(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0156687
(43) 공개일자 2023년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C07K 14/715* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7020555
(22) 출원일자(국제) 2021년11월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/059931
(87) 국제공개번호 WO 2022/109162
국제공개일자 2022년05월27일
(30) 우선권주장
63/116,611 2020년11월20일 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 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 스위트 550 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
베이츠, 로리
미국 98102 워싱턴 시애틀 이스트레이크 에비뉴 이스트 1616 스위트 550 우모자 바이오파마 인코포레이티드 내
(74) 대리인
양영준, 이상남

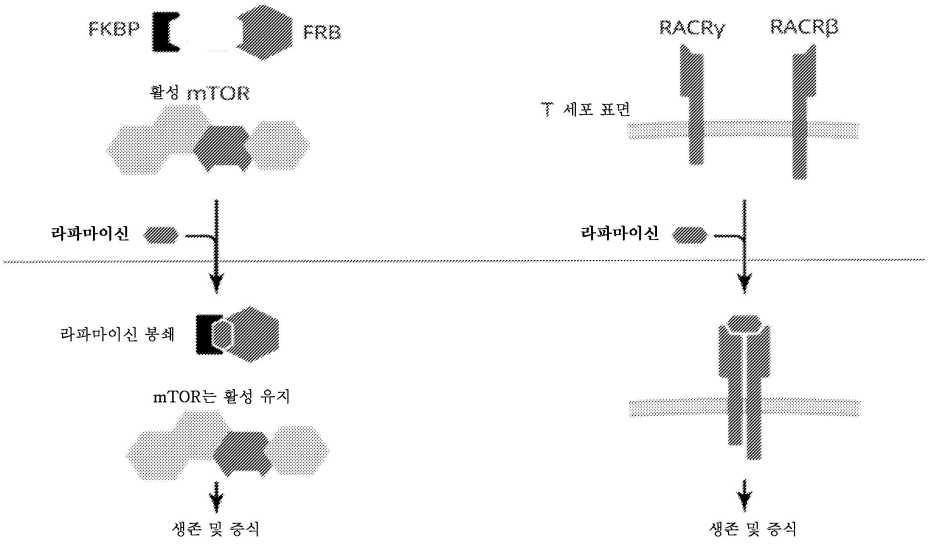
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **다수 폴리뉴클레오티드들의 전달을 위한 벡터 시스템 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 각 폴리뉴클레오티드가 거대분자 복합체의 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 시스템에 관한 것이다. 폴리뉴클레오티드들에 의해 형질도입된 세포에서의 거대분자 복합체의 조립은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/7155 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 9/90 (2013.01)
C12Y 502/01008 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2740/15043 (2013.01)
C12N 2830/002 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

각 폴리뉴클레오티드가 거대분자 복합체의 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드에 의해 형질도입된 세포에서의 거대분자 복합체의 조립은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하는 것인, 벡터 시스템.

청구항 2

제2항에 있어서, 거대분자 복합체가 다중부분 세포-표면 수용체인 벡터 시스템.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리뉴클레오티드들 중 2종을 포함하는 단일 벡터를 포함하는 벡터 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서, 단일 벡터가 단일 렌티바이러스 벡터인 벡터 시스템.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 각 벡터가 폴리뉴클레오티드들 중 1종을 포함하는 2종의 벡터를 포함하는 벡터 시스템.

청구항 6

제5항에 있어서, 벡터들이 2종의 렌티바이러스 벡터인 벡터 시스템.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 거대분자 복합체의 조립이 리간드에 의해 조절되는 것인 벡터 시스템.

청구항 8

제7항에 있어서, 벡터 시스템이 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인 (FRB 도메인) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제1 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드, 및 FK506 결합 단백질 도메인 (FKBP) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제2 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하고/거나; 리간드가 라파마이신인 벡터 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서, FRB 도메인 폴리펩티드가 서열식별번호: 1에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 것인 벡터 시스템.

청구항 10

제8항에 있어서, FKBP 폴리펩티드가 서열식별번호: 2에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 것인 벡터 시스템.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 거대분자 복합체의 발현이 유도성 유전자 또는 생화학 시스템의 조절하에 있는 것인 벡터 시스템.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 각 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터 시스템.

청구항 13

제12항에 있어서, 프로모터가 유도성 프로모터인 벡터 시스템.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드들 중 적어도 1종이 면역억제제에 대하여 내성을 부여하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 벡터 시스템.

청구항 15

제14항에 있어서, 면역억제제에 대하여 내성을 부여하는 폴리뉴클레오티드 서열이 라파마이신에 결합하는 폴리펩티드를 코딩하며, 여기서 임의적으로 폴리펩티드는 FRB인 벡터 시스템.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열이 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에 형질도입될 수 있는 것인 벡터 시스템.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열이 생체내에서 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에 형질도입될 수 있는 것인 벡터 시스템.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열이 시험관내에서 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에 형질도입될 수 있는 것인 벡터 시스템.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1종의 레트로바이러스 입자를 포함하며, 여기서 레트로바이러스 입자는 1종 이상의 형질도입 증강인자를 포함하고, 여기서 형질도입 증강인자는 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체 및 공동-자극 분자로 이루어진 군에서 선택되는 것인 벡터 시스템.

청구항 20

제19항에 있어서, 1종 이상의 형질도입 증강인자가 항-CD3scFv, CD86 및 CD137L 중 1종 이상을 포함하는 것인 벡터 시스템.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 벡터가 하기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 벡터 시스템:

(a) 프로모터;

(b) FK506 결합 단백질 (FKBP) 도메인 또는 그의 일부

(c) IL-2 수용체 막횡단 도메인

(d) 인터류킨-2 수용체 서브유닛 감마 (IL2Rγ) 도메인; 및

(e) 제1 키메라 항원 수용체 (CAR).

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 벡터가 하기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것

인 벡터 시스템:

(a) 프로모터;

(b) FKBP 라파마이신 결합 (FRB) 도메인 또는 그의 일부

(c) IL-2 수용체 막횡단 도메인

(d) 인터류킨-2 수용체 서브유닛 베타 (IL2Rβ) 도메인; 및

(e) 제2 CAR.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, FKBP 도메인 또는 그의 일부 및 FRB 도메인 또는 그의 일부가 라파마이신의 존재하에 이종이량체화되어 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하는 것인 벡터 시스템.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터가 MND인 벡터 시스템.

청구항 25

제24항에 있어서, MND 프로모터가 서열식별번호: 3에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 것인 벡터 시스템.

청구항 26

제21항에 있어서, IL2Rɣ 도메인 폴리펩티드가 서열식별번호: 4에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 것인 벡터 시스템.

청구항 27

제22항에 있어서, IL2Rβ 도메인 폴리펩티드가 서열식별번호: 5에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 것인 벡터 시스템.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 CAR 폴리펩티드가 세포 표면 항원 CD19에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 포함하는 것인 벡터 시스템.

청구항 29

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 CAR 폴리펩티드가 세포 표면 항원 CD20에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 포함하는 것인 벡터 시스템.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 벡터 시스템을 대상체에게 투여하는 것

을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **[관련 출원]**

[0002] 본 출원은 2020년 11월 20일자 U.S. 임시 출원 제63/116,611호의 우선권 및 혜택을 주장한다. 상기 언급된 특허 출원의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **[기술 분야]**

[0004] 본 개시내용은 일반적으로 거대분자 복합체의 구성요소들을 코딩하는 바이러스 벡터 시스템, 그를 포함하는 조

성물, 및 그의 사용 방법에 관한 것이다.

