수종, 신경모세포종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 신세포암, 호흡기관의 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선 암종, 편평세포암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 비뇨기관의 암, 또는 외음부암으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 고형 종양을 갖는 공여자 대상체로부터 입수된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 하나 이상의 아네르기 면역 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역 세포는 하나 이상의 림프구를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 T 세포, B 세포, NK, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포는 나이브 T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 기억 T 세포, 활성화된 T 세포, 아네르기 T 세포, 관용 T 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, B 세포는 나이브 B 세포, 혈장 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 아네르기 B 세포, 관용 B 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 B 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 종양 침윤 림프구, T-세포 수용체 변형 림프구, 또는 키메라 항원 수용체 변형 림프구이다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD8+CD28-CD152- 시그니처를 갖는다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD8+CD25+ 시그니처를 갖는다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD4+CD25+ 시그니처를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 공여자 대상체로부터 일차 면역 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 공여자 대상체는 암을 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 정맥내로, 복강내로, 피하로, 근육내로, 또는 종양내로 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 변형된 면역 세포의 투여 전에 대상체에 대해 림프구 제거(lymphodepletion)를 실시하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 사이토카인을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 하나 이상의 변형된 면역 세포의 투여 전, 동안, 또는 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 인터페론 α , 인터페론 β , 인터페론 γ , 보체 C5a, IL-2, TNF알파, CD40L, IL12, IL-23, IL15, IL17, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14-1, CCL14-2, CCL14-3, CCL15-1, CCL15-2, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23-1, CCL23-2, CCL24, CCL25-1, CCL25-2, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCR10, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCRL1, CCRL2, CX3CL1, CX3CR, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL9, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7 및 XCL2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 종양은 전이성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 또는 동물이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가의 암 치료법을 실시하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 암 치료법은 화학요법, 방사선 요법, 면역요법, 단클론 항체, 항암 핵산 또는 단백질, 항암 바이러스 또는 미생물, 및 이의 임의의 조합으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 검출 가능한 모이어티를 포함한다.

- [0014] 또한, 특정 구현예에서 하나 이상의 면역 세포를 시험관내에서 MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 치료법을 위한 변형된 면역 세포를 제조하는 방법으로서, 면역 세포는 하나 이상의 종양 항원에 노출된 적이 있는 공여자로부터 유래된 것이고, MYC 융합 펩타이드는 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하며 종양 특이적 항원에 반응성인 것인 방법이 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 종양을 갖는 대상체로부터 단리된 일차 면역 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 MYC 융합 펩타이드와 접촉시키기 전에 일차 면역 세포를 시험관내에서 증식시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 MYC 융합 펩타이드와 접촉한 후에 일차 면역 세포를 증식시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD3 항체를 사용하여 증식된다. 일부 구현예에서, 세포는 방사선 조사된 동종이계 피더 세포를 사용하여 증식된다. 일부 구현예에서, 세포는 외인성 사이토카인의 존재하에 증식된다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 인터루킨-2이다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 면역 세포의 핵으로 전위된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 MYC의 생물학적 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 단백질 전달 도메인과 MYC 폴리펩타이드를 연결하는 하나 이상의 분자를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 하기 일반 구조를 갖는 MYC 융합 펩타이드를 포함한다:
- [0015] 단백질 전달 도메인-X-MYC 서열,
- [0016] 상기 식에서, -X-는 단백질 전달 도메인과 MYC 서열을 연결하는 분자이다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인 서열은 TAT 단백질 전달 도메인 서열이다. 일부 구현예에서, TAT 단백질 전달 도메인 서열은 TAT[48-57] 및 TAT[57-48]로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 서열번호: 1을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 융합 펩타이드는 아세틸화된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 항종양 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 대상체에서 종양 세포에 대해 항종양 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 하나 이상의 아네르기 면역 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 면역 세포는 하나 이상의 림프구를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 T 세포, B 세포, NK, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포는 나이브 T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 기억 T 세포, 활성화된 T 세포, 아네르기 T 세포, 관용 T 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, B 세포는 나이브 B 세포, 혈장 B 세포, 활성화된 B 세포, 기억 B 세포, 아네르기 B 세포, 관용 B 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 B 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 림프구는 종양 침윤 림프구, T-세포 수용체 변형 림프구, 또는 키메라 항원 수용체 변형 림프구이다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD8+CD28-CD152- 시그니처를 갖는다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD8+CD25+ 시그니처를 갖는다. 일부 구현예에서, 림프구는 CD4+CD25+ 시그니처를 갖는다.
- [0017] 또한, 특정 구현예에서, (a) 종양 세포주에 노출된 적이 있는 하나 이상의 단리된 일차 면역 세포; 및 (b) (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드를 포함하는 조성물로서; 하나 이상의 일차 면역 세포는 종양 특이적 항원에 대해 반응성인 것인 조성물이 본원에 기재된다.
- [0018] 또한, 특정 구현예에서, 암을 치료하는 데 사용하기 위한 임의의 전술한 조성물이 본원에 기재된다. 또한, 특정 구현예에서, 암을 치료하는 의약의 제조 용도를 위한 임의의 전술한 조성물이 본원에 기재된다.
- [0019] 또한, 특정 구현예에서, 임의의 전술한 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 입양 세포 요법 또는 T-세포 요법의 효능을 증가시키는 방법이 본원에 기재된다.
- [0020] 또한, 특정 구현예에서, (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드를 포함하는 종양 침윤 림프구가 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 종양 침윤 림프구는 암을 갖는 대상체로부터 단리된 일차 종양 침윤 림프구로부터 유래된다.
- [0021] 또한, 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체 및 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드를 포함하는 림프구가 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 림프구는 암을 갖는 대상체로부터 단리된 일차 림프구로부터 유래된다.
- [0022] 또한, 특정 구현예에서, 하나 이상의 일차 면역 세포를 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는 입양 세포 요법을 위한 조성물을 제조하는 방법으로서, 하나 이상의 일차 면역 세포는 종양을 갖는 환자로부터 단리되고, 하나 이상의 일차 면역 세포는 종양 특이적 항원에 반응성인 것인 방법이 본원에 기재된다.
- [0023] 또한 암을 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 제공된 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변

형된 면역 세포를 포함하는 키트가 제공된다. 일부 구현예에서, 키트는 투여된 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 제공된 MYC-융합 폴리펩타이드로 치료하기 위한 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포, 공여자 백혈구, T 세포, 또는 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 사용하기 위한 관련 설명서를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은 1시간 동안 TAT-MYC로 처리된 종양을 갖는 공여자 마우스의 림프구의 주입 후 흑색종 종양을 갖는 마우스의 생존 결과를 예시한다. 마우스를 TAT-MYC 림프구로 처리하거나, 대조군 단백질로 처리된 림프 세포로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.

도 2는 TAT-MYC로 처리된 종양을 갖는 공여자 마우스의 림프구의 주입 후 흑색종 종양을 갖는 마우스의 생존 결과를 예시한다(도 1에 나타난 실험의 반복). 마우스를 TAT-MYC 림프구로 처리하거나, 대조군 단백질로 처리된 림프 세포로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.

도 3은 TAT-MYC로 처리된 종양을 갖는 공여자 마우스의 상이한 양의 림프구의 주입 후 흑색종 종양을 갖는 마우스의 생존 결과를 예시한다. 마우스를 TAT-MYC 림프구로 처리하거나, 대조군 단백질로 처리된 림프 세포로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.

도 4는 TAT-MYC로 처리된 종양을 갖는 공여자 마우스의 상이한 양의 림프구의 주입 후 흑색종 종양을 갖는 마우스의 생존 결과를 예시한다. 마우스를 TAT-MYC 림프구로 처리하거나, 대조군 단백질로 처리된 림프 세포로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.

도 5는 TAT-MYC로 처리된 종양을 갖는 공여자 마우스의 림프구의 주입 후 결장 종양을 갖는 마우스의 생존 결과를 예시한다. 마우스를 TAT-MYC 림프구로 처리하거나, 대조군 단백질로 처리된 림프 세포로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.

도 6은 TAT-MYC로 처리된 종양을 갖는 공여자 마우스의 상이한 양의 림프구의 주입 후 결장 종양을 갖는 마우스의 생존 결과를 예시한다. 마우스를 TAT-MYC 림프구로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

본 개시내용은 본 출원에 기재된 특정 구현예에 제한되지 않으며, 본 개시내용의 개별 양태의 단일 예시로서 의도된다. 본 개시내용의 모든 다양한 구현예가 본원에 기재되지는 않을 것이다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 개시내용의 많은 변형 및 변화가 그의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 이뤄질 수 있다. 본원에 열거된 것 외에도, 본 개시내용의 범주 내에 속하는 기능적으로 동등한 방법 및 장치는 전술한 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 이러한 변형 및 변화는 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다. 본 개시내용은, 이러한 청구범위의 등가물의 전체 범주와 함께, 첨부된 청구범위의 용어에 의해서만 제한된다.

[0026]

본 개시내용은 물론 다양할 수 있는 특정 용도, 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 설명하기 위한 것이며 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0027]

또한, 본 개시내용의 특징 또는 양태가 마쿠쉬 그룹과 관련하여 설명되는 경우, 당업자는 본 개시내용이 또한 마쿠쉬 그룹의 임의의 개별 구성원 또는 구성원의 하위그룹과 관련하여 설명됨을 인식할 것이다.

[0028]

당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 특히 기재된 설명을 제공하는 측면에서, 임의의 및 모든 목적을 위해, 본원에 개시된 모든 범위는 또한 임의의 및 모든 가능한 하위범위 및 이의 하위범위의 조합을 포함한다. 임의의 열거된 범위는 상기 범위가 적어도 동일한 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10 등으로 나뉘는 것을 충분히 기술하고 가능하게 하는 것으로 쉽게 인식될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에 논의된 각각의 범위는 하부 1/3, 중간 1/3 및 상부 1/3 등으로 쉽게 나뉠 수 있다. 또한, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, "최대," "적어도," "초과," "미만," 등과 같은 모든 언어는 언급된 수를 포함하고, 후에 상기 논의된 바와 같은 하위범위로 나뉠 수 있는 범위를 지칭한다. 마지막으로, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1-3개의 셀을 갖는 그룹은 1, 2, 또는 3개의 셀을 갖는 그룹을 지칭한다. 유사하게, 1-5개의 셀을 갖는 그룹은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 셀을 갖는 그룹 등을 지칭한다.

- [0029] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 갖는 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0030] **I. 정의**
- [0031] 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기술하기 위한 것이며 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 단수형의 표현은, 맥락이 명확히 달리 나타내지 않는 한 복수형도 포함하는 것으로 의도된다.
- [0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 값이 $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$ 또는 $\pm 5\%$ 로 변할 수 있고 본 개시내용의 범주 내에 유지될 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, "약 200 IU/mL의 농도"는 160 IU/mL 내지 240 IU/mL의 농도를 포함한다.
- [0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 대상체에게 제제의 "투여"는 그의 의도된 기능을 수행하기 위해 대상체에게 제제를 도입 또는 전달하는 임의의 경로를 포함한다. 투여는 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의해 수행될 수 있다. 투여는 자가 투여 및 다른 것에 의한 투여를 포함한다.
- [0034] 용어 "아미노산"은 자연발생 및 비자연발생 아미노산뿐만 아니라 자연발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린) 및 피로리신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 자연발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 갖는 물질, 즉, 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기에 결합된 α 탄소, 예컨대 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 이러한 유사체는 변형된 R기(예컨대, 노르류신) 또는 변형된 펩타이드 백본을 갖지만, 자연발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드를 형성하는 아미노산은 D 형태이다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드를 형성하는 아미노산은 L 형태이다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드를 형성하는 제1 복수의 아미노산은 D 형태이고, 제2 복수는 L 형태이다.
- [0035] 아미노산은 이들의 일반적으로 공지된 3문자 기호에 의해 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명 위원회에 의해 권고되는 1문자 기호에 의해 본원에서 지칭된다. 마찬가지로, 뉴클레오타이드는 이들의 일반적으로 허용되는 단일 문자 코드로 지칭된다.
- [0036] 용어 "폴리펩타이드," "펩타이드," 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 자연발생 아미노산 중합체뿐만 아니라 하나 이상의 아미노산 잔기가 비자연발생 아미노산, 예컨대, 아미노산 유사체인 아미노산 중합체에 적용된다. 상기 용어는 전장 단백질을 포함하는 임의의 길이의 아미노산 사슬을 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 공유성 펩타이드 결합에 의해 연결된다.
- [0037] 본원에 사용된 바와 같이, "대조군"은 비교를 위해 실험에 사용되는 대안적인 샘플이다. 대조군은 "양성" 또는 "음성"일 수 있다. 예를 들어, 실험의 목적이 특정 유형의 질환의 치료를 위한 치료제의 효능의 상관관계를 결정하고자 하는 경우, 양성 대조군(원하는 치료적 효과를 나타내는 것으로 알려진 조성물) 및 음성 대조군(요법을 받지 않거나 위약을 받는 대상체 또는 샘플)이 전형적으로 사용된다.
- [0038] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 원하는 치료 효과를 달성하는 데 충분한 제제의 양을 지칭한다. 치료적 적용의 맥락에서, 대상체에게 투여되는 치료 펩타이드의 양은 감염의 유형 및 중증도 및 개체의 특징, 예컨대 일반 건강, 연령, 성별, 체중 및 약물에 대한 내성에 따라 달라질 수 있다. 그것은 또한 질환의 정도, 중증도 및 유형에 따라 달라질 수 있다. 당업자는 이들 및 다른 인자에 의존하여 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 폴리뉴클레오타이드가 mRNA로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA가 후에 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드가 게놈 DNA로부터 유래되는 경우, 발현은 진행 세포에서 mRNA의 스플라이싱(splicing)을 포함할 수 있다. 유전자의 발현 수준은 세포 또는 조직 샘플에서 mRNA 또는 단백질의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 일 양태에서, 하나의 샘플로부터의 유전자의 발현 수준은 대조군 또는 참조 샘플로부터의 상기 유전자의 발현 수준과 직접 비교될 수 있다. 또 다른 양태에서, 하나의 샘플로부터의 유전자의 발현 수준은 본원에 개시된 조성물의 투여 후 동일한 샘플로부터의 상기 유전자의 발현 수준과 직접 비교될 수 있다. 용어 "발현"은 또한 하기 사건 중 하나 이상을 지칭한다: (1) 세포 내에서 DNA 서열로부터 RNA 주형의 생성(예컨대, 전사에 의해); (2) 세포 내에서 RNA 전사체의 가

공(예컨대, 스플라이싱, 편집, 5' 캡 형성, 및/또는 3' 말단 형성에 의해); (3) 세포 내에서 RNA 서열의 폴리펩타이드 또는 단백질로의 번역; (4) 세포 내에서 폴리펩타이드 또는 단백질의 번역후 변형; (5) 세포 표면 상에 폴리펩타이드 또는 단백질의 제시; 및 (6) 세포로부터 폴리펩타이드 또는 단백질의 분비 또는 제시 또는 방출.