[0005] **[서열 목록]**

[0006] 본 출원은 EFS-웹을 통하여 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 포함하는 바, 그 전체가 의거 참조로 포함된다. 2021년 11월 17일에 생성된 상기 ASCII 사본은 명칭이 "UMOJ-008-01WO_SeqList_ST25.txt"이며, 47 KB 크기이다.

배 경 기 술

[0007] 세포에의 폴리뉴클레오티드의 전달을 위한 많은 벡터 시스템들이 전달될 폴리뉴클레오티드의 크기에 상위 한계를 가지고 있다. 예를 들어, AAV 벡터는 약 ~5 kb의 패키지화 한계를 가진다. 렌티바이러스 벡터는 약 ~10 kB의 패키지화 한계를 가지고 있다. 더 큰 유전자를 전달하기 위하여, 다양한 기술들이 개발되어 있다. 공지의 방법들은 일반적으로 세포에서의 폴리뉴클레오티드들의 상호작용, 예컨대 상동성 재조합 또는 트랜스-스플라이싱에 의존한다. 예를 들면, 문헌 [Tornabene, P. et al. (2020) *Human Gene Therapy* 31(47-56)]은 대형 유전자를 전달하기 위한 다수 AAV 벡터의 사용에 대해 개시하고 있다. 문헌 [Zufferey, R. et al. (1998) *Journal of Virology* 72;12(9873-9880)]은 더 큰 클로닝 용량을 가지는 안정한 이전유전자 발현을 위한 자가-불활성화 HIV-1 벡터의 사용에 대해 개시하고 있다. 문헌 [Cockrell, A.S. and Kafri, T. (2007) *Molecular Biotechnology* 36(184-204)]은 비분할 세포의 형질도입 및 유전자이전 동물의 생성을 위한 렌티바이러스 벡터의 사용에 대해 개시하고 있다.

[0008] 폴리뉴클레오티드 전달 기술에 있어서의 충족되지 않은 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0009] **[발명의 개요]**

[0010] 본 개시내용의 일 측면은 각 폴리뉴클레오티드가 거대분자 복합체의 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 상기 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드에 의해 형질도입된 세포에서의 상기 거대분자 복합체의 조립은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하는, 벡터 시스템을 제공한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 상기 벡터 시스템은 다중부분(multipartite) 세포-표면 수용체인 거대분자 복합체를 포함한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 폴리뉴클레오티드들 중 2종을 포함하는 단일 벡터를 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 단일 렌티바이러스 벡터인 단일 벡터를 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 각 벡터가 폴리뉴클레오티드들 중 1종을 포함하는 2종의 벡터를 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 2종의 렌티바이러스 벡터인 벡터들을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 상기 거대분자 복합체의 조립은 리간드에 의해 조절된다.

[0017] 일부 실시양태에서, 상기 벡터 시스템은 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인 (FRB 도메인) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제1 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드, 및 FK506 결합 단백질 도메인 (FKBP) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제2 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함하고/거나; 리간드가 라파마이신이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 FRB 도메인 폴리펩티드를 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 서열식별번호: 2에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 FRB 도메인 폴리펩티드를 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 서열식별번호: 6에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 FKBP 폴리펩티드를 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 거대분자 복합체의 발현은 유도성 유전자 또는 생화학 시스템의 조절하에 있다.

[0022] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템의 각 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0023] 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이다.

[0024] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드들 중 적어도 1종은 면역억제제에 대하여 내성을 부여하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 면역억제제에 대하여 내성을 부여하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 라파마이신에 결합하는 폴리펩티드를 코딩하며, 여기서 임의적으로 상기 폴리펩티드는 FRB이다.

[0026] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에 형질도입될 수 있다.

[0027] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 생체내에서 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에 형질도입될 수 있다.

[0028] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 시험관내에서 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포에 형질도입될 수 있다.

[0029] 일부 실시양태에서, 두 벡터 게놈에 의해 형질도입된 세포는 선택적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 두 벡터 게놈에 의한 형질도입은 형질도입된 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 적어도 1종의 레트로바이러스 입자를 포함하며, 여기서 상기 레트로바이러스 입자는 1종 이상의 형질도입 증강인자(enhancer)를 포함하고, 여기서 상기 형질도입 증강인자는 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체 및 공동-자극 분자로 이루어진 군에서 선택된다.

[0031] 일부 실시양태에서, 상기 1종 이상의 형질도입 증강인자는 항-CD3scFv, CD86 및 CD137L 중 1종 이상을 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 제1 벡터는 하기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0033] (a) 프로모터;

[0034] (b) FK506 결합 단백질 (FKBP) 도메인 또는 그의 일부

[0035] (c) IL-2 수용체 막횡단 도메인

[0036] (d) 인터류킨-2 수용체 서브유닛 감마 (IL2Rɣ) 도메인; 및

[0037] (e) 제1 키메라 항원 수용체 (CAR).

[0038] 일부 실시양태에서, 제2 벡터는 하기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0039] (a) 프로모터;

[0040] (b) FKBP 라파마이신 결합 (FRB) 도메인 또는 그의 일부

[0041] (c) IL-2 수용체 막횡단 도메인

[0042] (d) 인터류킨-2 수용체 서브유닛 베타 (IL2Rβ) 도메인; 및

[0043] (e) 제2 CAR.

[0044] 일부 실시양태에서, 상기 FKBP 도메인 또는 그의 일부 및 FRB 도메인 또는 그의 일부는 라파마이신의 존재하에 이종이량체화되어 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진한다.

[0045] 상기 벡터 시스템의 일부 실시양태에서, 프로모터는 MND이다.

[0046] 일부 실시양태에서, 상기 MND 프로모터는 서열식별번호: 3에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rɣ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 4에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rβ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 상기 제1 CAR 폴리펩티드는 세포 표면 항원 CD19에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 상기 제2 CAR 폴리펩티드는 세포 표면 항원 CD20에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 포함한다.

[0051] 본 개시내용의 일 측면은 상기한 바와 같은 실시양태들 중 어느 것의 벡터 시스템을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0052] 본 발명의 추가적인 측면 및 실시양태들은 하기하는 상세한 설명에 의해 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 각각 거대분자 복합체의 구성요소 (RACRɣ 및 RACRβ)를 코딩하며 결합하여 라파마이신에 대한 내성을 부여하는 2종의 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩하는 이중 벡터 시스템의 실시양태를 도시하는 도식이다. 상기 벡터 시스템은 FKBP와의 복합체화를 통하여 라파마이신을 추가적으로 봉쇄하는 세포질액 FRB 도메인 단백질을 코딩할 수도 있다.

도 2는 각각 거대분자 복합체의 구성요소 (RACRɣ 및 RACRβ), 세포질액 FRB 도메인 및 CAR을 코딩하는 2종의 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩하는 이중 벡터 시스템의 실시양태를 도시하는 도식이다.

도 3은 pRRL-MND-인간-Frb-RACCRb-CD19_CAR-VTw의 벡터 맵을 도시한다.