- [0040] 용어 "링커"는 2개의 서열을 연결하는, 예컨대, 2개의 폴리펩타이드 도메인을 연결하는 합성 서열(예컨대, 아미노산 서열)을 지칭한다. 일부 구현예에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 서열을 함유한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "동결건조된," "동결건조" 등은 건조될 물질(예컨대, 나노입자)이 먼저 동결된 후 얼음 또는 동결된 용매가 진공 환경에서의 승화(sublimation)에 의해 제거되는 과정을 지칭한다. 저장 시 동결건조된 생성물의 안정성을 향상시키기 위해 부형제가 예비 동결건조된 제제에 포함될 수 있다. 동결건조된 샘플은 추가의 부형제를 더 함유할 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 면역 세포는 면역 반응에서 역할을 하는 임의의 세포를 지칭한다. 면역 세포는 조혈 기원이며, 림프구, 예컨대 B 세포 및 T 세포; 자연 살해 세포; 골수 세포, 예컨대 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 호산구, 호중구, 비만 세포, 호염기구, 및 과립구를 포함한다.
- [0043] 용어 "림프구"는 조직 특이적이고 특화된 종류를 포함하는 모든 미성숙, 성숙, 미분화 및 분화 백색 림프구 집단을 지칭한다. 그것은 비제한적인 예로서, B 세포, T 세포, NKT 세포, 및 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 림프구는 전-B 세포(pre-B cell), 전구 B 세포(progenitor B cell), 초기 프로-B 세포(early pro-B cell), 후기 프로-B 세포(late pro-B cell), 큰 전-B 세포(large pre-B cell), 작은 전-B 세포(small pre-B cell), 미성숙 B 세포, 성숙 B 세포, 혈장 B 세포, 기억 B 세포, B-1 세포, B-2 세포 및 아네르기 AN1/T3 세포 집단을 포함하는 모든 B 계통을 포함한다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 T-세포는 나이브 T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 기억 T 세포, 활성화된 T 세포, 아네르기 T 세포, 관용 T 세포, 키메라 B 세포, 및 항원 특이적 T 세포를 포함한다.
- [0045] 용어 "B 세포" 또는 "B 세포들"은 비제한적인 예로서, 전-B 세포, 전구 B 세포, 초기 프로-B 세포, 후기 프로-B 세포, 큰 전-B 세포, 작은 전-B 세포, 미성숙 B 세포, 성숙 B 세포, 나이브 B 세포, 혈장 B 세포, 활성화된 B 세포, 아네르기 B 세포, 관용 B 세포, 키메라 B 세포, 항원 특이적 B 세포, 기억 B 세포, B-1 세포, B-2 세포 및 아네르기 AN1/T3 세포 집단을 지칭한다. 일부 구현예에서, 용어 B 세포는 그의 세포 표면 상에 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄를 발현하는 B 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 용어 B 세포는 면역글로불린 중쇄 및/또는 경쇄를 발현하고 분비하는 B 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 용어 B 세포는 그의 세포 표면 상에서 항원에 결합하는 세포를 포함한다. 본원에 개시된 일부 구현예에서, B 세포 또는 AN1/T3 세포는 기술된 과정에 이용된다. 특정 구현예에서, 이러한 세포는, 예컨대, 조혈 줄기 세포, 나이브 B 세포, B 세포, 전-B 세포, 전구 B 세포, 초기 프로-B 세포, 후기 프로-B 세포, 큰 전-B 세포, 작은 전-B 세포, 미성숙 B 세포, 성숙 B 세포, 혈장 B 세포, 기억 B 세포, B-1 세포, B-2 세포, 아네르기 B 세포, 또는 아네르기 AN1/T3 세포를 포함하는 항체를 발현하는 데 적합하거나, 발현할 수 있거나(예컨대, 유도성 발현), 또는 이를 발현하는 데 적합한 세포로 분화될 수 있는 임의의 동물 세포로 선택적으로 치환된다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같이 "입양 세포 치료 조성물"은 입양 세포 전달에 적합한 세포를 포함하는 임의의 조성물을 지칭한다. 예시적인 구현예에서, 입양 세포 치료 조성물은 종양 침윤성 림프구(TIL), TCR(즉, 이중 T-세포 수용체) 변형 림프구 및 CAR(즉, 키메라 항원 수용체) 변형 림프구로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 유형을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 입양 세포 치료 조성물은 T-세포, CD8+ 세포, CD4+ 세포, NK-세포, 델타-감마 T-세포, 조절 T-세포 및 말초 혈액 단핵 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 유형을 포함한다. 또 다른 구현예에서, TIL, T-세포, CD8+ 세포, CD4+ 세포, NK-세포, 델타-감마 T-세포, 조절 T-세포 또는 말초 혈액 단핵 세포가 입양 세포 치료 조성물을 형성한다. 일 구현예에서, 입양 세포 치료 조성물은 T 세포를 포함한다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같이 "종양 침윤 림프구" 또는 TIL은 혈류를 떠나 종양으로 이동한 백혈구를 지칭한다.
- [0048] 용어 "MYC" 및 "MYC 유전자"는 동의어이다. 이들은 MYC 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 지칭한다. MYC 유전자는 NCBI 등록번호 NM-002467의 서열과 적어도 60% 내지 100% 동일하거나 상동인, 예컨대, 적어도 60, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 약 70% 내지 약 100%로부터의 임의의 다른 퍼센트 동일한 적어도 120개의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 유전자는 원 종양 유전자(proto-oncogene)이다. 특정 경우에, MYC 유전자는 염색체 8 상의 8q24.21에서 발견된다. 특정 경우에, MYC 유전자는 프터(pter)로부터 128,816,862 bp에서 시작하고 프터로부터

128,822,856 bp에서 끝난다. 특정 경우에, MYC 유전자는 약 6 kb이다. 특정 경우에, MYC 유전자는 적어도 8개의 별개의 mRNA 서열-5개의 대안적으로 스플라이싱된 변이체 및 3개의 비스플라이싱된 변이체를 코딩한다.

[0049] 용어 "MYC 단백질," "MYC 폴리펩타이드," 및 "MYC 서열"은 동의어이며, NCBI 등록번호 UniProtKB/Swiss-Prot:P01106.1(MYC 아이소타입 1) 또는 NP_002458.2(UniProtKB/Swiss-Prot:P01106.2; MYC 아이소타입 2)에 개시된 아미노산 잔기의 중합체, 및 이의 기능적 상동체, 유사체 또는 단편을 지칭한다. UniProtKB/Swiss-Prot:P01106.1의 서열은 다음과 같다:

```
MPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPLSPSRRSGLCSPSYVAVT
PFSLRGNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNII IQDCMWSGFSAAKLVSEKLASYQAAR
KDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFYPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDLSSTESSPQGS
PEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAP
PSTRKDYPAAKRVKLDVSVRLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKA
PKVVILKKATAYILSVQAEQKLI SEEDLLKRREQLKHKLEQLRNSCA (서열번호: 2)
```

[0050]
[0051] NP_002458.2(UniProtKB/Swiss-Prot:P01106.2)의 서열은 다음과 같다:

```
MDFFRVVENQPPATMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPLSP
SRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNII IQDCMWSGFSAA
AKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFYPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPS
SDSLLSSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVL
KRCHVSTHQHNYAAPSTRKDYPAAKRVKLDVSVRLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFF
ALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAEQKLI SEEDLLKRREQLKHKLEQLRNSCA (서열번호: 11)
```

[0052]
[0053] 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 완전한 MYC 폴리펩타이드 서열이다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 부분적인 MYC 폴리펩타이드 서열이다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 서열번호: 2 또는 11의 적어도 400개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 서열번호: 2 또는 11의 적어도 400개의 연속적인 아미노산을 포함하며, 적어도 하나의 MYC 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 서열번호: 2 또는 11의 적어도 400개, 적어도 410개, 적어도 420개, 적어도 430개, 또는 적어도 450개의 연속적인 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 서열번호: 2 또는 11의 적어도 400개, 적어도 410개, 적어도 420개, 적어도 430개, 또는 적어도 450개의 연속적인 아미노산을 포함하며, 적어도 하나의 MYC 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 c-MYC이다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드 서열은 하기에 나타낸 서열을 포함한다:

```
MDFFRVVENQPPATMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPLSP
SRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNII IQDCMWSGFSAA
AKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFYPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPS
SDSLLSSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVL
KRCHVSTHQHNYAAPSTRKDYPAAKRVKLDVSVRLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFF
ALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAEQKLI SEEDLLKRREQLKHKLEQLR (서열번호: 3),
```

[0054]
[0055] 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드 서열은 하기에 나타낸 서열을 포함한다:

```
PLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPLSPSRRSGLCSPSYVAVTP
FSLRGNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNII IQDCMWSGFSAAKLVSEKLASYQAARK
DSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASECIDPSVVFYPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDLSSTESSPQGS
EPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEIDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCHVSTHQHNYAAP
STRKDYPAAKRVKLDVSVRLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAP
KVVILKKATAYILSVQAEQKLI SEEDLLKRREQLKHKLEQLR (서열번호: 4),
```

[0056]

[0057] 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 NCBI 등록번호 NP002458.2 또는 UniProtKB/Swiss-Prot 등록번호 P01106.1의 서열과 적어도 40% 내지 100% 동일한, 예컨대, 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 90%, 91%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 약 40% 내지 약 100%로부터의 임의의 다른 퍼센트 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 임의의 번역후 변형을 겪지 않은 MYC 폴리펩타이드인 439개 아미노산의 중합체를 지칭한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 번역후 변형을 겪은 439개 아미노산의 중합체를 지칭한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 48,804 kDa이다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 기본 나선-루프-나선 류인 지퍼(bHLH/LZ) 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, bHLH/LZ 도메인은 ELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLR (서열번호: 5)의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 전사 인자(예컨대, 전사 인자 64)이다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 E-박스 DNA 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 CACGTG를 포함하는 서열에 결합한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 세포 생존 및/또는 증식 중 하나 이상을 촉진한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 상기 기재된 것 중 하나 이상을 포함하며, 하나 이상의 번역후 변형(예컨대, 아세틸화)을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 하나 이상의 추가의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드는 폴리펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에서 하나 이상의 추가의 펩타이드에 연결된다.

[0058] 본원에 기재된 방법에 사용하는 데 적합한 단백질은 또한 본원에 기재된 임의의 단백질의 아미노산 서열과 비교하여, 1 내지 15개의 아미노산 변화, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 갖는 단백질을 포함하는 기능적 변이체를 포함한다. 다른 구현예에서, 변경된 아미노산 서열은 본원에 기재된 임의의 단백질의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일하며, 예컨대, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다. 이러한 서열-변이 단백질은 변경된 아미노산 서열이 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 기능하는 데 충분한 생물학적 활성을 보유하는 한 본원에 기재된 방법에 적합하다. 아미노산 치환이 이뤄지는 경우, 치환은 보존적 아미노산 치환일 수 있다. 일반적인 자연발생 아미노산 중에서, 예를 들어, "보존적 아미노산 치환"은 각각의 하기 군 내의 아미노산 사이의 치환에 의해 예시된다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 루신, 및 이소류신, (2) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판, (3) 세린 및 트레오닌, (4) 아스파테이트 및 글루타메이트, (5) 글루타민 및 아스파라긴, 및 (6) 리신, 아르기닌 및 히스티딘. BLOSUM62 표는 500개 초과 관련 단백질 군의 고도로 보존된 영역을 나타내는, 단백질 서열 세그먼트의 약 2,000개의 국소 다중 정렬로부터 유래된 아미노산 치환 매트릭스이다(Henikoff *et al.*, (1992), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89:10915- 10919). 따라서, BLOSUM62 치환 빈도는, 일부 구현예에서, 본원에 기재되거나 개시된 아미노산 서열 내로 도입되는 보존적 아미노산 치환을 정의하는 데 사용된다. 화학적 특성만을 기초로 아미노산 치환을 설계할 수 있지만(상기에 논의된 바와 같이), 표현 "보존적 아미노산 치환"은 바람직하게는 -1 초과 BLOSUM62 값으로 표시되는 치환을 지칭한다. 예를 들어, 치환이 0, 1, 2, 또는 3의 BLOSUM62 값을 특징으로 하는 경우 아미노산 치환은 보존적이다. 이 시스템에 따르면, 바람직한 보존적 아미노산 치환은 적어도 1(예컨대, 1, 2 또는 3)의 BLOSUM62 값을 특징으로 하는 반면, 보다 바람직한 보존적 아미노산 치환은 적어도 2(예컨대, 2 또는 3)의 BLOSUM62 값을 특징으로 한다.

[0059] 문구 "E-박스 서열(E-box sequence)" 및 "인핸서 박스 서열(enhancer box sequence)"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 뉴클레오타이드 서열 CANNTG를 의미하고, 여기서 N은 임의의 뉴클레오타이드이다. 특정 경우에, E-박스 서열은 CACGTG를 포함한다. 특정 경우에, MYC에 의해 코딩된 전사 인자의 기본 나선-루프-나선 도메인은 E-박스 서열에 결합한다. 특정 경우에, E-박스 서열은 유전자(예컨대, p21, Bcl-2, 또는 오르니틴 데카르복실라제)의 상류에 위치한다. 특정 경우에, MYC 폴리펩타이드는 E-박스 DNA 결합 도메인을 포함한다. 특정 경우에, E-박스 DNA 결합 도메인은 KRRTHNVLERQRRN(서열번호: 6)의 서열을 포함한다. 특정 경우에, MYC에 의해 코딩된 전사 인자가 E-박스 서열에 결합하는 것은 RNA 중합효소가 E-박스 서열의 하류의 유전자를 전사할 수 있게 한다.

[0060] 용어 "MYC 활성화" 또는 "MYC 생물학적 활성화" 또는 "생물학적 활성화 MYC"는 세포 생존, 세포 증식, 및/또는 항체 생산을 향상시키거나 유도하는 것 중 하나 이상을 포함한다. 제한이 아닌 예로서, MYC 활성화는 항-CD3 및 항-CD28 활성화된 T-세포의 증식의 향상 및/또는 장기(long-term) 자가-재생 조절 줄기 세포의 증식 증가를 포함한다. MYC 활성화는 또한 세포의 핵 내로의 진입, 핵산 서열에의 결합(예컨대, E-박스 서열에 결합), 및/또는 MYC 표적 유전자의 발현을 유도하는 것을 포함한다.

- [0061] 용어 "환자", "대상체", "개체" 등은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 동물, 전형적으로 포유동물을 지칭한다. 일 구현예에서, 환자, 대상체, 또는 개체는 포유동물이다. 일 구현예에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다. 일부 구현예에서 환자, 대상체 또는 개체는 동물, 예컨대, 비제한적으로, 길들여진 동물, 예컨대 말, 소, 쥐, 양, 개, 및 고양이이다.
- [0062] 용어 "단백질 전달 도메인(protein transduction domain; PTD)" 또는 "수송체 펩타이드 서열"(세포 투과성 단백질(cell permeable protein; CPP) 또는 막 전위 서열(membrane translocating sequence; MTS)로도 알려져 있음)은 전형적인 세포내이입(endocytosis)과 독립적으로 세포 내로 훨씬 더 큰 분자를 수송할 수 있는 작은 펩타이드를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 핵 국재화 신호(nuclear localization signal)는 단백질 전달 도메인 내에서 발견될 수 있으며, 이는 세포 핵 내로 분자의 추가적인 전위를 매개한다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 인간과 같은 대상체에서의 질환의 치료를 포함하며, (i) 질환을 억제하는 것, 즉, 그의 발달을 정지시키는 것; (ii) 질환을 완화시키는 것, 즉, 질환의 퇴행을 유발하는 것; (iii) 질환의 진행을 늦추는 것; 및/또는 (iv) 질환의 하나 이상의 증상의 진행을 억제, 완화, 또는 늦추는 것을 포함한다. 암과 관련하여, "치료하는" 또는 "치료"는 또한 종양의 퇴행, 종양 성장을 늦추는 것, 종양의 전이를 억제하는 것, 재발 암을 억제하는 것 및/또는 관해(remission)를 유지하는 것을 포함한다.
- [0064] 기재된 바와 같은 의학적 질환 및 상태의 다양한 치료 또는 예방 방식은 "실질적인"을 의미하는 것으로 의도되며, 이는 총 치료 또는 예방뿐만 아니라 이보다 적은 치료 또는 예방을 포함하고, 일부 생물학적으로 또는 의학적으로 관련된 결과가 달성되는 것으로 이해되어야 한다. 치료는 만성 질환을 위한 지속적인 연장된 치료일 수 있거나 급성 상태의 치료를 위한 단회 또는 몇 회의 투여일 수 있다.
- [0065] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "치료적"은 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료적 효과는 질환 상태의 억제, 관해, 또는 박멸에 의해 얻어진다.
- [0066] **II. 개요**
- [0067] 본 개시내용은, 부분적으로, 항종양 활성을 갖는 하나 이상의 면역 세포(예컨대, 종양 침윤 림프구(TIL)와 같이, 종양에 대한 반응을 조절하는 면역 세포)를 포함하는 조성물을 투여함으로써 대상체에서 암을 치료하는 것에 관한 것으로서, 하나 이상의 면역 세포는 대상체에게 투여하기 전에 시험관내에서 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 종양을 갖는 공여자 대상체로부터 입수된다. 일부 구현예에서, 세포는 치료를 받는 대상체에 자가(autologous)이다. 일부 구현예에서, 종양은 흑색종 종양이다.
- [0068] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 흑색종 종양을 갖는 공여자 대상체로부터 단리된 림프구를 MYC 폴리펩타이드 및 단백질 전달 도메인(PTD), 예컨대 HIV TAT 단백질 전달 도메인을 포함하는 MYC 융합 폴리펩타이드로 처리하고, 처리된 림프구를 흑색종 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 것이 종양을 갖는 대상체의 생존율을 유의하게 증가시킨다는 발견에 기초한다. 본원에 제공된 실시예는 흑색종을 갖는 마우스의 림프절로부터 추출된 면역 세포가 제2 흑색종을 갖는 마우스에 투여하기 전에 시험관내에서 TAT-MYC 융합 단백질로 처리될 때 유의하게 증가된 치료 효능을 가짐을 입증한다. 이들 데이터는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드로 처리된 항종양 면역 세포를 사용한 임상 세포 전달이 흑색종과 같은 암 치료에 사용될 수 있음을 지지한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은 시험관내에서 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉된 면역 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 면역 세포는 생체내에서 종양 항원으로 프라이밍(priming)된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 암을 갖는 공여자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 고형 종양, 예컨대 흑색종, 암종, 선종, 선암종, 모세포종, 육종, 또는 림프종을 갖는 공여자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 생체내에서 종양 항원과 접촉된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 하나 이상의 종양 항원에 노출된 공여자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 항종양 백신에 노출된 공여자로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 B 세포, T 세포, NK 세포, 또는 이의 임의의 조합이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 종양 침윤성 림프구(TIL)이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포이다.
- [0070] 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은 하나 이상의 변형된 면역 세포를 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 하나 이상의 변형된 면역 세포는 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하며 종양 특이적 항원에 반응성인 MYC 융합 펩타이드를 포함한다.

- [0071] 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은
- [0072] a) 면역 세포를 시험관내에서 MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계로서, 면역 세포는 하나 이상의 종양 항원 및 (i) 단백질 전달 도메인; (ii) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함하는 MYC 융합 펩타이드에 노출된 공여자로부터 유래되는 것인 단계; 및
- [0073] b) 접촉된 면역 세포를 암을 갖는 대상체에게 투여하여 암을 치료하는 단계
- [0074] 를 포함한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 면역 세포를 시험관내에서 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 것은 MYC 융합 폴리펩타이드의 존재하에 면역세포를 배양함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 하나 이상의 사이토카인 및/또는 성장 인자(예컨대, 인터루킨-2(IL-2), IL-4, IL-7, IL-9, 및 IL-15)의 존재하에 배양된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 투여 전에 증식되지 않는다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 투여 전에 증식된다. 일부 구현예에서, 공여자 및 치료를 위한 대상체는 동일하다.
- [0076] 일부 구현예에서, 면역 세포는 종양 침윤 림프구이다. 일부 구현예에서, 종양 침윤 림프구는 자가 종양 침윤 림프구이다. 따라서, 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은 시험관내에서 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉된 림프구를 투여하는 단계를 포함하며, 림프구로부터의 면역 세포는 대상체로부터의 자가 종양 침윤 림프구이다.
- [0077] 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하는 방법은
- [0078] a) 림프구를 시험관내에서 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계로서, 림프구는 대상체로부터의 자가 종양 침윤 림프구인 단계, 및
- [0079] b) 접촉된 자가 종양 침윤 림프구를 대상체에게 투여하여, 암을 치료하는 단계
- [0080] 를 포함한다.
- [0081] **전달을 위해 면역 세포를 입수하고 준비하는 방법**
- [0082] 본원에 제공된 방법에서 사용하기 위한 면역 세포는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 일차 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 림프구, 예컨대 T 및 B 세포이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 림프구 및 NK 세포의 혼합물이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)이다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 종양을 침윤한 T 세포(예컨대, 종양 침윤성 림프구)이다. 일부 구현예에서, T 세포는 종양의 수술 중에 제거된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, T 세포는 생검에 의해 종양 조직의 제거 후에 단리된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 공여자로부터 단리 후에 변형된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포이다.
- [0083] 일부 구현예에서, T 세포는 세포의 집단을 함유하는 샘플, 예컨대 혈액, 림프 또는 조직 생검 샘플로부터 단리된다. T 세포는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 세포의 집단으로부터 단리될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 종양 샘플로부터 T 세포의 벌크 집단을 얻는 단계를 포함한다. 예를 들어, T 세포의 벌크 집단은 종양 샘플을 특정 세포 집단이 선택될 수 있는 세포 현탁액으로 분리함으로써 종양 샘플로부터 얻을 수 있다. T 세포의 벌크 집단을 얻는 적합한 방법은, 비제한적으로, 종양을 기계적으로 분리하는 것(예컨대, 분쇄), 종양을 효소적으로 분리하는 것(예컨대, 소화), 및 흡인(예컨대, 바늘로) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0084] 종양 샘플로부터 얻은 T 세포의 벌크 집단은 임의의 적합한 유형의 T 세포를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 종양 샘플로부터 얻은 T 세포의 벌크 집단은 종양 침윤성 림프구(TIL)를 포함한다.
- [0085] 종양 샘플은 임의의 포유동물로부터 얻을 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포유동물"은, 비제한적으로, 토끼목(order Lagomorpha), 예컨대 토끼; 식육목(order Carnivora), 예컨대 고양이 및 개; 소목(order Artiodactyla), 예컨대 소 및 돼지; 또는 기체목(order Perissodactyla), 예컨대 말의 포유동물을 포함하는, 임의의 포유동물을 지칭한다. 포유동물은, 예컨대, 영장목(order Primates), 세보이드(Ceboids), 또는 시모이드(Simoids)(원숭이) 또는 진원류(order Anthropoids)(인간 및 유인원)의 비인간 영장류일 수 있다. 일부 구현예에서, 포유동물은 쥐목(order Rodentia), 예컨대 마우스 및 햄스터의 포유동물일 수 있다. 바람직하게는, 포유동물은 비인간 영장류 또는 인간이다. 예시적인 포유동물은 인간이다. 일부 구현예에

서, 면역 세포를 받는 대상체는 또한 종양 샘플의 공여자이다(즉, 자가 ACT).

[0086] T 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 비장 조직, 및 종양을 포함하는 많은 공급원으로부터 얻을 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 피콜(Ficoll) 분리와 같은 당업자에게 공지된 많은 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액의 단위로부터 얻을 수 있다. 일 구현예에서, 개체의 순환하는 혈액으로부터의 세포는 성분채집술(apheresis) 또는 백혈구성분채집술(leukopheresis)에 의해 얻는다. 성분채집술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 일 구현예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 처리 단계를 위한 적절한 완충제 또는 배지에 두기 위해 세척될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 세포는 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척된다. 대안적인 구현예에서, 세척 용액은 칼슘이 없고 마그네슘이 없을 수 있거나 모든 2가 양이온은 아니더라도 다수가 없을 수 있다. 칼슘 부재하에 초기 활성화 단계는 확대된 활성화로 이어진다. 당업자가 쉽게 이해하는 바와 같이, 세척 단계는 당업자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 제조사의 지침에 따라 반자동 "플로우 스루(flow-through)" 원심분리(예를 들어, Cobe 2991 세포 처리기)를 사용하여 달성될 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충제, 예를 들어, Ca이 없고 Mg가 없는 PBS에 재현탁될 수 있다. 대안적으로, 성분채집술 샘플의 바람직하지 않은 성분이 제거될 수 있고 세포가 배양 배지에 직접 재현탁될 수 있다.

[0087] 또 다른 구현예에서, T 세포는 적혈구를 용해시키고, 예를 들어, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 분리된다. T 세포, 예컨대 CD28+, CD4+, CD45RA+, 및 CD45RO+ T 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택에 충분한 시간 동안 항-CD3/항-CD28(즉, 3 X 28)-접합된 비드, 예컨대 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, 또는 XCYTE DYNABEADS™와 함께 배양함으로써 분리된다. 일 구현예에서, 시간은 약 30분이다. 추가의 구현예에서, 시간은 30분 내지 36시간 이상 및 그 사이의 모든 정수 값의 범위이다. 추가의 구현예에서, 시간은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6시간이다. 또 다른 구현예에서, 시간은 10 내지 24시간이다. 일 구현예에서, 배양 시간은 24시간이다. 백혈병 환자로부터 T 세포의 분리를 위해, 더 긴 배양 시간, 예컨대 24시간의 사용은 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 더 긴 배양 시간은 종양 조직으로부터 또는 면역손상된 개체로부터 종양 침윤성 림프구(TIL)를 분리하는 것에서와 같이, 다른 세포 유형과 비교하여 T 세포가 거의 없는 임의의 상황에서 T 세포를 분리하는 데 사용될 수 있다. 또한, 더 긴 배양 시간의 사용은 CD8+ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다.

[0088] 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 농축은 음성 선택된 세포에 고유한 표면 마커에 대한 항체의 조합으로 달성될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 방법은 음성 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단클론 항체의 콕테일을 사용하는 음성 자기 면역부착(negative magnetic immunoadherence) 또는 유세포 분석법(flow cytometry)을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 농축하기 위해, 단클론 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다.

[0089] 또한, 단핵구 집단(즉, CD14+ 세포)은 항-CD14 코팅된 비드 또는 컬럼을 포함하는 다양한 방법에 의해 또는 제거를 용이하게 하기 위해 이들 세포의 식세포 활성을 이용함으로써 혈액 제제로부터 고갈될 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 식세포 단핵구가 삼키기에 충분한 크기의 상자성 입자를 사용한다. 특정 구현예에서, 상자성 입자는 상업적으로 이용 가능한 비드, 예를 들어, 상표명 Dynabeads™ 하에 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)에 의해 생산되는 것이다. 일 구현예에서, 다른 비특이적 세포는 상자성 입자를 "무관한" 단백질(예컨대, 혈청 단백질 또는 항체)로 코팅함으로써 제거된다. 무관한 단백질 및 항체는 분리된 T 세포를 특이적으로 표적화하지 않는 단백질 및 항체 또는 단백을 포함한다. 특정 구현예에서, 무관한 비드는 양 항-마우스 항체(sheep anti-mouse antibody), 염소 항-마우스 항체(goat anti-mouse antibody), 및 인간 혈청 알부민으로 코팅된 비드를 포함한다.

[0090] 요약하면, 단핵구의 이러한 고갈은 전혈, 성분채집된(apheresed) 말초 혈액, 또는 종양으로부터 분리된 T 세포를 22 내지 37℃에서 약 30분 내지 2시간 동안 단핵구의 제거를 허용하는 임의의 양으로 무관한 또는 비-항체 결합된 상자성 입자의 하나 이상의 종류와 함께 미리 배양한 다음(대략 20:1 비드:세포 비율), 상자성 입자에 부착되거나 상자성 입자를 삼킨 세포를 자기 제거(magnetic removal)함으로써 수행된다. 이러한 분리는 당업계에서 이용 가능한 표준 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 상업적으로 이용 가능한 다양한 것(예컨대, DYNAL® 자기 입자 농축기(DYNAL MPC®))을 포함하는 임의의 자기 분리 방법이 사용될 수 있다. 필요한 고갈의 보장은 고갈 전후에 CD14 양성 세포의 유세포 분석을 포함하는 당업자에게 알려진 다양한 방법에 의해 모니터링될 수 있다.

- [0091] 양성 또는 음성 선택에 의해 원하는 세포 집단을 분리하기 위해, 세포 및 표면(예컨대, 비드와 같은 입자)의 농도는 달라질 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하기 위해, 비드 및 세포가 혼합되는 부피를 유의하게 감소시키는 것(즉, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 구현예에서, 20억 세포/ml의 농도가 사용된다. 일 구현예에서, 10억 세포/ml의 농도가 사용된다. 추가의 구현예에서, 1억 세포 초과/ml이 사용된다. 추가의 구현예에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50백만 세포/ml의 세포의 농도가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100백만 세포/ml의 세포 농도가 사용된다. 추가의 구현예에서, 125 또는 150백만 세포/ml의 농도가 사용될 수 있다. 고농도를 사용하는 것은 세포 수율 증가, 세포 활성화, 및 세포 증식을 초래할 수 있다. 또한, 높은 세포 농도의 사용은 CD28-음성 T 세포와 같은 관심 표적 항원을 약하게 발현할 수 있거나 많은 종양 세포가 존재하는 샘플(예컨대, 백혈병 혈액, 종양 조직)로부터의 보다 효율적인 세포의 포획을 허용한다. 이러한 세포 집단은 치료 가치를 가질 수 있고 입수하는 것이 바람직할 것이다. 예를 들어, 고농도의 세포를 사용하는 것은 일반적으로 더 약한 CD28 발현을 갖는 CD8+ T 세포의 보다 효율적인 선택을 허용한다.
- [0092] 관련 구현예에서, 더 낮은 농도의 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포 및 표면(예컨대, 비드와 같은 입자)의 혼합물을 유의하게 희석함으로써, 입자 및 세포 사이의 상호작용이 최소화된다. 이것은 입자에 결합될 다량의 원하는 항원을 발현하는 세포를 선택한다. 예를 들어, CD4+ T 세포는 더 높은 수준의 CD28을 발현하고 희석 농도에서 CD8+ T 세포보다 더 효율적으로 포획된다. 일 구현예에서, 사용되는 세포의 농도는 5×10^6 /ml이다. 다른 구현예에서, 사용되는 농도는 약 1×10^5 /ml 내지 1×10^6 /ml, 및 이들 사이의 임의의 정수 값일 수 있다.
- [0093] T 세포는 또한 동결될 수 있다. 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도 단핵구를 제거함으로써 보다 균일한 생성물을 제공할 수 있다. 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후, 세포는 동결 용액에 현탁될 수 있다. 많은 동결 용액 및 파라미터는 당업계에 공지되어 있고 이러한 맥락에서 유용할 것이지만, 하나의 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함하고, 이후 세포는 분당 1°의 속도로 -80℃로 동결되고 액체 질소 보관 탱크의 기상(vapor phase)에 보관된다. 즉시 -20℃에서 또는 액체 질소에서의 비제어 동결뿐만 아니라 제어 동결의 다른 방법이 사용될 수 있다.
- [0094] 본 발명에서 사용하기 위한 T 세포는 또한 항원 특이적 T 세포일 수 있다. 예를 들어, 종양 특이적 T 세포가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 항원 특이적 T 세포는 관심 환자, 예컨대 암에 걸린 환자, 예컨대 종양을 갖는 환자로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 흑색종을 갖는다.
- [0095] 일 구현예에서 네오에피토프(neoepitope)가 대상체에 대해 결정되고 이들 항원에 특이적인 T 세포가 분리된다. 증식에 사용하기 위한 항원 특이적 세포는 또한, 예를 들어, 항원 특이적 T 세포의 생성 및 분리라는 제목의 미국 특허 공개 제US 20040224402호, 또는 미국 특허 제6,040,177호에 기재된 바와 같이, 당업계에 공지된 많은 방법을 사용하여 시험관내에서 생성될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 항원 특이적 세포는 또한, 예를 들어, 존 윌리 & 선스사(John Wiley & Sons, Inc., Boston, Mass)에 의해 발행된 문헌[Current Protocols in Immunology], 또는 [Current Protocols in Cell Biology]에 기재된 바와 같이, 당업계에 공지된 많은 방법을 사용하여 생성될 수 있다.
- [0096] 관련 구현예에서, 1 또는 2 라운드의 증식 전 또는 후에 항원 특이적 세포를 분류하거나 양성 선택(예컨대, 자기 선택을 통해)하는 것이 바람직할 수 있다. 항원 특이적 세포를 분류하거나 양성 선택하는 것은 펩타이드-MHC 사량체를 사용하여 수행될 수 있다(Altman, *et al.*, 1996 *Science*. Oct. 4; 274(5284):94-6). 또 다른 구현예에서, 적응성 사량체(adaptable tetramer) 기술 접근법이 사용된다(Andersen *et al.*, 2012 *Nat Protoc.* 7:891-902). 사량체는 이전 가설에 기초하여 예측된 결합 펩타이드를 사용할 필요성, 및 특정 HLA에의 한정에 의해 제한된다. 펩타이드-MHC 사량체는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 생성될 수 있고, 본원에 기재된 바와 같이 관심있는 임의의 MHC 분자 및 관심있는 임의의 항원을 이용하여 제조될 수 있다. 본 맥락에서 사용될 특정 에피토프는 당업계에 공지된 다양한 분석을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, MHC 클래스 I에 결합하는 폴리펩타이드의 능력은 MHC 클래스 I/ $\beta 2m$ /펩타이드 이종트라이머 복합체 내로 125 I 표지된 $\beta 2$ -마이크로글로불린($\beta 2m$)의 혼입을 촉진하는 능력을 모니터링함으로써 간접적으로 평가될 수 있다(Parker *et al.* 1994, *J. Immunol.* 152:163 참고).
- [0097] 일부 구현예에서, T 세포는 변형된 또는 키메라 수용체를 발현하도록 재조합적으로 변형된다(예컨대, 키메라 항

원 수용체(CAR) 변형된 T 세포).