도 4는 pRRL-MND-인간-Frb-RACCRg-CD20_CAR-VTw의 벡터 맵을 도시한다.

도 5A-5B는 렌티바이러스 입자 역가의 그래프를 도시한다. 상청액 샘플 (도 5A)의 경우, 렌티바이러스 역가는 3.65×10^5 TU/ml이었으며, 농축 샘플 (도 5B)의 경우, 렌티바이러스 역가는 1.12×10^8 TU/ml이었다.

도 6A-6B는 형질도입된 T 세포에서의 CD19 및 CD20 CAR의 표면 발현을 도시하는 유동 세포측정법 염색 플롯이다. 도 6A는 라파마이신을 사용하여 자극되지 않은 이중 벡터 시스템 형질도입된 세포의 유동 세포측정법 염색 플롯을 도시한다. 도 6B는 이중 벡터 시스템이 형질도입되고 10 mM 라파마이신을 사용하여 자극된 세포의 유동 세포측정법 염색 플롯을 도시한다.

도 7A-7D는 종양 세포와 공동-배양된 CAR T 세포를 도시하는 유동 세포측정법 염색 플롯이다. CD19 음성/CD20 음성 K562 종양 세포는 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포의 부재 (도 7A) 또는 존재 (도 7B)하에서 영향을 받지 않고 유지되었다. CD19 양성/CD20 음성 K562 KI 종양 세포가 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포의 부재 (도 7C)하에서 영향을 받지 않은 반면, 이중 벡터 시스템이 형질도입된 세포는 CD19 양성/CD20 음성 종양 세포를 박멸하였다 (도 7D).

도 8A-8B는 CD19 KO/CD20+ RAJI 종양 세포와 공동-배양된 CD20 CAR을 발현하는 T 세포를 도시하는 유동 세포측정법 염색 플롯이다. 형질도입되지 않은 T 세포에 의해서는 CD19 KO/CD20+ RAJI 종양 세포가 영향을 받지 않은 반면 (도 8A), 이중 벡터 시스템이 형질도입된 세포는 CD19 음성/CD20 양성 RAJI 종양 세포를 박멸하였다 (도 8B).

도 9는 대조 세포 (표적 없음), K562 세포 (표면 항원 없음), K562 CD19 녹-인(knock-in) (KI) 세포 (K562 +19), RAJI CD19 녹-아웃(knock-out) (KO) 세포 (Raji -19) 또는 RAJI CD19+/CD20+ (Raji) 세포와의 공동-배양 68시간 후, 대조 (표적 세포 단독), 비-형질도입된 T 세포 (CAR 없음) 및 형질도입된 T 세포 (DP CAR)에서의 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포에 반응하는 IFNɣ 시토카인 생성을 도시하는 그래프이다.

도 10은 대조 세포 (표적 없음), K562 세포 (표면 항원 없음), K562 CD19 녹-인 (KI) 세포 (K562 +19), RAJI CD19 녹-아웃 (KO) 세포 (Raji -19) 또는 RAJI CD19+/CD20+ (Raji) 세포와의 공동-배양 68시간 후, 대조 (표적 세포 단독), 비-형질도입된 T 세포 (CAR 없음) 및 형질도입된 T 세포 (DP CAR)에서의 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포에 반응하는 IL-2 시토카인 생성을 도시하는 그래프이다.

도 11은 대조 세포 (표적 없음), K562 세포 (표면 항원 없음), K562 CD19 녹-인 (KI) 세포 (K562 +19), RAJI CD19 녹-아웃 (KO) 세포 (Raji -19) 또는 RAJI CD19+/CD20+ (Raji) 세포와의 공동-배양 68시간 후, 대조 (표적

세포 단독), 비-형질도입된 T 세포 (CAR 없음) 및 형질도입된 T 세포 (DP CAR)에서의 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포에 반응하는 TNFα 시토카인 생성을 도시하는 그래프이다.

도 12는 대조 세포 (표적 없음), K562 세포 (표면 항원 없음), K562 CD19 녹-인 (KI) 세포 (K562 +19), RAJI CD19 녹-아웃 (KO) 세포 (Raji -19) 또는 RAJI CD19+/CD20+ (Raji) 세포와의 공동-배양 68시간 후, 대조 (표적 세포 단독), 비-형질도입된 T 세포 (CAR 없음) 및 형질도입된 T 세포 (DP CAR)에서의 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포에 반응하는 IL-13 시토카인 생성을 도시하는 그래프이다.

도 13A-13C는 라파마이신 자극 후의 이중 CAR T 세포 증강을 도시하는 유동 세포측정법 염색 플롯이다. FITC-CD19 항원 및 PE-CD20 항원을 사용하여 CD19 및 CD20 CAR 둘 다의 표면 발현을 분석하였다. 자극-전 (도 13A), 항원을 발현하지 않는 K562 세포와의 공동-배양 후 (도 13B) 및 CD19를 발현하는 K562 세포와의 공동-배양 후 (도 13C)에 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포를 분석하였다.

도 14는 7일 동안의 RAJI 표적 세포 공동-배양에 반응하는 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포의 증식을 도시하는 그래프이다. 형질도입된 이펙터 T 세포:RAJI 표적 세포 비의 함수로서 세포 수를 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 개시내용은 일반적으로 각 폴리뉴클레오티드가 거대분자 복합체의 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 상기 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드에 의해 형질도입된 세포에서의 상기 거대분자 복합체의 조립은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하는, 벡터 시스템에 관한 것이다.

[0055] **정의**

[0056] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 용어 (기술 및 과학 용어 포함)는 본 발명이 속하는 관련 기술분야 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 통상적으로 사용되는 사전류에 정의되어 있는 것들과 같은 용어들이 본 출원 및 관련 기술분야 맥락에서의 그의 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 그렇게 명시적으로 정의되지 않는 한 이상화되거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되어서는 안 된다는 것 또한 이해하고 있을 것이다. 상세한 설명에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시양태를 기술할 목적의 것으로서, 제한하고자 하는 것이 아니다. 본원에서 언급되는 모든 공개, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌들은 그 전체가 참조로 포함된다. 용어에 있어서의 충돌의 경우, 본 명세서가 우선한다.

[0057] 본 발명의 상세한 설명 및 첨부된 청구범위에서 사용될 때, 단수 형태인 "하나"는 문맥상 분명하게 달리 표시되지 않는 한, 복수의 형태도 포함하고자 하는 것이다.

[0058] 본원에서 사용될 때의 "대상체"에는 포유동물, 예컨대 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 낙타, 양 또는 돼지, 바람직하게는 인간이 포함된다.

[0059] 또한, 본원에서 사용될 때의 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 환자 상태의 개선 (예컨대 1종 이상의 증상의 감소 또는 개선), 치유 등을 포함하여, 질환 또는 장애를 가지고 있는 대상체에게 이득을 주는 임의의 유형의 행동 또는 투여를 지칭한다.

[0060] 역시 본원에서 사용될 때, "및/또는"은 관련 열거 항목들 중 하나 이상의 임의의 모든 가능한 조합은 물론, 대안 (또는)으로 해석되는 경우에서의 조합의 결핍도 지칭하여 포괄한다.