- [0098] 일 구현예에서, 세포는 유세포 분석법에 의해 단리되도록 에피토프 특이적 시약으로 간접적으로 표지된 후, 표현형 및 TCR의 특성화를 수행한다. 일 구현예에서, T 세포는 T 세포 특이적 항체를 접촉시킴으로써 단리된다. 항원 특이적 T 세포, 또는 일반적으로 본 발명의 임의의 세포의 분류는, 비제한적으로, MoFlo 분류기(DakoCytomation, Fort Collins, Colo.), FACSaria™, FACSArray™, FACSVantage™, BD™ LSR II, 및 FACSCalibur™(BD Biosciences, San Jose, Calif.)를 포함하는, 다양한 상업적으로 이용 가능한 세포 분류기 중 어느 것을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0099] 일 구현예에서, 상기 방법은 또한 CD3을 발현하는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 방법은 임의의 적합한 방식으로 세포를 특이적으로 선택하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 선택은 유세포 분석법을 사용하여 수행된다. 유세포 분석법은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 유세포 분석법은 임의의 적합한 항체 및 염색을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 항체는 선택되는 특정 바이오마커를 특이적으로 인식하고 이에 결합하도록 선택된다. 예를 들어, CD3, CD8, TIM-3, LAG-3, 4-1BB, 또는 PD-1의 특이적 선택은 각각 항-CD3, 항-CD8, 항-TIM-3, 항-LAG-3, 항-4-1BB, 또는 항-PD-1 항체를 사용하여 수행될 수 있다. 항체 또는 항체들은 비드(예컨대, 자기 비드) 또는 형광색소(fluorochrome)에 접합될 수 있다. 바람직하게는, 유세포 분석법은 형광 활성화된 세포 분류(FACS)이다. T 세포 상에서 발현된 TCR은 자가 종양에 대한 반응성에 기초하여 선택될 수 있다. 또한, 종양에 반응성인 T 세포는 그 전체가 본원에 참고로 포함된 특허 공개 WO제 2014133567호 및 WO제2014133568호에 기재된 방법을 사용하여 마커에 기초하여 선택될 수 있다. 또한, 활성화된 T 세포는 CD107a의 표면 발현에 기초하여 선택될 수 있다.
- [0100] 일 구현예에서, 상기 방법은 농축된 세포 집단에서 T 세포의 수를 증식시키는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법은 미국 특허 제8,637,307호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함되어 있다. T 세포는 세포를 PTD-MYC 폴리펩타이드로 처리하기 전 또는 후에 증식될 수 있다. T 세포의 수는 적어도 약 3배(또는 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 또는 9배), 보다 바람직하게는 적어도 약 10배(또는 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 또는 90배), 보다 바람직하게는 적어도 약 100배, 보다 바람직하게는 적어도 약 1,000배, 또는 가장 바람직하게는 적어도 약 100,000배 증가될 수 있다. T 세포의 수는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 증식될 수 있다. 세포의 수를 증식시키는 예시적인 방법은 특허 공개 WO제2003057171호, 미국 특허 제 8,034,334호, 및 미국 특허 출원 공개 제2012/0244133호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함되어 있다.
- [0101] 일 구현예에서, 생체의 T 세포 증식은 T 세포의 단리 및 후속 자극 또는 활성화 후 추가 증식에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, T 세포는 단일 제제에 의해 자극되거나 활성화될 수 있다. 또 다른 구현예에서, T 세포는 일차 신호를 유도하는 하나의 제제 및 공동자극 신호인 제2 제제인 2개의 제제로 자극되거나 활성화된다. 단일 신호를 자극하거나 일차 신호를 자극하는 데 유용한 리간드 및 제2 신호를 자극하는 보조 분자는 가용성 형태로 사용될 수 있다. 리간드는 세포의 표면에 부착될 수 있거나, 조작된 다가 신호전달 플랫폼(Engineered Multivalent Signaling Platform, EMSP)에 부착될 수 있거나, 또는 표면에 고정화될 수 있다. 일 구현예에서, 일차 및 이차 제제 모두는 표면, 예를 들어 비드 또는 세포 상에 공동 고정화된다. 일 구현예에서, 일차 활성화 신호를 제공하는 분자는 CD3 리간드일 수 있고, 공동자극 분자는 CD28 리간드 또는 4-1BB 리간드일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 항원, 예컨대 흑색종 종양 항원 또는 환자의 종양으로부터 유래된 항원으로 자극함으로써 증식된다.
- [0102] 일부 구현예에서, 단리된 면역 세포는 단리 후 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드로 즉시 처리된다. 다른 구현예에서, 단리된 면역 세포는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드로 처리하기 전에 적합한 완충제에 보관되고 동결된다. 일부 구현예에서, 단리된 면역 세포는 단리 후 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드로 즉시 처리되고, 처리된 세포는 환자에게 투여할 필요가 있을 때까지 적합한 완충제에 보관되고 동결된다.
- [0103] 특정 구현예에서, 단리된 면역 세포(예컨대, 혼합된 집단 면역 세포 또는 단리된 유형, 예컨대 종양 침윤성 림프구)는 세포에 의해 흡수되기에 충분한 시간 동안 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 조성물과 약 24시간 미만, 약 23시간 미만, 약 22시간 미만, 약 21시간 미만, 약 20시간 미만, 약 19시간 미만, 약 18시간 미만, 약 17시간 미만, 약 16시간 미만, 약 15시간 미만, 약 14시간 미만, 약 13시간 미만, 약 12시간 미만, 약 11시간 미만, 약 10시간 미만, 약 9시간 미만, 약 8시간 미만, 약 7시간 미만, 약 6시간 미만, 약 5시간 미만, 약 4시간 미만, 약 3시간 미만, 약 2시간 미만, 또는 약 1시간 미만 동안 접촉된다.

- [0104] 특정 구현예에서, 면역 세포는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 조성물과 약 55분 미만, 약 50분 미만, 약 45분 미만, 약 40분 미만, 약 35분 미만, 약 30분 미만, 약 29분 미만, 약 28분 미만, 약 27분 미만, 약 26분 미만, 약 25분 미만, 약 24분 미만, 약 23분 미만, 약 22분 미만, 약 21분 미만, 약 20분 미만, 약 19분 미만, 약 18분 미만, 약 17분 미만, 약 16분 미만, 약 15분 미만, 약 14분 미만, 약 13분 미만, 약 12분 미만, 약 11분 미만, 또는 약 10분 미만 동안 접촉된다. 특정 구현예에서, 면역 세포는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 조성물과 약 1시간 동안 접촉된다.
- [0105] 특정 구현예에서, 면역 세포는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 조성물과 24시간 이상 동안 접촉된다. 특정 구현예에서, 면역 세포는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 조성물과 약 12일 미만, 약 11일 미만, 약 10일 미만, 약 9일 미만, 약 8일 미만, 약 7일 미만, 약 6일 미만, 약 5일 미만, 약 4일 미만, 약 2일 미만, 또는 약 1일 미만 동안 접촉된다.
- [0106] 이전 구현예 중 어느 것과 조합될 수 있는 특정 구현예에서, 세포는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 500 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 0.7 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 0.8 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 0.9 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 1 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 2 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 3 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 4 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 5 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 6 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 7 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 8 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 9 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 10 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 15 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 20 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 25 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 30 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 35 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 40 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 45 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 50 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 55 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 60 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 65 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 70 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 75 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 80 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 85 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 90 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 95 $\mu\text{g/ml}$, 또는 적어도 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 MYC-융합 폴리펩타이드와 접촉된다.
- [0107] **MYC 융합 단백질**
- [0108] 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 단백질 전달 도메인(PTD), 세포 생존 또는 증식 중 하나 이상을 촉진하는 MYC 폴리펩타이드, 및 선택적으로 단백질 태그 도메인, 예컨대, 융합 단백질의 정제를 용이하게 하는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, MYC 폴리펩타이드와 접촉된 세포는 증가된 생존시간(예컨대, MYC와 접촉되지 않은 동일한 유형의 동일하거나 유사한 세포와 비교하여), 및/또는 증가된 증식(예컨대, MYC와 접촉되지 않은 동일한 유형의 동일하거나 유사한 세포와 비교하여)을 나타낸다.
- [0109] 일부 구현예에서, 융합 단백질은 (a) 단백질 전달 도메인; 및 (b) MYC 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 펩타이드는 식 (I)의 펩타이드이다:
- [0110] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열.
- [0111] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) 단백질 전달 도메인; (b) MYC 폴리펩타이드 서열; 및 (c) 단백질 전달 도메인과 MYC 폴리펩타이드 서열을 연결하는 하나 이상의 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 펩타이드는 식 (II)의 펩타이드이다:
- [0112] 단백질 전달 도메인-X-MYC 폴리펩타이드 서열,
- [0113] 상기 식에서, -X-는 단백질 전달 도메인과 MYC 폴리펩타이드 서열을 연결하는 분자이다. 일부 구현예에서, -X-는 적어도 하나의 아미노산이다.
- [0114] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) 단백질 전달 도메인; (b) MYC 폴리펩타이드 서열; (c) 적어도 2개의 단백질 태그; 및 (d) 선택적으로 링커(들)를 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 펩타이드는 식 (III-VI)의 펩타이드이다:
- [0115] 단백질 전달 도메인-X-MYC 폴리펩타이드 서열-X-단백질 태그 1-X-단백질 태그 2(식 (III)), 또는
- [0116] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-X-단백질 태그 1-X-단백질 태그 2(식 (IV)), 또는
- [0117] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-단백질 태그 1-X-단백질 태그 2(식 (V)), 또는
- [0118] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-단백질 태그 1-단백질 태그 2(식 (VI)),
- [0119] 상기 식에서, -X-는 링커이다. 일부 구현예에서, -X-는 하나 이상의 아미노산이다.
- [0120] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) 단백질 전달 도메인; (b) MYC 폴리펩타이드 서열; (c) 6-히스티딘 태그; (d) V5 에피토프 태그; 및 (e) 선택적으로 링커(들)를 포함한다. 일부 구현예에서, 융합 펩타이드는 식 (VII-XIV)의 펩타이드이다:

- [0121] 단백질 전달 도메인-X-MYC 폴리펩타이드 서열-X-6-히스티딘 태그-X-V5 에피토프 태그(식 (VII)), 또는
- [0122] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-X-6-히스티딘 태그-X-V5 에피토프 태그(식 (VIII)), 또는
- [0123] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-6-히스티딘 태그-X-V5 에피토프 태그(식 (IX)), 또는
- [0124] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-6-히스티딘 태그-V5 에피토프 태그(식 (X)),
- [0125] 단백질 전달 도메인-X-MYC 폴리펩타이드 서열-X-V5 에피토프 태그-X-6-히스티딘 태그(식 (XI)), 또는
- [0126] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-X-V5 에피토프 태그-X-6-히스티딘 태그(식 (XII)), 또는
- [0127] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-V5 에피토프 태그-X-6-히스티딘 태그(식 (XIII)), 또는
- [0128] 단백질 전달 도메인-MYC 폴리펩타이드 서열-V5 에피토프 태그-6-히스티딘 태그(식 (XIV)),
- [0129] 상기 식에서, -X-는 링커이다. 일부 구현예에서, -X-는 하나 이상의 아미노산이다.
- [0130] 상기 언급한 바와 같이, 일부 구현예에서, MYC 융합 단백질은 하나 이상의 링커 서열을 포함한다. 링커 서열은 융합 단백질의 단백질 전달 도메인, MYC 폴리펩타이드 서열, V5 에피토프 태그 및/또는 6-히스티딘 태그를 연결하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 링커의 아미노산 서열은 KGELNSKLE를 포함한다. 일부 구현예에서, 링커는 RTG의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0131] **단백질 전달 도메인(PTD)**
- [0132] 일부 구현예에서, MYC 융합 단백질은 단백질 전달 도메인을 포함한다. 펩타이드 전달은 소분자, 단백질, 또는 핵산을 세포막을 가로질러 세포의 세포내 구획으로 전달하기 위한 대안을 제공한다. 하나의 비제한적인 예 및 널리 규명된 단백질 전달 도메인(PTD)은 TAT 유래된 펩타이드이다. Frankele 등(예컨대, 미국 특허 제5,804,604호, 미국 특허 제5,747,641호, 미국 특허 제5,674,980호, 미국 특허 제5,670,617호, 및 미국 특허 제5,652,122호 참조)은 TAT의 아미노산 48-57을 포함하는 펩타이드를 카고 단백질(cargo protein)에 접합시킴으로써 카고 단백질(β -갈락토시다제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다제)을 세포 내로 전달하는 것을 입증하였다. 일부 구현예에서, TAT는 MRKKRRQRRR(서열번호: 7)의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0133] PTD의 또 다른 비제한적인 예는 페네트라틴(penetratin)이다. 페네트라틴은 친수성 거대분자를 세포막을 가로질러 전달할 수 있다(그 전체가 본원에 참조로 포함된 Derossi *et al.*, *Trends Cell Biol.*, 8:84-87(1998)). 페네트라틴은 배양에서 세포에 의해 내재화되는 초과리 전사 인자인 안테나페디아(Antennapedia)의 호메오도메인(homeodomain)의 아미노산 43-58에 해당하는 16개의 아미노산 펩타이드이다.
- [0134] PTD의 또 다른 비제한적인 예는 VP22이다. 단순 포진 바이러스 유형 1(Herpes simplex virus type 1, HSV-1)의 외피 단백질(tegument protein)인 VP22는 단백질과 핵산을 세포막을 가로질러 전달하는 능력을 갖는다(그 전체가 본원에 참조로 포함된 Elliot *et al.*, *Cell* 88:223-233, 1997). VP22의 잔기 267-300은 필요하지만 전달에 충분치 않을 수 있다. 전달 기능을 담당하는 영역은 확인되지 않았기 때문에, 전체 VP22 단백질이 일반적으로 카고 단백질과 핵산을 세포막을 가로질러 전달하는 데 사용된다(Schwarze *et al.*, *Trends Pharmacol Sci*, 21:45-48, 2000).
- [0135] 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 단백질 전달 도메인을 포함한다. 제한이 아닌 예로서, 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT, 페네트라틴, VP22, vpr, EPTD, R9, R15, VP16, 및 안테나페디아 중 하나 이상의 단백질 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT, 페네트라틴, VP22, vpr, 및 EPTD 중 하나 이상의 단백질 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT, 페네트라틴, VP22, vpr, EPTD, R9, R15, VP16, 및 안테나페디아 중 적어도 하나 이상의 단백질 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 합성 단백질 전달 도메인(예컨대, 폴리아르기닌 또는 PTD-5)을 포함한다. 특정 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT 단백질 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 MYC 폴리펩타이드에 공유 연결된다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 펩타이드 결합을 통해 MYC 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 링커 서열을 통해 MYC 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 짧은 아미노산 서열을 포함한다. 제한이 아닌 예로서, 일부 구현예에서, 링커 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 길이이다.
- [0136] 본 기술의 MYC 융합 단백질은 임의의 원하는 순서로 배열될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, MYC 융합 단백질은 a) MYC 폴리펩타이드에 인프레임(in frame)으로 연결된 단백질 전달 도메인, b) V5 도메인에 인프레임

로 연결된 MYC 폴리펩타이드, 및 c) 6-히스티딘 에피토프 태그에 인프레임으로 연결된 V5 도메인의 순서로 배열될 수 있다. 일부 구현예에서, MYC 융합 단백질은 a) 단백질 전달 도메인에 인프레임으로 연결된 MYC 폴리펩타이드, b) V5 도메인에 인프레임으로 연결된 단백질 전달 도메인, 및 c) 6-히스티딘 에피토프 태그에 인프레임으로 연결된 V5 도메인의 성분의 순서를 갖는다. 일부 구현예에서, 추가의 아미노산 서열은 각각의 서열 사이에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 추가의 아미노산은 폴리펩타이드 서열의 시작 및/또는 끝에 포함될 수 있다.

[0137] 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT 단백질 전달 도메인이다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT_[48-57]이다. 일부 구현예에서, 단백질 전달 도메인은 TAT_[57-48]이다.

[0138] 단백질 태그 도메인

[0139] 일부 구현예에서, MYC 융합 단백질은 융합 단백질의 정제를 용이하게 하는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 태그 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 태그 도메인은 폴리히스티딘 태그, 및 에피토프 태그 중 하나 이상을 포함한다. 제한이 아닌 예로서, 예시적인 태그는 V5, 히스티딘-태그(예컨대, 6-히스티딘 태그), HA(헤마글루티닌) 태그, FLAG 태그, CBP(칼모둘린 결합 펩타이드), CYD(공유성이지만 해리가능한 NorpD 펩타이드), StrepII, 또는 HPC(단백질 C의 중쇄) 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 태그 도메인은 약 10 내지 20개의 아미노산 길이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 태그 도메인은 2 내지 40개의 아미노산 길이, 예를 들어 6 내지 20개의 아미노산 길이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 열거된 태그 중 2개(예를 들어, V5 및 HIS-태그)는 함께 사용되어 단백질 태그 도메인을 형성한다.

[0140] 일부 구현예에서, 히스티딘 태그는 6-히스티딘 태그이다. 일부 구현예에서, 히스티딘 태그는 서열 HHHHHH(서열 번호: 8)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 V5 에피토프 태그를 포함한다. 일부 구현예에서, V5 태그는 GKPIPNLLGLDST(서열번호: 9)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, V5 태그는 IPNPLGLD(서열번호: 10)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0141] 단백질 태그는 임의의 적합한 방법에 의해 본원에 개시된 융합 단백질에 부가될 수 있다. 제한이 아닌 예로서, 일부 구현예에서, TAT-MYC 폴리펩타이드 서열은 하나 이상의 단백질 태그, 예컨대, 폴리히스-태그 및/또는 V5 태그를 코딩하는 발현 벡터 내로 클로닝된다. 일부 구현예에서, 폴리히스티딘 태그 및/또는 V5 태그는 PCR에 의해 부가된다(즉, PCR 프라이머는 폴리히스티딘 서열 및/또는 V5 서열을 포함함).

[0142] PTD-MYC 융합 폴리펩타이드의 구축

[0143] 본원에 개시된 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드(예컨대, TAT-MYC 융합 폴리펩타이드)는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 제한이 아닌 예로서, TAT-MYC 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 PCR에 의해 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 MYC 서열에 대한 정방향 프라이머는 TAT 단백질 전달 도메인의 인프레임 N-말단의 9-아미노산 서열(예컨대, RKKRRQRRR)을 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 MYC 서열에 대한 역방향 프라이머는 종결 코돈을 제거하도록 설계된다. 일부 구현예에서, PCR 산물은 임의의 적합한 발현 벡터 내로 클로닝된다. 일부 구현예에서, 발현 벡터는 폴리히스티딘 태그 및 V5 태그를 포함한다.