[0061] 문맥상 달리 표시되지 않는 한, 본원에서 기술되는 다양한 특징들은 임의의 조합으로서 사용될 수 있는 것으로 구체적으로 의도된다. 또한, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제시되는 임의의 특징 또는 특징 조합이 배제되거나 생략될 수 있다는 것도 고려한다. 예시하자면, 명세서상 복합체가 구성요소 A, B 및 C를 포함하는 것으로 언급되어 있는 경우, 이는 구체적으로 A, B 또는 C 중 어느 것 또는 이들의 조합이 생략 및 부인될 수 있다는 것을 의도한다.

[0062] 본원에서 사용될 때, 예, 예시적인이라는 용어 및 이들의 문법적 변형들이 본원에서 논의되는 비-제한적인 예 및/또는 변형 실시양태들을 지칭하고자 하는 것이며, 1종 이상의 다른 실시양태와 비교한 본원에서 논의되는 1종 이상의 실시양태의 선호를 표시하고자 하는 것은 아니라는 것 또한 이해될 것이다.

[0063] 본원에서 인용되는 모든 공개, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌들은 그 참고문헌이 제시되는 문장 및/또는 문단과 관련된 교시에 대하여 그 전체가 참조로 포함된다.

[0064] 문맥상 달리 표시되지 않는 한, 본원에서 기술되는 다양한 특징들은 임의의 조합으로서 사용될 수 있는 것으로 구체적으로 의도된다.

[0065] 또한, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제시되는 임의의 특징 또는 특징 조합이 배제되거나 생략될 수 있다는 것도 고려한다.

[0066] 통상의 기술자라면, 유전자 코드 축퇴성의 결과로서 수많은 서로 다른 폴리뉴클레오티드 및 핵산들이 동일한 폴리펩티드를 코딩할 수 있다는 것을 이해하고 있을 것이다. 또한, 통상의 기술자라면, 일상적인 기술을 사용하여 본원에서 기술되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열에 영향을 주지 않고 폴리펩티드가 발현되어야 하는 임의의 특정 숙주 생물체의 코돈 용법을 반영하는 뉴클레오티드 치환을 구성할 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0067] 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 이들은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 이들은 그 내부에 합성 또는 변형 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수도 있다. 올리고뉴클레오티드에 있어서의 수많은 서로 다른 유형의 변형이 관련 기술분야에 알려져 있다. 여기에는 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 백본, 분자의 3' 및/또는 5' 말단에서의 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 첨가가 포함된다. 본원에서 기술되는 바와 같은 용도의 목적상, 폴리뉴클레오티드는 관련 기술분야에서 가용한 어떠한 방법에 의해서도 변형될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 그와 같은 변형들은 해당 폴리뉴클레오티드의 생체내 활성 또는 수명을 증강하기 위하여 수행될 수 있다.

[0068] 뉴클레오티드 서열과 관련한 "변이체", "상동체" 또는 "유도체"라는 용어에는 서열로부터의 또는 서열로의 1개 (또는 그 초과) 핵산의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 또는 첨가가 포함된다. 핵산은 분열원성 형질도입 증강인자를 코딩하는 1종 이상의 서열 및/또는 시토카인-기반 형질도입 증강인자를 코딩하는 1종 이상의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다. 절단 부위는 자가-절단성이어서, 폴리펩티드가 생성될 때 임의의 외부 절단 활성에 대한 필요성 없이 그것이 즉시 수용체 구성요소 및 신호전달 구성요소로 절단될 수 있다.

[0069] **실시양태**

[0070] 본 개시내용의 일 측면은 각 폴리뉴클레오티드가 거대분자 복합체의 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 상기 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드에 의해 형질도입된 세포에서의 상기 거대분자 복합체의 조립은 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진하는, 벡터 시스템을 제공한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 상기 벡터 시스템은 다중부분 세포-표면 수용체인 거대분자 복합체를 포함한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 상기 다중부분 세포-표면 수용체는 증식성 수용체(proliferatory receptor)이다.

[0073] 일부 실시양태에서, 임의적으로 리간드에 의해 유도되는 상기 증식성 수용체는 2종의 서로 다른 폴리뉴클레오티드상으로 세포에 전달된다.

[0074] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 폴리뉴클레오티드들 중 2종을 포함하는 단일 벡터를 포함한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 단일 렌티바이러스 벡터인 단일 벡터를 포함한다.

[0076] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 각 벡터가 폴리뉴클레오티드들 중 1종을 포함하는 2종의 벡터를 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 2종의 렌티바이러스 벡터인 2종의 벡터를 포함한다.

[0078] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 각 폴리뉴클레오티드는 별도의 캡시드에 봉입된다.

[0079] 일부 실시양태에서, 상기 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드는 단일 렌티바이러스 입자 내에 공동-패키지화된다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드는 적어도 2종의 렌티바이러스 입자로 패키지화된다.

[0080] 일부 실시양태에서는, 2종의 렌티바이러스 게놈이 동일한 세포에 형질도입되어 통합된다.

[0081] 일부 실시양태에서, 거대분자 복합체의 조립은 리간드에 의해 조절된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 상기 리간드는 라파마이신이다.

[0083] 일부 실시양태에서, 리간드는 단백질, 항체, 소형 분자 또는 약물이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (라팔로그(rapalog))이다. 일부 실시양태에서, 상기 라팔로그는 하기 라파마이신

대비 변형들 중 1종 이상을 가지는 라파마이신의 변이체를 포함한다: C7, C42 및/또는 C29에서의 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 대체; C13, C43 및/또는 C28에서의 히드록시의 제거, 유도체화 또는 대체; C14, C24 및/또는 C30에서의 케톤의 환원, 제거 또는 유도체화; 5-원 프롤릴 고리에 의한 6-원 피페콜레이트 고리의 대체; 및 시클로헥실 고리상에서의 대안적인 치환 또는 치환된 시클로펜틸 고리에 의한 시클로헥실 고리의 대체. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 라팔로그는 에베롤리무스, 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 조타롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16- (S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 소듐 마이코페르놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, 라파민, AP23573, 또는 AP1903, 또는 이들의 대사물, 유도체 및/또는 조합이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 IMID-클래스 약물 (예컨대 탈리도미드, 포말리디미드, 레날리도미드 또는 관련 유사체들)이다.

[0084] 일부 실시양태에서, 상기 분자는 FK1012, 타크롤리무스 (FK506), FKCsA, 라파마이신, 쿠메르마이신, 기베렐린, HaXS, TMP-H태그 및 ABT-737, 또는 이들의 기능성 유도체에서 선택된다.

[0085] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인 (FRB 도메인) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제1 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 FK506 결합 단백질 도메인 (FKBP) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제2 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 FKBP-라파마이신 복합체 결합 도메인 (FRB 도메인) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제1 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드, 및 FK506 결합 단백질 도메인 (FKBP) 또는 그의 기능성 변이체를 포함하는 거대분자 복합체의 제2 폴리펩티드 구성요소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 서열식별번호: 1에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 FRB 도메인 폴리펩티드를 포함한다.

[0089] MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETS FNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO: 1)

[0090] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 서열식별번호: 2에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 FRB 도메인 폴리펩티드를 포함한다.

[0091] MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETS FNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISK (SEQ ID NO: 2)

[0092] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 서열식별번호: 6에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유하는 FKBP 폴리펩티드를 포함한다.

[0093] GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVF DVELLKLGE (SEQ ID NO: 6)

[0094] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드들 중 적어도 1종은 면역억제제에 대하여 내성을 부여하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0095] 일부 실시양태에서, 면역억제제에 대하여 내성을 부여하는 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 라파마이신에 결합하는 폴리펩티드를 코딩하며, 여기서 임의적으로 상기 폴리펩티드는 FRB이다.

[0096] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템의 폴리뉴클레오티드들 중 적어도 1종은 세포질액 FRB 도메인을 포함한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 상기 FRB 도메인 또는 그의 일부 및 FKBP 또는 그의 일부는 형질도입된 세포에서 라파마이신을 봉쇄하는 복합체를 형성한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 상기 FKBP 도메인 또는 그의 일부 및 FRB 도메인 또는 그의 일부는 라파마이신의 존재하에 이종이량체화되어 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 거대분자 복합체의 발현은 유도성인 유전자 또는 생화학 시스템의 조절하에 있다.

[0100] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템의 각 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0101] 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 레트로바이러스 입자 및/또는 렌티바이러스 입자는 상기 리간드에 특이적으로 결합하는 수용체를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 리간드에 특이적으로 결합하는 수용체를 코딩하는 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터에는 비제한적으로 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, CAG 프로모터, SV40 프로모터, SV40/CD43 프로모터 및 MND 프로모터가 포함된다.

[0103] 벡터 시스템의 일부 실시양태에서, 상기 프로모터는 MND이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 상기 MND 프로모터는 서열식별번호: 3에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0105] GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGT
AAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAAT
ATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGG
CCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGA
GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTG
CCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTC
TGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
GCTAGC (SEQ ID NO: 3)

[0106] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 적어도 1종의 레트로바이러스 입자를 포함하며, 여기서 상기 레트로바이러스 입자는 본원에서 기술되는 바와 같은 1종 이상의 형질도입 증강인자를 포함한다.

[0107] 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 적어도 1종의 레트로바이러스 입자를 포함하며, 여기서 상기 레트로바이러스 입자는 1종 이상의 형질도입 증강인자를 포함하고, 여기서 상기 형질도입 증강인자는 T-세포 활성화 수용체, NK-세포 활성화 수용체 및 공동-자극 분자로 이루어진 군에서 선택된다.

[0108] 일부 실시양태에서, 상기 1종 이상의 형질도입 증강인자는 항-CD3scFv, CD86 및 CD137L 중 1종 이상을 포함한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 T 세포에 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 NK 세포에 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 NKT 세포에 형질도입될 수 있다.

[0110] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 생체내에서 T 세포에 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 생체내에서 NK 세포에 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 생체내에서 NKT 세포에 형질도입될 수 있다.

[0111] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 시험관내에서 T 세포에 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 시험관내에서 NK 세포에 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드 서열은 시험관내에서 NKT 세포에 형질도입될 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 제1 벡터는 하기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0113] (a) 프로모터;

[0114] (b) FK506 결합 단백질 (FKBP) 도메인 또는 그의 일부

[0115] (c) IL-2 수용체 막횡단 도메인

[0116] (d) 인터류킨-2 수용체 서브유닛 감마 (IL2Rγ) 도메인; 및

[0117] (e) 제1 키메라 항원 수용체 (CAR).

[0118] 일부 실시양태에서, 제2 벡터는 하기를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다:

[0119] (a) 프로모터;

[0120] (b) FKBP 라파마이신 결합 (FRB) 도메인 또는 그의 일부

[0121] (c) IL-2 수용체 막횡단 도메인

[0122] (d) 인터류킨-2 수용체 서브유닛 베타 (IL2Rβ) 도메인; 및

[0123] (e) 제2 CAR.

[0124] 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rɣ 도메인과 상기 IL2Rβ 도메인은 이종이량체화된다. 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 도메인과 IL2Rβ 도메인은 리간드의 존재하에 이종이량체화되어 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진한다. 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 도메인과 IL2Rβ 도메인은 라파마이신의 존재하에 이종이량체화되어 세포의 성장 및/또는 생존을 촉진한다.

[0125] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 4에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0126] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 23에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0127] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 24에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0128] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 25에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0129] 일부 실시양태에서, IL2Rβ 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 대하여 적어도 75 %, 적어도 80 %, 적어도 85 %, 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 99 % 또는 100 %의 동일성을 공유한다.

[0130] 일부 실시양태에서, 상기 제1 CAR은 ABT-806, CD3, CD28, CD134, CD137, 폴레이트 수용체, 4-1BB, PD1, CD45, CD8a, CD4, CD8, CD4, LAG3, CD3e, CD69, CD45RA, CD62L, CD45RO, CD62F, CD95, 5T4, 알파페토단백질 (AFP), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), BCMA, B-인간 융모막 고나도트로핀, CA-125, 암배아 항원 (CEA), 암배아 항원 (CEA), CD123, CD133, CD138, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD33, CD34, CD40, CD44, CD56, CLL-1, c-Met, CMV-특이적 항원, CS-1, CSPG4, CTLA-4, DLL3, 디시알로강글리오시드 GD2, 도관-상피 뮤신, EBV-특이적 항원, EGFR, EGFR 변이 III (EGFRvIII), ELF2M, 엔도글린, 에프린 B2, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 상피 종양 항원, ErbB2 (HER2/neu), 섬유모세포 연관 단백질 (fap), FLT3, 폴레이트 결합 단백질, GD2, GD3, 교종-연관 항원, 글리코스핑고지질, gp36, HBV-특이적 항원, HCV-특이적 항원, HER1-HER2, HER2-HER3 조합, HERV-K, 고분자량-흑색종 연관 항원 (FDVTW- MAA), HIV-1 외피 글리코단백질 gp41, HPV-특이적 항원, 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제, IGFI 수용체, IGF-II, IL-1 1R알파, IL-13R-a2, 인플루엔자 바이러스-특이적 항원; CD38, 인슐린 성장 인자 (IGF1)-1, 장 카르복실 에스테라제, 카파 사슬, LAGA-1a, 람다 사슬, 라싸 바이러스-특이적 항원, 렉틴-반응성 AFP, 계통-특이적 또는 조직 특이적 항원, MAGE, MAGE-A1, 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, 종양-특이적 펩티드 항원결정인자를 제시하는 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, M-CSF, 흑색종-연관 항원, 메소텔린, MN-CA IX, MUC- 1, mut hsp70-2, 돌연변이 p53, 돌연변이 ras, 호중구 엘라스타제, NKG2D, Nkp30, NY-ESO-1, p53, PAP, 프로스타제, 전립선 특이적 항원 (PSA), 전립선-암종 종양 항원-1 (PCTA-1), 전립선-특이적 항원 단백질, STEAP1, STEAP2, PSMA, RAGE-1, ROR1, RU1, RU2 (AS), 표면 부착 분자, 생존 및 텔로머라제, TAG-72, 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 A (EDA) 및 엑스트라 도메인 B (EDB), 테나신-C의 A1 도메인 (TnC A1), 갑상선글로불린, 종양 기질 항원, 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 (VEGFR2), HIV gp120, 또는 이들 표면 항원의 유도체, 변이체 또는 단편을 포함하는 세포-표면 항원에 대하여 특이적일 수 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, 상기 제2 CAR은 ABT-806, CD3, CD28, CD134, CD137, 폴레이트 수용체, 4-1BB, PD1, CD45, CD8a, CD4, CD8, CD4, LAG3, CD3e, CD69, CD45RA, CD62L, CD45RO, CD62F, CD95, 5T4, 알파페토단백질 (AFP), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), BCMA, B-인간 융모막 고나도트로핀, CA-125, 암배아 항원 (CEA), 암배아 항원 (CEA), CD123, CD133, CD138, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD33, CD34, CD40, CD44, CD56,