[0144] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) TAT, 및 (b) c-MYC를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) TAT_[48-57], 및 (b) c-MYC를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) TAT_[57-48], 및 (b) c-MYC를 포함한다.

[0145] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) TAT, (b) c-MYC, (c) 링커(들), (d) V5 태그, 및 (e) 6-히스티딘 태그를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) TAT_[48-57], (b) c-MYC, (c) 링커(들), (d) V5 태그, 및 (e) 6-히스티딘 태그를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 융합 펩타이드는 (a) TAT_[57-48], (b) c-MYC, (c) 링커(들), (d) V5 태그, 및 (e) 6-히스티딘 태그를 포함한다.

[0146] 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 서열번호: 1을 포함하며; 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 서열번호: 1이다.

MRKKRRQRRRLNVSTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQSELQPPAPSEDIWKKFELLPTPPLSPSRRSGL
 CSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDMVNSFI CDPDDETFIKNI I IQDCMWSGFSAAAKLVSE
 KLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDL SAAASECIDPSVVFYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDLSLS
 STESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEEDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCHVS
 THQHNYAAPPSTRKDYPAAKRVKLDSDVRVLRQISNNRKCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQI
 PELENNEKAPKVVLKKATAYILSVQAEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRKGELNSKLEGKPIPNPLLGLDSTR
 TGHHHHHH (서열번호: 1).

[0147]

[0148]

융합 단백질은 하나 이상의 작용기를 포함하도록 합성 동안 또는 후에 변형될 수 있다. 제한이 아닌 예로서, 단백질은 아세틸, 포스페이트, 아세테이트, 아미드, 알킬, 및/또는 메틸기 중 하나 이상을 포함하도록 변형될 수 있다. 이 목록은 완전한 것으로 의도되지 않으며, 단지 예시적이다. 일부 구현예에서, 단백질은 적어도 하나의 아세틸기를 포함한다.

[0149]

PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해, 예컨대 박테리아 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포와 같은 세포에서 재조합 단백질 발현에 의해 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 미생물 발효에 의해 재조합적으로 생산된다. 일부 구현예에서 미생물 발효는 약 1 내지 약 10,000 리터의 발효 부피, 예를 들어, 약 10 내지 약 1000 리터의 발효 부피에서 수행된다. 발효는 임의의 적합한 미생물 숙주 세포 및 배양 배지를 이용할 수 있다. 예시적인 구현예에서, *E. 콜라이(E. coli)*가 미생물 숙주 세포로서 이용된다. 대안적인 구현예에서, 다른 미생물, 예컨대, *S. 세레비시애(S. cerevisiae)*, *P. 파스토리스(P. pastoris)*, 락토바실러스(*Lactobacilli*), 바실러스(*Bacilli*) 및 아스퍼질러스(*Aspergilli*)가 사용될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 미생물 숙주 세포는 BL-21 StarTM *E. coli* 균주(Invitrogen)이다. 예시적인 구현예에서, 미생물 숙주 세포는 BLR DE3 *E. coli* 균주이다.

[0150]

일부 구현예에서, 숙주 세포는 발현된 단백질의 번역을 개선하기 위해 숙주 미생물 세포 코돈 편향을 극복하기 위해 사용되는 희귀 코돈에 대한 tRNA를 제공하도록 변형된다. 예시적인 구현예에서, 숙주 세포(예컨대, *E. 콜라이*)는 AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA 코돈에 대한 tRNA를 발현하는, pRARE(CamR)와 같은 플라스미드로 형질 전환된다. 특정 코돈에 대한 tRNA를 제공하기 위한 추가의 적합한 플라스미드 또는 구축물은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 제공된 방법에서 사용될 수 있다.

[0151]

PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 발현 카세트를 선택된 숙주 세포 내로 도입하기 위해 통합 또는 자가 복제 벡터가 사용될 수 있다. 발현 카세트에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드에 대한 코딩 서열은 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 일부 변화, 예컨대, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 반응하여 이들의 제어하에 DNA로부터 전사 수준 증가를 개시하는 프로모터이다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산은 박테리아 발현에 최적화된 코돈이다.

[0152]

다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 예시적인 프로모터는 널리 알려져 있다. 이들 프로모터는, 존재하는 경우, 제한 효소 소화에 의해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 코딩 DNA에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 미생물 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터는, 비제한적으로, β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템(Chang *et al.*, (1978) *Nature*, 275:617-624; Goeddel *et al.*, (1979) *Nature*, 281: 544), 알칼리 포스파타제, 트립토판(trp) 프로모터 시스템(Goeddel(1980) *Nucleic Acids Res.* 8: 4057; EP 36,776), 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터(deBoer *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25)를 포함한다. 선택된 숙주 세포에 의한 발현에 적합한 임의의 프로모터가 사용될 수 있다. 적합한 뉴클레오타이드 서열은 공개되어, 숙련된 작업자가 임의의 필요한 제한 부위를 공급하는 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들을 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA에 작동 가능하게 라이게이션할 수 있다(예컨대, Siebenlist *et al.*, (1980) *Cell* 20: 269 참고). 예시적인 구현예에서, 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno, S.D.) 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 유도성 프로모터는 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)로 유도되는 lacZ 프로모터이다. 프로모터 및 발현 카세트는 또한 관심있는 DNA 서열을 합성하기 위한 널리 공지된 기술을 사용하여 새롭게 합성될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 본원의 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드의 발현을 위한 발현 벡터는 pET101/D-Topo(Invitrogen)이다.

[0153]

PTD-MYC 융합 폴리펩타이드의 발현을 위해, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 코딩하는 발현 벡터를 함유하는 미생

물 속주는 전형적으로 발효 반응기에서 고밀도까지 성장한다. 일부 구현예에서, 반응기는 제어된 글루코스 공급을 갖는다. 일부 구현예에서, 발효기 접종물이 먼저 항생제가 보충된 배지에서 배양된다(예컨대, 밤새 배양). 그 후, 발효기 접종물은 단백질의 발현을 위해 발효기 배양물을 접종하는 데 사용된다. 발효기 배양물의 적어도 약 15, 일반적으로 적어도 약 20, 적어도 25, 적어도 약 30 이상의 OD600에서, 재조합 단백질의 발현이 유도된다. 예시적인 구현예에서, 유도성 프로모터가 lacZ 프로모터인 경우, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드의 발현을 유도하기 위해 IPTG가 발효 배지에 첨가된다. 일반적으로, IPTG는 로그 성장기를 나타내는 OD600에서 발효기 배양물에 첨가된다.

[0154] 제공된 방법의 특정 구현예에서, 유도된 단백질 발현은 유도 후 약 2 내지 약 5시간 동안 유지되고, 유도 후 약 2 내지 약 3시간일 수 있다. 더 긴 유도 기간은 재조합 단백질의 분해로 인해 바람직하지 않을 수 있다. 유도 동안 반응 혼합물의 온도는 바람직하게는 약 28℃ 내지 약 37℃, 일반적으로 약 30℃ 내지 약 37℃이다. 특정 구현예에서, 유도는 약 37℃에서 행해진다.

[0155] PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 전형적으로 미생물 세포에서 세포질 봉입체(cytosolic inclusion body)로서 발현된다. 봉입체를 회수하기 위해, 세포 펠렛은 유도 후 발효 배양물로부터 원심분리에 의해 수집되고, -70℃ 이하에서 동결되고, 해동되고, 붕괴 완충제(disruption buffer)에 재현탁된다. 세포는 통상적인 방법, 예컨대, 초음파 처리, 균질화 등에 의해 용해된다. 그 후, 용해물은 일반적으로 단백질을 가용화하는 데 효과적인 농도, 예컨대, 약 5 M, 6 M, 7 M, 8 M, 9 M 이상의 우레아의 존재하에 가용화 완충제에 재현탁된다. 재현탁은 균질성을 달성하기 위해 펠렛을 기계적으로 분해하고 교반하는 것을 필요로 할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 펠렛은 우레아 완충제에 직접 재현탁되고 균질할 때까지 혼합된다. 일부 구현예에서, 재현탁/가용화 완충제는 8 M 우레아, 50 mM 포스페이트 pH 7.5이고, 현탁액은 균질화기를 통과한다.

[0156] 일부 구현예에서, 균질화된 현탁액은 설폰화된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 균질화된 현탁액은 200 mM 아황산 나트륨 및 10 mM 나트륨 테트라티오네이트를 포함하도록 조정된다. 그 후, 상기 용액은 균질할 때까지 실온에서 혼합된다. 그 후, 혼합된 용해물은 설폰화를 완료하기 위해 추가의 시간 동안 혼합된다(예컨대, 2-8℃에서 ≥12시간 동안). 그 후, 설폰화된 용해물은 1시간 동안 원심분리되었다. 그 후, 설폰화된 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 함유하는 상층액은 원심분리에 의해 수집되고, 세포 펠렛을 버린다. 그 후, 상층액은 필터, 예컨대, 0.22 μm 막 필터를 통과하여 용해물을 정화시킨다.

[0157] 그 후, 가용화된 단백질은 정제된다. 정제 방법은 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 겔 배제 크로마토그래피 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피가 사용된다. 예를 들어, 단백질은 편리한 정제를 위해 에피토프 태그 또는 히스티딘 6 태그와 함께 제공된다. 본 방법에서, 예시적인 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 Ni-수지를 사용하는 Ni 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하기 위해 히스티딘 6 태그를 포함한다.

[0158] 예시적인 구현예에서, Ni-수지 컬럼은 우레아를 함유하는 완충제에서 평형화된다. 일부 구현예에서, 평형 완충제는 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 500 mM NaCl, 및 10% 글리세롤 용액이다. 그 후, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 포함하는 설폰화되고 정화된 상층액은 Ni-수지 컬럼 상에 로딩된다. 그 후, 컬럼은 세척 완충제, 예컨대, 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 10% 글리세롤, 500 mM NaCl, pH 7.5로 세척된다. 그 후, 컬럼은 감소하는 염 농도를 갖는 순차적인 세척 완충제로 세척되었다. 예를 들어, 예시적인 후속 세척은 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 10% 글리세롤, 및 2 M NaCl, pH 7.5에 이어서, 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 10% 글리세롤, 50 mM NaCl, 및 30 mM 이미다졸, pH 7.5의 또 다른 세척을 포함할 수 있다.

[0159] 세척 완충제의 순차적 적용 후, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드는 100 내지 300 mM 이미다졸의 구배를 갖는 용리 완충제, 예컨대, 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 10% 글리세롤, 및 50 mM NaCl, pH 7.5를 첨가하고, 분획을 수집함으로써 컬럼으로부터 용리된다. 그 후, 모을 단백질 함유 분획을 0.22 μm 막을 통해 여과한다. 단백질 수율의 평가는 임의의 적합한 방법, 예컨대, UV 파장 280에서 분광광도법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0160] 일부 구현예에서, 단리된 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드를 추가로 정제하기 위해 하나 이상의 추가의 정제 방법이 사용될 수 있다. 예시적인 구현예에서, Ni-세파로스 크로마토그래피 단계로부터 모은 분획은 Q-세파로스 수지를 사용하는 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 정제된다. 일부 구현예에서, 상기 풀(pool)은 샘플을 Ni 세파로스 크로마토그래피 단계로부터 제2 세척 완충제(예컨대, 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 10% 글리세롤, 2 M NaCl, pH 7.5)를 이용하여 Q 세파로스 완충제(17.52 +/-1 mS/cm)의 전도도로 희석함으로써 Q-세파로스 컬럼에 로딩하기 위해 준비된다. 그 후, 희석된 풀은 Q-세파로스 컬럼 상에 로딩된 후, 추적 완충제(예컨대, 6 M 우레아, 50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 및 10% 글리세롤)를 사용하여 2개의 추적 단계를 수행하고, UV 트레이스

(trace)가 베이스라인에 도달하여 단백질이 컬럼으로부터 용리되었음을 나타낼 때까지 추적 완충제를 추가로 순차적으로 적용한다.

[0161] **치료 방법**

[0162] PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포는 환자에서 암 치료를 위해 투여된다. 일부 구현예에서, 환자는 고형 종양을 갖는다. 일부 구현예에서, 환자는 암종, 선종, 선암종, 모세포종, 육종, 또는 림프종을 갖는다. 일부 구현예에서, 환자는 전이성 종양을 갖는다. 일부 구현예에서, 환자는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 투여 전에 암 치료를 위한 하나 이상의 제제를 투여받았다. 일부 구현예에서, 암은 재발 또는 불응성 암이다. 일부 구현예에서, 암은 암의 치료를 위한 하나 이상의 제제에 내성이다.

[0163] 본원에 제공된 치료 방법에 대한 인간의 예시적인 종양은, 비제한적으로, 흑색종, 방광 종양, 유방암 종양, 전립선 종양, 암종, 기저 세포 암종, 담도암, 방광암, 골암, 뇌암, CNS 암, 신경교종 종양, 자궁경부암, 용모막암 종, 결장 및 직장암, 결합 조직 암, 소화기관의 암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 두경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 골수종, 신경모세포종, 구강암, 난소암, 췌장암, 망막모세포종, 횡문근육종, 직장암, 신세포암, 호르몬기관의 암, 육종, 피부암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 및 비뇨기관의 암을 포함한다. 일부 구현예에서, 암은 전이성 암이다. 일부 구현예에서, 암은 재발 또는 불응성 암이다.

[0164] 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 투여는 종양의 성장을 억제하거나 종양의 부피를 감소시킨다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것은 암의 하나 이상의 증상을 완화시킨다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것은 대상체의 전체 생존율을 증가시킨다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것은 암의 퇴행을 증가시킨다.

[0165] 본원에 제공된 방법에 따른 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포(예컨대 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 처리된 종양 침윤성 림프구)의 투여는 비제한적으로 주사, 수혈, 또는 이식(implantation, transplantation)을 포함하는, 세포를 대상체에게 투여하기 위한 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포는 피하로, 피내로, 종양내로, 절내로(intranasally), 골수내로(intramedullary), 근육내로, 경막내로(intrathecaly), 정맥내 또는 림프관 주사에 의해, 또는 복강내로 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드-면역 세포는 종양 조직의 절개에 의해 형성된 공동(cavity) 내로(즉, 공동내 전달) 또는 절개 전에 종양 내로 직접(즉, 종양내 전달) 투여된다. 일 구현예에서, MYC-융합 폴리펩타이드-면역 세포는 정맥내 주사에 의해 투여된다.

[0166] PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포 외에도, 투여를 위한 조성물은 임의의 다른 제제, 예컨대 의약학적으로 허용 가능한 담체, 완충제, 부형제, 보조제, 첨가제, 방부제, 충전제, 안정화제 및/또는 증점제, 및/또는 상응하는 제품에서 일반적으로 발견되는 임의의 구성요소를 포함할 수 있다. 특정 투여 경로를 위한 조성물을 제제화하기 위한 적합한 성분 및 적절한 제조 방법의 선택은 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

[0167] PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 포함하는 입양 세포 치료 조성물은 투여에 적합한 고체, 반고체 또는 액체 형태와 같은 임의의 형태일 수 있다. 제제는, 비제한적으로, 용액, 유화액, 현탁액, 정제, 펠렛 및 캡슐로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 조성물은 특정 제제에 제한되지 않으며, 대신에 조성물은 임의의 공지된 의약학적으로 허용 가능한 제제로 제제화될 수 있다. 의약학적 조성물은 당업계에 공지된 임의의 통상적인 공정에 의해 생산될 수 있다.

[0168] 일부 구현예에서, MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 투여는 kg 체중당 10^4 내지 10^{10} 의 세포의 투여를 포함하며, 이는 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중을 포함하고, 이들 범위 내의 세포 수의 모든 정수 값을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는, 예를 들어 사이클로포스파미드를 이용한 림프구 제거의 과정과 함께 또는 없이 투여된다.

[0169] MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포는 하나 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 치료적 유효량은 단일 용량으로 투여된다. 일부 구현예에서, 단일 용량의 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 투여는 치료 효과를 갖는다. 또 다른 구현예에서, MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 유효량은 일정 기간 동안 하나를 초과하는 용량으로 투여된다. 투여 시기는 의사의 판단에 속하며, 비제한적으로 환자의 연령, 성별, 또는 임상 상태 및 암의 유형, 정도 또는 위치를 포함하

는 암의 특징을 포함하는 다양한 인자에 좌우된다. 개별적인 요구는 다르지만, 특정 질환 또는 상태의 치료를 위한 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 유효량의 최적 범위의 결정은 당업자의 기술 범위에 속한다.

- [0170] PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포는, 예를 들어 처음 2주, 3주, 4주, 매월 또는 치료 기간 동안 1 내지 10회 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 투여된다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포는 매주, 2주마다, 3주마다 또는 매월 투여된다.
- [0171] 치료적 유효량은 치료적 또는 예방적 이익을 제공하는 양을 의미한다. 투여되는 투여량은 수여자의 연령, 건강 및 체중, 존재하는 경우 동시 치료의 종류, 치료의 빈도 및 원하는 효과의 성질에 따라 달라질 것이다.
- [0172] 일부 구현예에서, PTD-MYC 변형된 면역 세포를 받는 환자는 먼저 하나 이상의 사이토카인 및/또는 다른 면역조절제로 전처리된다. 일부 구현예에서, PTD-MYC 변형된 면역 세포를 받는 환자는 PTD-MYC 변형된 면역 세포의 투여 전에 림프구 제거술을 받는다. 림프구 제거의 목적은, 특히 항상성 사이토카인에 대해 경쟁하는 조절성 T 세포 및 다른 비특이적 T 세포를 제거함으로써 주입된 림프구를 위한 공간을 만드는 것이다.
- [0173] 일부 구현예에서, PTD-MYC 변형된 면역 세포는 추가의 치료제와 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 추가의 치료제는 PTD-MYC 변형된 면역 세포를 이용한 치료 전에, 동시에, 간헐적으로, 또는 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 추가의 치료제는 면역조절제, 예컨대 인터루킨(예컨대 IL-2, IL-7, IL-12), 사이토카인, 케모카인, 또는 면역조절 약물이다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 보체 C5a, IL-2, TNF α , CD40L, IL12, IL-23, IL15, IL17, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14-1, CCL14-2, CCL14-3, CCL15-1, CCL15-2, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23-1, CCL23-2, CCL24, CCL25-1, CCL25-2, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL3L1, CCL4, CCL4L1, CCL5(RANTES), CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCR10, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCRL1, CCRL2, CX3CL1, CX3CR, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL9, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7 및 XCL2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 추가의 치료제는 항암제, 예컨대 화학요법 또는 방사선 요법이다.
- [0174] 일부 구현예에서, 암의 치료를 위해 투여되는 변형된 면역 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포를 포함하는, 유전적으로 변형된 항원 수용체를 갖는 T 세포이다. 예를 들어, T 세포 수용체(TCR)의 특이성을 도입함으로써, 예를 들어, 선택된 펩타이드 특이성을 갖는 새로운 TCR α 및 β 사슬을 도입함으로써, T 세포를 유전적으로 변형하기 위한 다양한 전략이 이용될 수 있다(예컨대, 미국 특허 제8,697,854; PCT 특허 공개: WO제2003020763호, WO제2004033685호, WO제2004044004호, WO제2005114215호, WO제2006000830호, WO제2008038002호, WO제2008039818호, WO제2004074322호, WO제2005113595호, WO제2006125962호, WO제2013166321호, WO제2013039889호, WO제2014018863호, WO제2014083173호; 미국 특허 제8,088,379호 참고). 키메라 항원 수용체(CAR)는 기재된 광범위한 수용체 키메라 구축물을 이용하여, 악성 세포와 같은 선택된 표적에 특이적인 면역반응성 세포, 예컨대 T 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있다(예컨대 미국 특허 제5,843,728호; 제5,851,828호; 제5,912,170호; 제6,004,811호; 제6,284,240호; 제6,392,013호; 제6,410,014호; 제6,753,162호; 제8,211,422호; 및, PCT 공개 WO 제9215322호 참고). CAR T 세포의 제조 방법은 당업계에 알려져 있으며, 이는 본원에 기재된 바와 같은 MYC 융합 폴리펩타이드(예컨대, PTD)를 포함하는 변형된 CAR T 세포를 생성하기 위해 본원에 제공된 방법과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0175] 일반적으로, CAR은 세포의 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 도메인으로 구성되며, 세포의 도메인은 미리 결정된 표적에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함한다. CAR의 항원 결합 도메인은 종종 항체 또는 항체 단편(예컨대, 단쇄 가변 단편, scFv)이지만, 결합 도메인은 표적의 특이적 인식을 초래하는 한 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 수용체를 포함할 수 있으므로, CAR은 수용체의 리간드에 결합할 수 있다. 대안적으로, 항원 결합 도메인은 리간드를 포함할 수 있으므로, CAR은 리간드의 내인성 수용체에 결합할 수 있다.
- [0176] 일부 구현예에서, 원하는 CAR을 발현하는 T 세포는 암 항원 및 공동자극 분자를 공동 발현하는 γ -조사된 활성화 및 전과 세포(AaPC)와의 공동 배양을 통해 선택된다. 일부 구현예에서, 조작된 CAR T-세포는, 예를 들어 IL-2 및 IL-21과 같은 가용성 인자의 존재하에 AaPC 상에서의 공동 배양에 의해 증식된다. 이러한 증식은 예를 들어 기억 CAR+ T 세포를 제공하기 위해 수행될 수 있다. 이러한 방식으로, 항원을 갖는 종양에 대해 특이적 세포독성 활성을 갖는 CAR T 세포가 제공될 수 있다(선택적으로 인터페론- γ 와 같은 원하는 케모카인의 생산과 함께).

- [0177] 일부 구현예에서, CAR T-세포는 본원에 제공된 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드와 시험관내에서 접촉되어 암 치료를 위한 변형된 CAR T 세포를 생성한다. 변형된 CAR T 세포는 상기 기재된 바와 같은 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 투여 방법을 포함하는 임의의 적합한 방법에 따라 투여될 수 있다.
- [0178] **키트**
- [0179] 본원에 제공된 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 포함하는 의약학적 조성물은 암을 치료하는 데 사용하기 위한 키트 또는 의약학적 시스템으로 조립될 수 있다. 이 구현예에 따른 키트는 박스, 카톤(carton), 튜브와 같은 운반 수단을 포함할 수 있으며, 그 안에 하나 이상의 용기, 예컨대 바이알, 튜브, 앰플, 병, 주사기, 또는 백이 밀폐된다. 키트는 또한 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 사용하기 위한 관련 설명서를 포함할 수 있다.
- [0180] 일부 구현예에서, 키트는 유효량의 입양 세포 요법, 예컨대 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 투여된 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 제공된 MYC-융합 폴리펩타이드로 치료하기 위한 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포, 공여자 백혈구, T 세포, 또는 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 제공된 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포와 조합하여 투여되는 유효량의 치료제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 치료제는 항암제이다.
- [0181] 본원에 제공된 키트는 또한 본원에 제공된 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 대상체에게 투여하기 위한 장치를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드 및 세포를 대상체에게 투여하기 위한 당업계에 공지된 임의의 다양한 장치가 본원에 제공된 키트에 포함될 수 있다. 예시적인 장치는 피하 바늘, 정맥내 바늘, 카테터, 무바늘 주사, 비제한적으로, 피하 바늘, 정맥내 바늘, 카테터, 무바늘 주사 장치, 흡입기 및 액체 디스펜서, 예컨대 점안기를 포함한다. 전형적으로 키트의 MYC-융합 폴리펩타이드 및/또는 MYC-융합 폴리펩타이드 변형된 면역 세포를 투여하기 위한 장치는 조성물의 원하는 투여 방법과 양립할 것이다. 예를 들어, 정맥내로 전달되는 조성물은 피하 바늘 및 주사기와 함께 키트 내에 포함될 수 있다.
- [0182] **실시예**
- [0183] **실시예 1. 흑색종 종양의 면역요법을 위한 TAT-MYC 처리된 림프구를 생성하기 위해 TAT-MYC로 처리된 면역 세포**
- [0184] 본 실시예에서, HIV-1 트랜스활성화 단백질(HIV-1 transactivation protein, TAT)의 단백질 전달 도메인 및 MYC를 포함하는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드가 생체내에서 흑색종 세포에 대한 면역 반응을 조절하는 능력을 조사하였다. 구체적으로, 흑색종을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC로 처리된 림프계(lymphoid) 세포가 흑색종 종양을 갖는 마우스를 치료하는 능력을 연구하였다. 이들 연구의 목적은 TAT-MYC 림프구를 생성하기 위해 흑색종을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC로 처리된 면역 세포가 흑색종을 갖는 마우스 내로 이식시 흑색종 종양에 대한 효과적인 치료인지 결정하는 것이었다.
- [0185] **재료 및 방법**
- [0186] C57BL/6J는 가장 널리 사용되며 게놈이 시퀀싱된 최초의 근친교배(inbred) 계통이다. 이 계통은 많은 종양에 불응성이지만, 대부분의 돌연변이의 최대 발현을 허용하는 배경이다. C57BL/6J 마우스는 청각원성 발작(audiogenic seizure)에 내성이고, 비교적 낮은 골밀도를 가지며, 연령 관련 난청이 발생한다. 이들은 또한식이 유도 비만, 2형 당뇨병, 및 아테롬성 동맥경화증에 민감하다. 이 계통으로부터의 대식세포는 탄저병 치사독(anthrax lethal toxin)의 효과에 내성이다.
- [0187] **처리군**
- [0188] 체중이 약 25 g이고 흑색종 종양을 갖는 15마리의 C57BL/6 마우스(Jackson Laboratory Stock# 000664)를 생성하고, 5마리씩 3개의 코호트, 즉 비처리 대조군으로서 하나의 마우스의 하나의 코호트, 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 대조군 TAT-융합 단백질로 처리된 림프계 세포로 처리된 하나의 코호트, 및 TAT-MYC 림프구로 처리된 하나의 코호트로 나누었다.
- [0189] **종양을 갖는 공여자 마우스의 생성 및 공여자 세포의 제조**
- [0190] 이식용 B16-F10 흑색종 세포(ATCC CRL 6475, 마우스 피부 흑색종)를 D10 배지(DMEM, 10% FBS, Pen/Strep(10,000 유닛/ml)(Gibco Cat# 15140); L-글루타민(200mM)(Gibco Cat# 25030); MEM 비필수 아미노산(Gibco Cat# 11140))에서 배양하였다.

- [0191] C57BL/6j 마우스(Jackson Laboratory #003548)에 꼬리 정맥 주사를 통해 250 μ L PBS 중의 1×10^4 개 B16-F10 흑색종 세포를 이식하였다. 주사 전에, 각 시험 마우스를 1-2분 동안 250W 가열 램프 하에 둔 다음, 흑색종 세포를 정맥내로 주사하였다. 이식 후 14일에, 주사된 마우스로부터 림프절을 채취하고 10 mL 주사기의 플런저(plunger)로 분쇄하였다.
- [0192] 첫 번째 연구를 위해, 5마리의 마우스로부터 림프절을 채취하였다. 두 번째 연구를 위해, 10마리의 마우스로부터 림프절을 채취하였다. 세포를 C10으로 세척하고, 수집하고, $260 \times g$ 에서 5분 동안 회전시켰다. 상층액을 버린 후, 세포를 10 mL 멸균 TAC에서 재현탁시키고, $260 \times g$ 에서 5분 동안 회전시켰다. 상층액을 버린 후, 세포를 5% BSA를 갖는 2 mL의 멸균 여과된 PBS에 재현탁시켰다.
- [0193] 림프절 세포를 TAT-MYC로 처리하여 TAT-MYC 림프구를 생성하거나 대조군 TAT-융합 단백질로 처리하였다. 세포를 2개의 15 mL 코니컬 튜브(각각 1 mL)로 나누고, 1 mL의 25 μ g/mL의 대조군 단백질(실험 1의 경우 TAT-CRE, 실험 2의 경우 TAT-GFP) 또는 1 mL의 25 μ g/mL의 TAT-MYC 로트 C18로 처리하였다. 1시간의 실온 배양 후, 각 튜브를 멸균 PBS로 3회 세척하고, 5 mL 멸균 튜브로 옮기고, 얼음 위에 두었다.
- [0194] 5마리의 C57BL/6j 마우스의 각각의 코호트에 대해 꼬리 정맥 내로 250 μ L PBS 중의 1×10^4 개 B16-F10 흑색종 세포를 주사함으로써 시험 마우스를 제조하였다. 주사 후, 마우스를 매일 1회 관찰하였다. 체중, 음식 소비, 활동, 및 사망률의 변화를 모니터링하였다. 이식 후 7일에, TAT-MYC 림프구 또는 대조군 림프계 세포를 흑색종 세포가 주사된 마우스에 이식하였다.
- [0195] 증상을 매일 모니터링하였다. 심각한 증상이 나타나면 마우스를 안락사시키고, 사망을 기록하였다. 거친 호흡, 등 구부리기 및 무운동과 같은 심각한 증상이 있는 것으로 확인되면 마우스는 죽거나 안락사한 것으로 확인되었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.
- [0196] 실험 1 및 2의 결과가 각각 도 1 및 2에 나타나 있다. 도면에 나타난 바와 같이, 흑색종을 갖는 마우스로부터 유래된 마우스 림프계 세포를 TAT-MYC와 접촉시킴으로써 생성된 TAT-MYC 림프구(TBX-3400)로 흑색종을 갖는 마우스를 처리하는 것은, 대조군 TAT-융합 단백질로 처리된 림프계 세포를 이식하는 것과 비교하여 마우스의 전체 생존율을 유의하게 개선시켰다. 이들 결과는 면역 세포의 TAT-MYC 처리가 입양 세포 전달을 사용한 흑색종의 치료에 유용하다는 것을 시사한다.
- [0197] **실시예 2. 흑색종 종양의 면역요법을 위한 TAT-MYC 처리된 림프구의 용량 반응 효과**
- [0198] 본 실시예에서, 흑색종 종양의 면역요법을 위해 상이한 양이 투여된 TAT-MYC 처리된 림프구의 치료 효과를 조사하였다. 이 실험은 TAT-MYC 처리된 림프구의 여러 상이한 용량을 주사하여 비교한 것을 제외하고, 실시예 1에서 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 2개의 실험을 수행하였다. 첫 번째 실험인 실험 3에서, TAT-MYC 림프구를 하기 투여군에 따라 꼬리 정맥 주사를 통해 흑색종을 갖는 마우스에 투여하였다: 3.0×10^6 개 세포/kg, 6.0×10^6 개 세포/kg, 14.0×10^6 개 세포/kg, 및 70.0×10^6 개 세포/kg. 대조군의 경우, 마우스에게 70.0×10^6 개 TAT-Cre로 처리된 세포를 투여하거나 세포를 투여하지 않았다(NT). 두 번째 실험인 실험 4에서, TAT-MYC 림프구를 하기 투여군에 따라 꼬리 정맥 주사를 통해 흑색종을 갖는 마우스에게 투여하였다: 4.0×10^3 개 세포/kg, 4.0×10^4 개 세포/kg, 4.0×10^5 개 세포/kg, 4.0×10^6 개 세포/kg 및 4.0×10^7 개 세포/kg. 대조군의 경우, 마우스에게 4.0×10^6 개 TAT-Cre로 처리된 세포를 투여하거나 세포를 투여하지 않았다(NT). 실험 3 및 4의 결과가 각각 도 3 및 4에 나타나 있다. 도면에 나타난 바와 같이, 흑색종을 갖는 마우스를 증가하는 양의 TAT-MYC 림프구(TBX-3400)로 처리하는 것은 두 실험에서 전체 생존율을 유의하게 개선하였다. 이들 실험은 흑색종을 갖는 대상체를 치료하는 TAT-MYC 림프구의 재현성 및 효능 모두를 입증한다.
- [0199] **실시예 3. 결장암의 면역요법을 위한 TAT-MYC 처리된 림프구를 생성하기 위해 TAT-MYC로 처리된 면역 세포**
- [0200] 본 실시예에서는, HIV-1 트랜스활성화 단백질(TAT)의 단백질 전달 도메인 및 MYC를 포함하는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드가 생체내에서 결장암 세포에 대한 면역 반응을 조절하는 능력을 조사하였다. 구체적으로, 결장 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC로 처리된 림프계 세포가 결장암 세포 유래 종양을 갖는 마우스를 치료하는 능력을 연구하였다. 이들 연구의 목적은 TAT-MYC 림프구를 생성하기 위해 결장 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC로 처리된 면역 세포가 결장 종양을 갖는 마우스에 이식시 결장암을 위한 효과적인 치료인지 여부를 결정하는 것이었다.