CLL-1, c-Met, CMV-특이적 항원, CS-1, CSPG4, CTLA-4, DLL3, 디시알로강글리오시드 GD2, 도관-상피 뮤신, EBV-특이적 항원, EGFR, EGFR 변이 III (EGFRvIII), ELF2M, 엔도글린, 에프린 B2, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 상피 종양 항원, ErbB2 (HER2/neu), 섬유모세포 연관 단백질 (fap), FLT3, 폴레이트 결합 단백질, GD2, GD3, 교종-연관 항원, 글리코스핑고지질, gp36, HBV-특이적 항원, HCV-특이적 항원, HER1-HER2, HER2-HER3 조합, HERV-K, 고분자량-흑색종 연관 항원 (FDVTW- MAA), HIV-1 외피 글리코단백질 gp41, HPV-특이적 항원, 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제, IGFI 수용체, IGF-II, IL-1 1R알파, IL-13R-a2, 인플루엔자 바이러스-특이적 항원; CD38, 인슐린 성장 인자 (IGF1)-1, 장 카르복실 에스테라제, 카파 사슬, LAGA-1a, 람다 사슬, 라싸 바이러스-특이적 항원, 렉틴-반응성 AFP, 계통-특이적 또는 조직 특이적 항원, MAGE, MAGE-A1, 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, 종양-특이적 펩티드 항원결정인자를 제시하는 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, M-CSF, 흑색종-연관 항원, 메소텔린, MN-CA IX, MUC- 1, mut hsp70-2, 돌연변이 p53, 돌연변이 ras, 호중구 엘라스타제, NKG2D, Nkp30, NY-ESO-1, p53, PAP, 프로스타제, 전립선 특이적 항원 (PSA), 전립선-암종 종양 항원-1 (PCTA-1), 전립선-특이적 항원 단백질, STEAP1, STEAP2, PSMA, RAGE-1, ROR1, RU1, RU2 (AS), 표면 부착 분자, 생존 및 텔로머라제, TAG-72, 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 A (EDA) 및 엑스트라 도메인 B (EDB), 테나신-C의 A1 도메인 (TnC A1), 갑상선글로불린, 종양 기질 항원, 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 (VEGFR2), HIV gp120, 또는 이들 표면 항원의 유도체, 변이체 또는 단편을 포함하는 세포-표면 항원에 대하여 특이적일 수 있다.

[0132] 본 개시내용의 일 측면은 본 개시내용에서 기술되는 바와 같은 실시양태들 중 어느 것의 벡터 시스템을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0133] **레트로바이러스 입자**

[0134] 레트로바이러스에는 각각 관련 기술분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 세포에 폴리뉴클레오티드를 전달하는 데에 사용될 수 있는 렌티바이러스, 감마-레트로바이러스 및 알파-레트로바이러스가 포함된다. 렌티바이러스는 일반적인 레트로바이러스 유전자인 gag, pol 및 env 이외에 조절 또는 구조 기능을 가지는 다른 유전자들을 포함하는 복합 레트로바이러스이다. 더 높은 복잡성은 바이러스가 잠복 감염 과정에서와 같이 그의 생활사를 조절하는 것을 가능하게 한다. 렌티바이러스의 일부 예에는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV-1 및 HIV-2) 및 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV)가 포함된다. 레트로바이러스 벡터는 HIV 독력 유전자를 다중으로 약독화하는 것, 예를 들면 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef를 결실시킴으로써 벡터를 생물학적으로 안전하게 하는 것에 의해 생성되고 있다.

[0135] 예시적인 렌티바이러스 벡터에는 각각 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Naldini et al. (1996) *Science* 272:263-7]; [Zufferey et al. (1998) *J. Virol.* 72:9873-9880]; [Dull et al. (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471]; U.S. 특허 제6,013,516호; 및 U.S. 특허 제5,994,136호에 기술되어 있는 것들이 포함된다. 일반적으로, 이들 벡터는 벡터를 포함하는 세포의 선택, 렌티바이러스 입자에의 외래 핵산의 통합, 및 표적 세포에의 핵산의 전달에 필수적인 서열을 보유하도록 구성된다.

[0136] 통상적으로 사용되는 렌티바이러스 벡터 시스템은 소위 제3-세대 시스템이다. 제3-세대 렌티바이러스 벡터 시스템은 4종의 플라스미드를 포함한다. "전달 플라스미드"는 렌티바이러스 벡터 시스템에 의해 표적 세포로 전달되는 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩한다. 전달 플라스미드는 일반적으로 숙주 게놈에의 전달 플라스미드 서열의 통합을 촉진하는 긴 말단 반복체 (LTR) 서열이 측접하는 1종 이상의 해당 이전유전자 서열을 가진다. 안전성의 이유로, 전달 플라스미드는 일반적으로 생성되는 벡터가 복제 부적격이 되도록 설계된다. 예를 들면, 전달 플라스미드에는 숙주 세포에서의 감염성 입자의 생성에 필요한 유전자 요소들이 결핍되어 있다. 또한, 전달 플라스미드는 바이러스가 "자가-불활성화" (SIN)되도록 하는 3' LTR의 결실을 포함하여 설계될 수 있다. 문헌 [Dull et al. (1998) *J. Virol.* 72:8463-71]; [Miyoshi et al. (1998) *J. Virol.* 72:8150-57]을 참조한다. 바이러스 입자는 3' 비번역 영역 (UTR) 및 5' UTR을 포함할 수도 있다. UTR은 레트로바이러스 입자에 의한 세포 접촉 후의 패키지화, 역전사 및 세포에의 전구바이러스 게놈의 통합을 지지하는 레트로바이러스 조절 요소들을 포함하고 있다.

[0137] 제3-세대 시스템은 또한 일반적으로 2종의 "패키지화 플라스미드" 및 "외피 플라스미드"를 포함한다. 상기 "외피 플라스미드"는 일반적으로 프로모터에 작동가능하게 연결된 Env 유전자를 코딩한다. 예시적인 제3-세대 시스템에서, Env 유전자는 VSV-G이며, 프로모터는 CMV 프로모터이다. 제3-세대 시스템은 1종은 gag 및 pol을 코딩하고 다른 것은 추가적인 안전성 특징 - 소위 제2-세대 시스템의 단일 패키지화 플라스미드에 대비한 개선 - 으로서 rev를 코딩하는 2종의 패키지화 플라스미드를 사용한다. 더 안전하기는 하지만, 제3-세대 시스템은 사

용하기가 더 까다롭고, 추가적인 플라스미드의 부가로 인하여 더 낮은 바이러스 역가를 초래할 수 있다. 예시적인 패키지화 플라스미드에는 비제한적으로 pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE 및 pRRL-GOI가 포함된다.