- [0201] 재료 및 방법
- [0202] 이식용 MC-38 췌장 결장 선암종 세포(Kerafast #ENH204)를 D10 배지(DMEM, 10% FBS, Pen/Strep(10,000 단위/ml)(Gibco Cat# 15140); L-글루타민(200mM)(Gibco Cat# 25030); MEM 비필수 아미노산(Gibco Cat# 11140))에서 배양하였다.
- [0203] 체중이 약 25 g인 9마리의 공여자 C57BL/6J 마우스(Jackson Laboratory Stock# 000664)에게 꼬리 정맥 주사를 통해 250 μ L PBS 중의 1×10^6 개 MC-38 췌장 결장 선암종 세포를 이식하였다. 1주 후, 18마리의 수여자 C57BL/6J 마우스에게 1×10^6 개 MC-38 췌장 결장 선암종 세포를 이식하였다.
- [0204] 공여자 마우스의 이식 후 14일에, 9마리의 주사된 공여자 마우스로부터 림프절을 채취하고 10 mL 주사기의 플런저로 분쇄하였다. 세포를 C10으로 세척하고, 수집하고, 5분 동안 260 \times g에서 회전시켰다. 상층액을 버린 후, 세포를 10 mL 멸균 TAC에 재현탁시키고, 5분 동안 260 \times g에서 회전시켰다. 상층액을 버린 후, 세포를 5% BSA를 갖는 2 mL의 멸균 여과된 PBS에 재현탁시켰다. 림프절 세포를 TAT-MYC로 처리하여 TAT-MYC 림프구를 생성하거나 대조군 TAT-융합 단백질로 처리하였다. 세포를 2개의 15 mL 코니컬 튜브(각각 1 mL)로 나누고, 1 mL의 25 μ g/ml의 대조군 TAT-융합 단백질(TAT-CRE) 또는 1 mL의 25 μ g/ml의 TAT-MYC 로트 C18로 처리하였다. 1시간의 실온 인큐베이션 후, 각각의 튜브를 멸균 PBS로 3회 세척하고, 5 mL 멸균 튜브로 옮기고, 얼음 위에 두었다. 그 후, 125,000개의 림프 세포를 각각의 수여자 마우스의 꼬리 정맥 내로 250 μ L PBS로 주사하여(5×10^6 개 세포/kg에 해당), 각각 6마리의 마우스의 3개의 코호트를 생성하였다: 비처리 대조군의 하나의 코호트, 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 대조군 TAT-융합 단백질로 처리된 림프계 세포로 처리된 하나의 코호트, 및 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC 융합 단백질로 처리된 림프계 세포(TAT-MYC 림프구)로 처리된 하나의 코호트.
- [0205] 주사 후, 마우스를 매일 1회 관찰하였다. 체중, 음식 소비, 활동, 및 사망률의 변화를 모니터링하였다. 증상을 매일 모니터링하였다. 심각한 증상이 나타나면 마우스를 안락사시키고 사망을 기록하였다. 거친 호흡, 등 구부리기 및 무운동과 같은 심각한 증상이 있는 것으로 확인되면 마우스는 죽거나 안락사한 것으로 확인되었다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록하였다.
- [0206] 결과
- [0207] 이 실험의 결과가 도 5에 나타나 있다. 처리 후 27일에, 첫 번째 비처리 및 TAT-CRE 대조군 마우스는 사망한 것으로 확인되었다. 처리 후 34일까지, 모든 비처리 및 TAT-CRE 대조군 마우스는 사망한 것으로 확인되었고 안락사될 필요가 없었다. 대조적으로, 첫 번째 TAT-MYC 림프구 처리된 마우스는 처리 후 32일에 사망하였다. 52일에, TAT-MYC 림프구 처리된 마우스 중 3마리만이 사망하였다.
- [0208] 따라서, 도면에 나타난 바와 같이, 결장 종양을 갖는 마우스로부터 유래된 마우스 림프계 세포를 TAT-MYC와 접촉시킴으로써 생성된 TAT-MYC 림프구로 결장 종양을 갖는 마우스를 처리하는 것은 대조군 TAT-MYC 융합 단백질로 처리된 림프계 세포를 이식하는 것과 비교하여 마우스의 전체 생존을 유의하게($p < 0.0019$) 개선하였다. 이러한 결과는 면역 세포의 TAT-MYC 처리가 입양 세포 전달을 사용한 결장암의 치료에 유용하다는 것을 시사한다.
- [0209] 실시예 4. 흑색종 종양의 면역요법을 위한 TAT-MYC 처리된 림프구의 용량 반응 효과
- [0210] 본 실시예에서는, 흑색종 종양의 면역요법을 위한 상이한 양이 투여된 TAT-MYC 처리된 림프구의 치료 효과를 조사하였다. 이 실험을 여러 상이한 용량의 TAT-MYC 처리된 림프구를 주사하여 비교한 것을 제외하고, 실시예 3에 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 이 실험에서, TAT-MYC 림프구를 하기 투여군(군당 5마리의 종양을 갖는 마우스)에 따라 꼬리 정맥 주사를 통해 흑색종을 갖는 마우스에게 투여하였다: 5.0×10^3 개 세포/kg, 5.0×10^4 개 세포/kg, 5.0×10^5 개 세포/kg, 5.0×10^6 개 세포/kg, 5.0×10^7 개 세포/kg, 및 5.0×10^8 개 세포/kg, 세포/kg. 대조군의 경우, 마우스에게 세포를 투여하지 않거나(NT)(8마리의 마우스), 또는 5.0×10^7 개 세포/kg를 비-종양을 갖는 마우스(5마리의 마우스)에게 투여하였다. 이 실험의 결과가 도 6에 나타나 있다. 도면에서 나타난 바와 같이, 흑색종을 갖는 마우스를 증가하는 양의 TAT-MYC 림프구(TBX-3400)로 처리하는 것은 전체 생존율을 유의하게 개선하였다. 비처리 코호트에서, 동물의 75%가 19일에 사망하였고, 나머지 비처리 마우스는 종양 이식 후 41일에 사망하였다. 5×10^3 개 세포/kg를 투여받은 모든 마우스는 19일까지 사망하였다. 대조적으로, 5×10^5 개 세포/kg를 투여받은 동물의 60% 및 5×10^6 개 또는 5×10^7 개 세포/kg를 투여받은 동물의 100%는 연구 내내 생존하였다. 또한, 5×10^7 개 세포/kg를 투여받은 비종양을 갖는 마우스의 100%는 연구 내내 생존하였다. 5×10^8 개 세포/kg를

투여받은 모든 마우스는 털이 짧아졌다. 5×10^8 개 세포/kg을 투여받은 마우스의 40%는 41일에 이르러 사망하였다. 5×10^8 개 세포/kg을 투여받은 마우스의 나머지 60%는 연구 내내 생존하였다.

[0211] 이러한 실험은 치명적인 MC-38 대장암 종양 모델에서 결장 종양을 갖는 대상체를 치료하는 TAT-MYC 림프구의 재현성 및 효능 모두를 입증한다.

[0212] 실시예 5. 고행 종양의 면역요법을 위한 TAT-MYC 처리된 림프구를 생성하기 위해 TAT-MYC로 처리된 면역 세포

[0213] 본 실시예에서는, HIV-1 트랜스활성화 단백질(TAT)의 단백질 전달 도메인 및 MYC를 포함하는 PTD-MYC 융합 폴리펩타이드가 생체내에서 추가의 종양 세포 유형에 대한 면역 반응을 조절하는 능력을 조사하였다. 구체적으로, 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC로 처리된 림프계 세포가 고행 종양을 갖는 마우스를 치료하는 능력을 연구하였다. 이들 연구의 목적은 TAT-MYC 림프구를 생성하기 위해 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 TAT-MYC로 처리된 면역 세포가 종양을 갖는 마우스에 이식시 고행 종양을 위한 효과적인 치료인지 여부를 결정하는 것이다.

[0214] 암 세포주의 이식을 사용하는 많은 마우스 이종이식 모델이 당업계에서 이용 가능하며, 이는 고행 종양의 치료를 평가하기 위해 본 실시예에서 이용될 수 있다. 이종이식 종양의 생성을 위한 암 및 이용 가능한 세포주의 비제한적인 예가 하기 표에 열거되어 있다.

히스토타입	세포주
부신	H295R
방광	SW780
뇌	SF-295, SK-N-AS, U87 MG, U251
유방암	BT474, HCC-1806, HCC-1954, JIMT-1, MCF-7, MDA-MB-231, HCC70
결장	CL-34, COLO 205, DLD-1, HCT 116, HCT-15, HT-29, LoVo, LS-174T, LS411N, RKO, SW48, SW480, SW620
상피	A-431
유인 육종	RD-ES
위	N87, SNU-5, MKN-45
두경부	FaDu
백혈병	HL-60, MOLM-13, MOLT-4, MV4-11, RS4;11, SET2, THP-1, HEL92.1.7, K-562, Kasumi-1
간	Hep3B, HuH-7, SNU-398
폐(비소 세포)	A-427, A549, H1299, H1975, H226, H23, H292, H460, H520, H522, H647, H727, H810, HCC-44, NCI-H2122, SK-MES-1, COR-L23, NCI-H1963, H2009, H1581, H1993, H441
폐(소세포)	H69, H82, H211, H526, SHP-77, DMS 114
림프종	Daudi, DoHH-2, Granta 519, JEKO-1, KARPAS-299, MOLT-4, Raji B, Ramos, REC-1, RL, SU-DHL-4, WSU-DLCL2, Mino, Namalwa
흑색종	A2058, A375, IGR-37, SK-MEL-5, UACC-62, CHL-1, COLO 800, IGR-1, IGR-37
중피종	MSTO-211H
다발성 골수종	H929, OPM-2, RPMI 8226
신경모세포종	SKNAS
난소	A2780, IGROV1, OVCAR-3, OVCAR-5, SK-OV-3, TOV-21G, OV-90
췌장	BxPc-3, HPAC, HPAF II, KP4, MIA PaCa-2, PANC-1
전립선	22Rv.1, PC3, DU145, LNCaP, VCaP
신장	786-0, G-401, G-402
육종	HT-1080, SJSA-1
갑상선	8505C, FTC-238, K1
자궁	ECC-1, MFE-280, HEC-1-A, HEC-1-B

[0215]

[0216] 재료 및 방법

[0217] 체중이 약 25 g이고 고행 종양을 갖는 15마리의 C57BL/6 마우스(Jackson Laboratory Stock# 000664)를 생성하고, 5마리씩 3개의 코호트, 즉 비처리 대조군으로서 하나의 마우스의 하나의 코호트, 종양을 갖는 마우스로부터 유래되고 대조군 TAT-융합 단백질로 처리된 림프계 세포로 처리된 하나의 코호트, 및 TAT-MYC 림프구로 처리된

하나의 코호트로 나누었다.

- [0218] 종양을 갖는 공여자 마우스의 생성 및 공여자 세포의 제조
- [0219] 이식용 고형 종양 세포를 D10 배지(DMEM, 10% FBS, Pen/Strep(10,000 단위/ml)(Gibco Cat# 15140); L-글루타민 (200mM)(Gibco Cat# 25030); MEM 비필수 아미노산(Gibco Cat# 11140))에서 배양한다.
- [0220] C57BL/6j 마우스(Jackson Laboratory #003548)에 꼬리 정맥 주사를 통해 250 μ L PBS 중의 1×10^4 개 종양 세포를 이식한다. 주사 전, 각 시험 마우스를 1-2분 동안 250W 가열 램프 하에 둔 다음, 종양 세포를 정맥내로 주사하였다. 이식 후 14일에, 주사된 마우스로부터 림프절을 채취하고, 10 mL 주사기의 플런저로 분쇄하였다.
- [0221] 첫 번째 연구 동안, 5마리의 마우스로부터 림프절을 채취한다. 두 번째 연구 동안, 10마리의 마우스로부터 림프절을 채취하였다. 세포를 C10으로 세척하고, 수집하고, 5분 동안 260 \times g에서 회전시킨다. 상층액을 버린 후, 세포를 10 mL 멸균 TAC에 현탁시키고, 5분 동안 260 \times g에서 회전시킨다. 상층액을 버린 후, 세포를 5% BSA를 갖는 2 mL의 멸균 여과된 PBS에 재현탁시킨다.
- [0222] 림프절 세포를 TAT-MYC로 처리하여 TAT-MYC 림프구를 생성하거나 대조군 TAT-융합 단백질로 처리한다. 세포를 2개의 15mL 코니컬 튜브(각각 1 mL)로 나누고, 1 mL의 25 μ g/mL의 대조군 단백질(실험 1의 경우 TAT-CRE, 실험 2의 경우 TAT-GFP) 또는 1 mL의 25 μ g/mL의 TAT-MYC 로트 C18로 처리한다. 1시간의 실온 배양 후, 각 튜브를 멸균 PBS로 3회 세척하고, 5 mL 멸균 튜브로 옮기고 얼음 위에 둔다.
- [0223] 5마리 C57BL/6j 마우스의 각각의 코호트에 대해 꼬리 정맥 내로 250 μ L PBS 중의 1×10^4 개 종양 세포를 주사함으로써 시험 마우스를 제조한다. 주사 후, 마우스를 매일 1회 관찰한다. 체중, 음식 소비, 활동, 및 사망률의 변화를 모니터링한다. 이식 후 7일에, TAT-MYC 림프구 또는 대조군 림프계 세포를 종양 세포 주사된 마우스에 이식한다.
- [0224] 증상을 매일 모니터링한다. 심각한 증상이 나타나면 마우스를 안락사시키고 사망을 기록한다. 거친 호흡, 등 구 부리기 및 무운동과 같은 심각한 증상이 있는 것으로 확인되면 마우스는 죽거나 안락사한 것으로 확인된다. 사망일을 0일로서 처리일과 함께 기록한다.
- [0225] 종양을 갖는 마우스로부터 유래된 마우스 림프계 세포를 TAT-MYC와 접촉시킴으로써 생성된 TAT-MYC 림프구(TBX-3400)로 종양을 갖는 마우스를 처리하는 것은 대조군 TAT-융합 단백질로 처리된 림프계 세포를 이식하는 것과 비교하여 마우스의 전체 생존을 유의하게 개선할 것으로 예상된다. 이러한 결과는 면역 세포의 TAT-MYC 처리가 입양 세포 전달을 사용한 고형 종양의 치료에 유용하다는 것을 나타낼 것이다.
- [0226] **실시예 6. 고형 종양의 면역요법을 위한 TAT-MYC 처리된 림프구의 용량 반응 효과**
- [0227] 본 실시예에서는, 고형 종양의 면역요법을 위한 상이한 양이 투여된 TAT-MYC 처리된 림프구의 치료 효과를 조사한다. 이 실험을 여러 상이한 용량의 TAT-MYC 처리된 림프구가 주사되어 비교되는 것을 제외하고, 상기 기재된 바와 같이 수행한다. 2개의 실험을 수행한다. 첫 번째 실험에서, TAT-MYC 림프구를 하기 투여군에 따라 꼬리 정맥 주사를 통해 종양을 갖는 마우스에게 투여한다: 3.0×10^6 개 세포/kg, 6.0×10^6 개 세포/kg, 14.0×10^6 개 세포/kg, 및 70.0×10^6 개 세포/kg. 대조군의 경우, 마우스에게 70.0×10^6 개 TAT-Cre로 처리된 세포를 투여하거나 세포를 투여하지 않는다(NT). 두 번째 실험인 실험 4에서, TAT-MYC 림프구를 하기 투여군에 따라 꼬리 정맥 주사를 통해 종양을 갖는 마우스에게 투여한다: 4.0×10^3 개 세포/kg, 4.0×10^4 개 세포/kg, 4.0×10^5 개 세포/kg, 4.0×10^6 개 세포/kg 및 4.0×10^7 개 세포/kg. 대조군의 경우, 마우스에게 4.0×10^6 개 TAT-Cre로 처리된 세포를 투여하거나 세포를 투여하지 않는다(NT). 종양을 갖는 마우스를 증가하는 양의 TAT-MYC 림프구(TBX-3400)로 처리하는 것은 두 실험에서 전체 생존율을 유의하게 개선할 것으로 예상된다. 이들 실험은 또한 종양을 갖는 대상체를 치료하는 TAT-MYC 림프구의 재현성 및 효능을 입증할 것이다.
- [0228] 본 개시내용의 바람직한 구현예가 본원에 나타나고 설명되었지만, 이러한 구현예는 단지 예로서 제공된다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 많은 변경, 변화, 및 치환이 본 개시내용을 벗어나지 않으면서 당업자에게 일어날 것이다. 본원에 기재된 개시내용의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 개시내용을 실시하는 데 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 하기 청구범위는 본 개시내용의 범위를 정의하고 이들 청구범위 및 이들의 등가물 내의 방법 및 구조가 이에 의해 포함된다는 것이 의도된다.
- [0229] 본원에 언급되거나 인용된 모든 특허, 특허 출원, 가출원, 및 공개는 이들이 본 명세서의 명백한 교시와 모순되

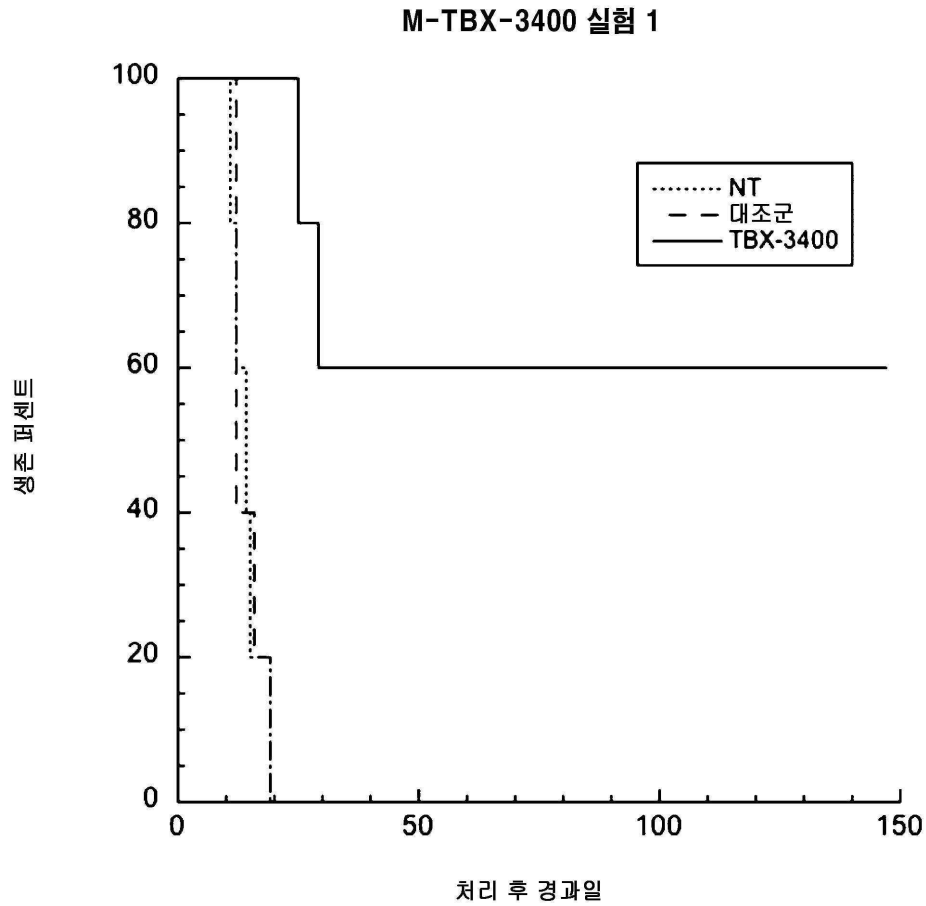
지 않는 한 모든 도면 및 표를 포함하여 그 전체가 참조로 포함된다.

[0230]

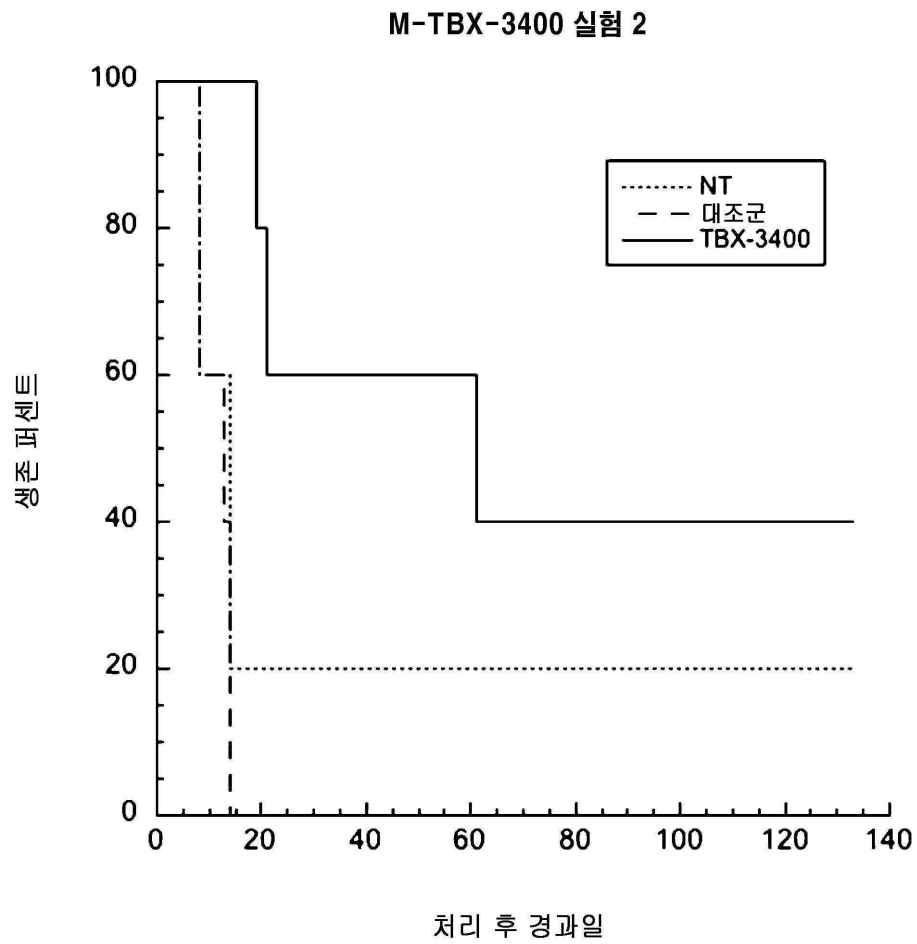
다른 구현예는 하기 청구범위 내에서 제시된다.

도면

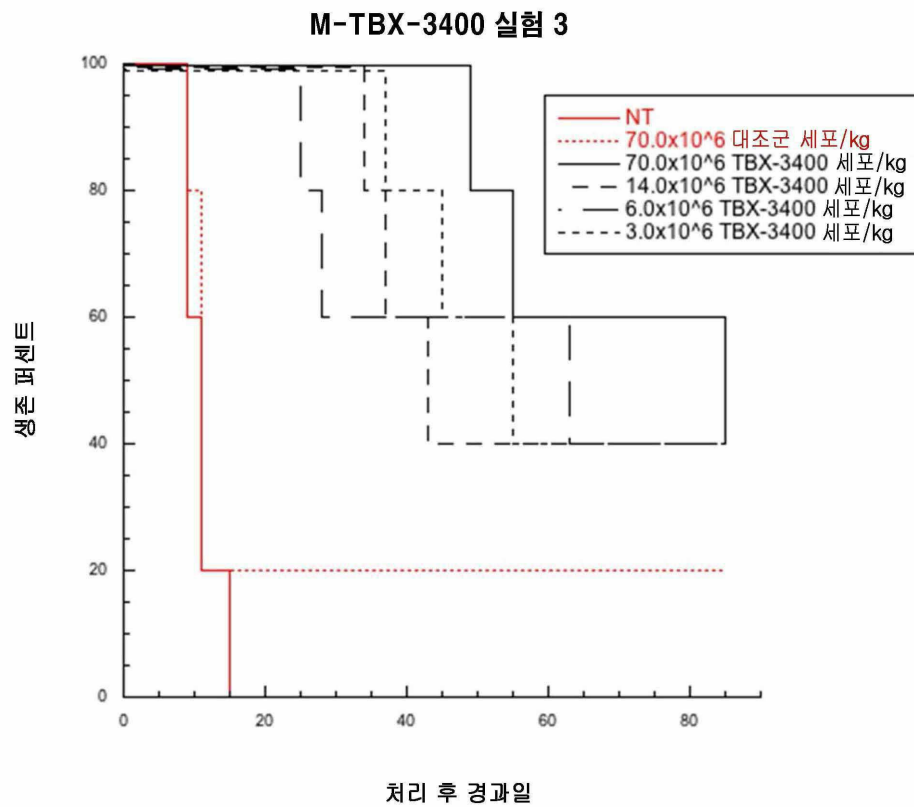
도면1



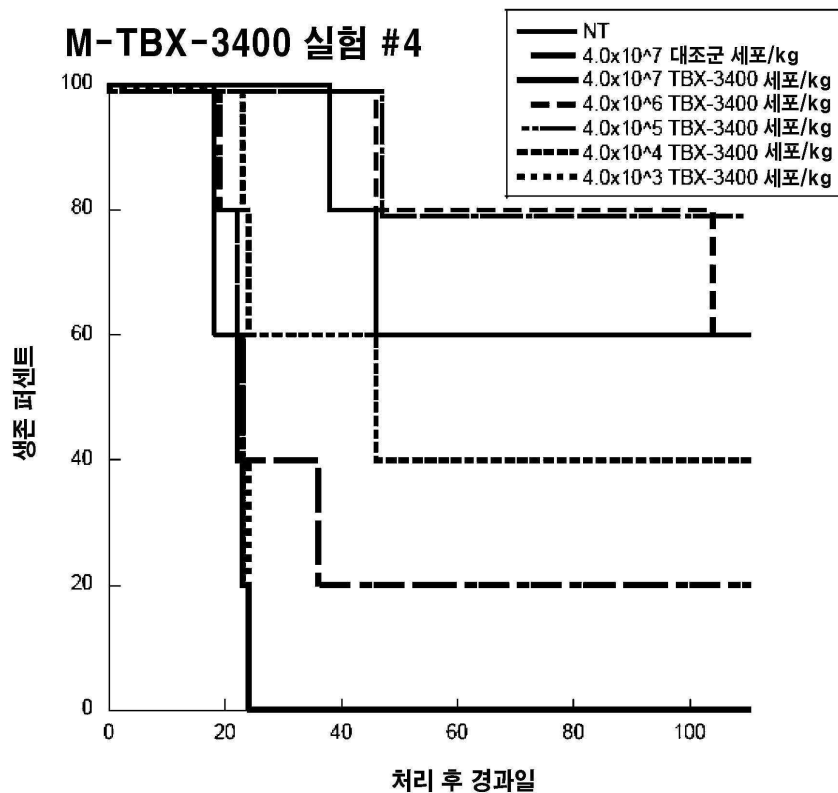
도면2



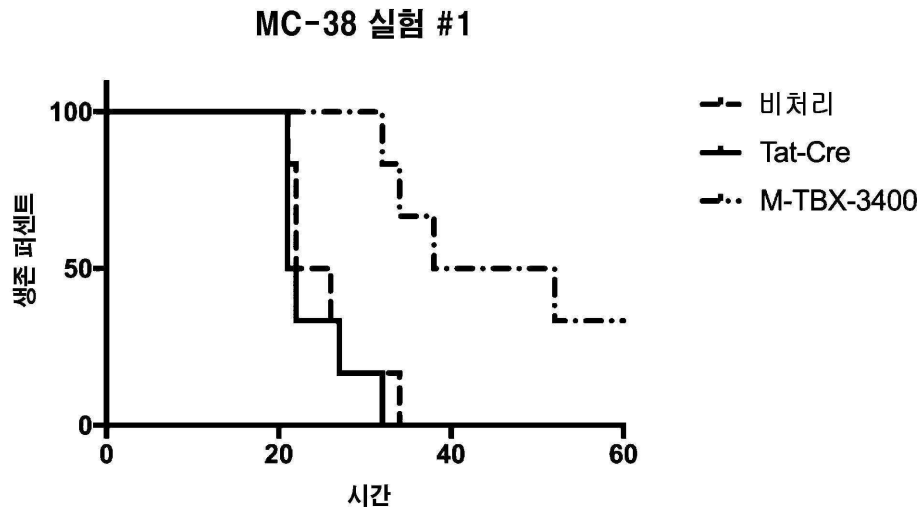
도면3



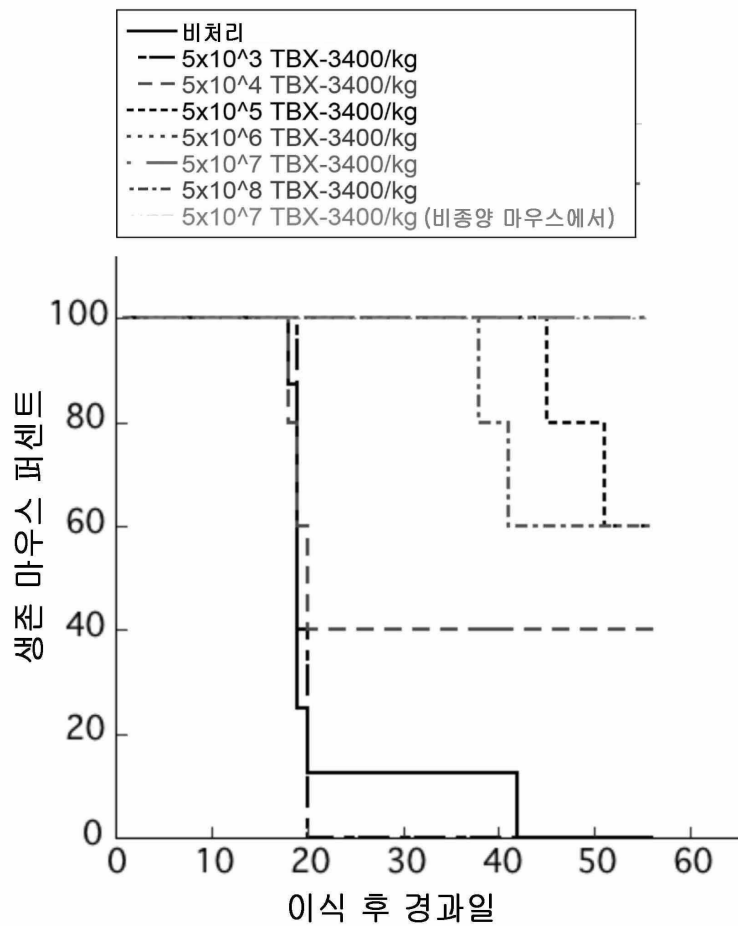
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> TAIGA BIOTECHNOLOGIES, INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF CANCER

<130> 106417-0333

<140> Not Yet Assigned

<141> Herewith

<150> 62/540,901

<151> 2017-08-03

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 476

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe

20 25 30

Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln Gln Gln Gln Gln Ser Glu

35 40 45

Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu

50 55 60

Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser

65 70 75 80

Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser Leu Arg Gly Asp Asn Asp

85 90 95

Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp Gln Leu Glu Met Val Thr

100 105 110

Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro

115 120 125

Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp

130 135 140
 Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser Pro Asn Pro Ala Arg Gly
 165 170 175
 His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Asp Leu Ser Ala
 180 185 190
 Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu
 195 200 205

 Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala Ser Gln Asp Ser Ser Ala
 210 215 220
 Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser Ser Thr Glu Ser Ser Pro
 225 230 235 240
 Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His Glu Glu Thr Pro Pro Thr
 245 250 255
 Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp
 260 265 270

 Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Ser Glu Ser
 275 280 285
 Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys Pro Pro His Ser Pro Leu
 290 295 300
 Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His Gln His Asn Tyr Ala Ala
 305 310 315 320
 Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu
 325 330 335

 Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser Asn Asn Arg Lys Cys Thr
 340 345 350
 Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn Val Lys Arg Arg Thr His
 355 360 365
 Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe
 370 375 380

Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro
385 390 395 400

Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln
405 410 415

Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu Arg Lys Arg
420 425 430

Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln Leu Arg Lys Gly Glu Leu
435 440 445

Asn Ser Lys Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu
450 455 460

Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
465 470 475

<210> 2

<211> 439

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr
20 25 30

Gln Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser
50 55 60

Arg Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe
65 70 75 80

Ser Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala
85 90 95

Asp Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn
100 105 110

Gln Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile
115 120 125

Ile Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu
130 135 140

Val Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly
145 150 155 160

Ser Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu
165 170 175

Tyr Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser
180 185 190

Val Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys
195 200 205

Ala Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu
210 215 220

Ser Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu
225 230 235 240

His Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln
245 250 255

Glu Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala
260 265 270

Pro Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser
275 280 285

Lys Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr
290 295 300

His Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro
305 310 315 320

Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile
325 330 335

Ser Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu
340 345 350

Asn Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn

355 360 365
 Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu
 370 375 380
 Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr
 385 390 395 400
 Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 405 410 415
 Glu Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu
 420 425 430

 Gln Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 435
 <210> 3
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met
 1 5 10 15
 Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln
 35 40 45

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

 Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln

115	120	125	
Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile			
130	135	140	
Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val			
145	150	155	160
Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser			
165	170	175	
Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr			
180	185	190	
Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val			
195	200	205	
Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala			
210	215	220	
Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser			
225	230	235	240
Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His			
245	250	255	
Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu			
260	265	270	
Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro			
275	280	285	
Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys			
290	295	300	
Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His			
305	310	315	320
Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala			
325	330	335	
Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser			
340	345	350	
Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn			
355	360	365	

Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
370 375 380

Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
385 390 395 400

Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
405 410 415

Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
420 425 430

Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
435 440 445

Leu Arg
450

<210> 4

<211> 434

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp
1 5 10 15

Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln
20 25 30

Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile
35 40 45

Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg
50 55 60

Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp
85 90 95

Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln
100 105 110

Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile

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

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

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

 290 295 300
 Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
 325 330 335
 Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
 340 345 350
 Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu

 355 360 365

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

420 425 430
 Leu Arg

<210> 5

<211> 67

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr
 20 25 30
 Ala Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 35 40 45

Glu Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu
 50 55 60

Gln Leu Arg

65

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

E-box DNA binding domain sequence

<400> 6

Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus 1

<400> 7

Met Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 8

His His His His His His

1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 9

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 10

Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp

1 5

<210> 11

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met

1 5 10 15

Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp

20 25 30

Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln

35 40 45

Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile

50 55 60

Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg

65 70 75 80

Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser

85 90 95

Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp

100 105 110

Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln

115 120 125

Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile

130 135 140

Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val

145 150 155 160

Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser

165 170 175

Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr

180 185 190

Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val

195 200 205
 Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala
 210 215 220

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

 Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys
 290 295 300
 Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His
 305 310 315 320
 Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala
 325 330 335
 Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser
 340 345 350

 Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn
 355 360 365
 Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu
 370 375 380
 Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala
 405 410 415

 Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 420 425 430
 Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
 435 440 445

Leu Arg Asn Ser Cys Ala

450

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 12

Lys Gly Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus 1

<400> 13

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5