[0138] 많은 레트로바이러스 벡터 시스템들이 "패키지화 세포주"의 사용에 의존하고 있다. 일반적으로, 패키지화 세포주는 전달 플라스미드, 패키지화 플라스미드(들) 및 외피 플라스미드가 세포에 도입되었을 때 세포가 감염성 레트로바이러스 입자를 생성시킬 수 있는 세포주이다. 형질감염 또는 전기천공을 포함하여, 세포에 플라스미드를 도입하는 다양한 방법들이 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 패키지화 세포주는 레트로바이러스 입자로의 레트로바이러스 벡터 시스템의 고-효율 패키지화용으로 적합화된다.

[0139] 본원에서 사용될 때, "레트로바이러스 벡터" 또는 "렌티바이러스 벡터"라는 용어는 게놈 패키지화에 필요한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 시스(cis) 핵산 서열 및 표적 세포로 전달될 1종 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩하는 핵산을 의미하고자 하는 것이다. 레트로바이러스 입자 및 렌티바이러스 입자는 일반적으로 RNA 게놈 (전달 플라스미드로부터 유래), Env 단백질이 매립되는 지질-이중층 외피, 및 인테그라제, 프로테아제 및 기질 단백질을 포함한 기타 보조 단백질들을 포함한다. 본원에서 사용될 때, "레트로바이러스 입자" 및 "렌티바이러스 입자"라는 용어는 외피를 포함하며, 렌티바이러스의 1종 이상의 특징을 가지고, 표적 숙주 세포에 침입할 수 있는 바이러스 입자를 지칭한다. 그와 같은 특징에는 예를 들면 비-분할 숙주 세포를 감염시키는 것, 비-분할 숙주 세포에 형질도입되는 것, 숙주 면역 세포를 감염시키거나 거기에 형질도입되는 것, gag 구조 폴리펩티드, 예컨대 p7, p24 및 p17 중 1종 이상을 포함하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 비리온을 포함하는 것, env 코딩 글리코단백질, 예컨대 p41, p120 및 p160 중 1종 이상을 포함하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 외피를 포함하는 것, 복제, 전구바이러스 통합 또는 전사에서 기능하는 1종 이상의 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 시스-작용 서열을 포함한 게놈을 포함하는 것, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 프로테아제, 리버스 트랜스크립타제 또는 인테그라제를 코딩하는 게놈을 포함하는 것, 또는 Tat 또는 Rev와 같은 조절 활성을 코딩하는 게놈을 포함하는 것이 포함된다. U.S. 특허 제8,093,042호에 기술되어 있는 바와 같이, 전달 플라스미드는 cPPT 서열을 포함할 수 있다.

[0140] 시스템의 효율은 벡터 공학에서 중요한 관심사이다. 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 시스템의 효율은 정량 폴리머라제 연쇄 반응 (qPCR)과 같은 벡터 복제본 수 (VCN) 또는 벡터 게놈 (vg)의 측정, 또는 밀리리터당 감염 단위 (IU/mL)로 나타낸 바이러스의 역가를 포함하여, 관련 기술분야에 알려져 있는 다양한 방식으로 평가될 수 있다. 예를 들면, 역가는 문헌 [Humbert et al. Development of Third-generation Cocal Envelope Producer Cell Lines for Robust Retroviral Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells and T-cells. *Molecular Therapy* 24:1237-1246 (2016)]에 기술되어 있는 바와 같이 배양된 종양 세포주 HT1080에서 수행되는 기능성 검정을 사용하여 평가될 수 있다. 계속해서 분할되는 배양 세포주에서 역가가 평가되는 경우, 자극은 필요하지 않으며, 그에 따라 측정되는 역가가 레트로바이러스 입자의 표면 공학에 의해 영향을 받지 않는다. 레트로바이러스 벡터 시스템의 효율을 평가하기 위한 다른 방법들은 문헌 [Gaererts et al. Comparison of retroviral vector titration methods. *BMC Biotechnol.* 6:34 (2006)]에 제공되어 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 레트로바이러스 입자 및/또는 렌티바이러스 입자는 리간드에 특이적으로 결합하는 수용체를 코딩하는 적어도 1종의 서열을 포함하는 벡터 시스템을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리간드에 특이적으로 결합하는 수용체를 코딩하는 적어도 1종의 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터에는 비제한적으로 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, CAG 프로모터, SV40 프로모터, SV40/CD43 프로모터 및 MND 프로모터가 포함된다.

[0142] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 형질도입 증강인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 T 세포 활성화인자 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 각각 키메라 항원 수용체를 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 1종의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 태그화 단백질을 포함한다.

[0143] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 입자는 표적 숙주 세포상 리간드에 결합함으로써 숙주 세포 형질도입을 가능하게 하는 세포 표면 수용체를 포함한다. 바이러스 벡터는 의사형화된(pseudotyped) 바이러스 벡터를 산출하는 이종유래 바이러스 외피 글리코단백질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 바이러스 외피 글리코단백질은 RD114 또는 그의 변이체들 중 1종, VSV-G, 기번-유인원(Gibbon-ape) 백혈병 바이러스 (GALV)로부터 유래하거나, 또는 양향성(Amphotropic) 외피, 홍역 외피 또는 비비 레트로바이러스 외피 글리코단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 세포-표면 수용체는 코쿠스 균주 유래의 VSV G 단백질 또는 그의 기능성 변이체이다.

[0144] 다양한 융합 글리코단백질들이 렌티바이러스 벡터를 의사형화하는 데에 사용될 수 있다. 가장 일반적으로 사용

되는 예가 소포성 구내염 바이러스 (VSVG) 유래의 외피 글리코단백질이기는 하지만, 많은 다른 바이러스 단백질들이 렌티바이러스 벡터를 의사형화하는 데에 사용되고 있다. 문헌 [Joglekar et al. *Human Gene Therapy Methods* 28:291-301 (2017)]을 참조한다. 본 개시내용은 다양한 융합 글리코단백질들의 치환을 고려한다. 분명히, 일부 융합 글리코단백질은 더 높은 벡터 효율을 초래한다.

[0145] 일부 실시양태에서, 융합 글리코단백질 또는 그의 기능성 변이체를 의사형화하는 것은 비제한적으로 T 세포 또는 NK-세포를 포함한 특정 세포 유형의 표적화된 형질도입을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 상기 융합 글리코단백질 또는 그의 기능성 변이체는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) gp160, 뮤린 백혈병 바이러스 (MLV) gp70, 기번 유인원 백혈병 바이러스 (GALV) gp70, 고양이 백혈병 바이러스 (RD114) gp70, 양향성 레트로바이러스 (Ampho) gp70, 10A1 MLV (10A1) gp70, 동종향성 레트로바이러스 (Eco) gp70, 비비 유인원 백혈병 바이러스 (BaEV) gp70, 홍역 바이러스 (MV) H 및 F, 니파 바이러스 (NiV) H 및 F, 광견병 바이러스 (RabV) G, 모콜라 바이러스 (MOKV) G, 에볼라 자이레 바이러스 (EboZ) G, 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV) GP1 및 GP2, 바큘로바이러스 GP64, 치쿵군야 바이러스 (CHIKV) E1 및 E2, 로스 리버 바이러스 (RRV) E1 및 E2, 셈리키 포레스트 바이러스 (SFV) E1 및 E2, 신드비스 바이러스 (SV) E1 및 E2, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스 (VEEV) E1 및 E2, 서부 말 뇌염 바이러스 (WEEV) E1 및 E2, 인플루엔자 A, B, C 또는 D HA, 가금류 플라그 바이러스 (FPV) HA, 소포성 구내염 바이러스 VSV-G 또는 찬디푸라 바이러스 및 파이리 바이러스 CNV-G 및 PRV-G의 전체-길이 폴리펩티드(들), 기능성 단편(들), 상동체(들) 또는 기능성 변이체(들)이다.

[0146] 일부 실시양태에서, 융합 글리코단백질 또는 그의 기능성 변이체는 소포성 구내염 알라고아스 바이러스 (VSAV), 카라야스 베지큘로바이러스 (CJSV), 찬디푸라 베지큘로바이러스 (CHPV), 코쿠스 베지큘로바이러스 (COCV), 소포성 구내염 인디애나 바이러스 (VSIV), 이스파한 베지큘로바이러스 (ISFV), 마라바 베지큘로바이러스 (MARAV), 소포성 구내염 뉴저지 바이러스 (VSNJV), 바스-콩고 바이러스 (BASV)의 G 단백질의 전체-길이 폴리펩티드, 기능성 단편, 상동체 또는 기능성 변이체이다. 일부 실시양태에서, 상기 융합 글리코단백질 또는 그의 기능성 변이체는 코쿠스 바이러스 G 단백질이다.

[0147] 일부 실시양태에서, 융합 글리코단백질 또는 그의 기능성 변이체는 소포성 구내염 알라고아스 바이러스 (VSAV), 카라야스 베지큘로바이러스 (CJSV), 찬디푸라 베지큘로바이러스 (CHPV), 코쿠스 베지큘로바이러스 (COCV), 소포성 구내염 인디애나 바이러스 (VSIV), 이스파한 베지큘로바이러스 (ISFV), 마라바 베지큘로바이러스 (MARAV), 소포성 구내염 뉴저지 바이러스 (VSNJV), 바스-콩고 바이러스 (BASV)의 G 단백질의 전체-길이 폴리펩티드, 기능성 단편, 상동체 또는 기능성 변이체이다. 일부 실시양태에서, 상기 융합 글리코단백질 또는 그의 기능성 변이체는 코쿠스 바이러스 G 단백질이다.

[0148] 본 개시내용은 또한 비제한적으로 감마-레트로바이러스 벡터, 알파-레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 포함한 다양한 레트로바이러스 벡터들을 제공한다.

[0149] **형질도입 증강인자**

[0150] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 바이러스 입자는 형질도입 증강인자를 포함한다.

[0151] 본원에서 사용될 때의 "형질도입 증강인자"는 T 세포를 활성화하는 막횡단 단백질을 지칭한다. 형질도입 증강인자는 본 개시내용에 따른 바이러스 입자의 바이러스 외피에 통합될 수 있다. 형질도입 증강인자는 분열원성 및/또는 시토카인-기반 도메인을 포함할 수 있다. 형질도입 증강인자는 T 세포 활성화 수용체, NK 세포 활성화 수용체, 공동-자극 분자 또는 이들의 일부를 포함할 수 있다.

[0152] *분열원성 형질도입 증강인자*

[0153] 본 발명의 바이러스 벡터는 바이러스 외피에 분열원성 형질도입 증강인자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 분열원성 형질도입 증강인자는 레트로바이러스 벡터 생성 동안 숙주 세포로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 분열원성 형질도입 증강인자는 패키지화 세포에 의해 생성되어, 세포 표면에서 발현된다. 신생 레트로바이러스 벡터가 숙주 세포 멤브레인으로부터 출아될 때, 패키지화 세포-유래 지질 이중층의 일부로서 분열원성 형질도입 증강인자가 바이러스 외피에 통합될 수 있다.

[0154] 일부 실시양태에서, 형질도입 증강인자는 숙주-세포 유래이다. "숙주-세포 유래"라는 용어는 분열원성 형질도입 증강인자가 상기한 바와 같은 숙주 세포로부터 유래하며, 주 구조 단백질들을 코딩하는 gag; 또는 외피 단백질을 코딩하는 env와 같은 바이러스 유전자들 중 1종으로부터 융합체 또는 키메라로서 생성되는 것이 아니라는 것을 표시한다.

[0155] 외피 단백질들은 단백질을 지질 멤브레인에 고정하는 막횡단 (TM) 및 세포 수용체에 결합하는 표면 (SU)의 2종의 서브유닛에 의해 형성된다. 일부 실시양태에서는, 본 발명의 패키지화-세포 유래 분열원성 형질도입 증강인자가 표면 외피 서브유닛 (SU)을 포함하지 않는다.

[0156] 분열원성 형질도입 증강인자는 하기의 구조를 가질 수 있다: M이 분열원성 도메인이며; S가 임의적인 스페이서 도메인이고, TM이 막횡단 도메인인 M-S-TM.

[0157] *형질도입 증강인자 분열원성 도메인*

[0158] 분열원성 도메인은 T-세포 활성화를 야기하는 분열원성 형질도입 증강인자의 일부이다. 그것은 T 세포에 결합하거나 또는 그와 달리 직접 또는 간접적으로 상호작용하여 T 세포 활성화를 야기할 수 있다. 특히, 분열원성 도메인은 CD3, CD28, CD134 및 CD137과 같은 T 세포 표면 항원에 결합할 수 있다.

[0159] CD3은 T-세포 공동-수용체이다. 그것은 4개의 구별되는 사슬로 구성되는 단백질 복합체이다. 포유동물에서, 상기 복합체는 CD3γ 사슬, CD35 사슬 및 2개의 CD3ε 사슬을 포함한다. 이들 사슬은 T-세포 수용체 (TCR) 및 ζ-사슬과 결합하여, T 림프구에서 활성화 신호를 생성시킨다. TCR, ζ-사슬 및 CD3 분자는 함께 TCR 복합체를 구성한다.

[0160] 일부 실시양태에서, 분열원성 도메인은 CD3ε 사슬에 결합할 수 있다.

[0161] CD28은 T 세포상에서 발현되는 단백질들 중 1종으로서, T 세포 활성화 및 생존에 필요한 공동-자극 신호를 제공한다. T-세포 수용체 (TCR)에 더한 CD28을 통한 T 세포 자극은 다양한 인터류킨 (특히 IL-6)의 생성을 위한 단백질 신호를 제공할 수 있다. OX40으로도 알려져 있는 CD134는 TNFR-아과 수용체의 구성원으로서, CD28과 달리 휴지 미접촉 T 세포상에서 상시적으로 발현되지는 않는다. OX40은 활성화 24 내지 72시간 후에 발현되는 2차 공동자극 분자로서; 그의 리간드인 OX40L 역시 휴지 항원 제시 세포상에서는 발현되지 않지만, 그의 활성화 후에는 발현된다. OX40의 발현은 T 세포의 완전 활성화에 의존하는데; CD28이 없을 경우, OX40의 발현은 지연되며, 4배 더 낮은 수준을 가진다.

[0162] 4-1BB로도 알려져 있는 CD137은 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 과의 구성원이다. CD137은 활성화된 T 세포에 의해 발현될 수 있으나, CD4 T 세포에서보다는 CD8상에서 더 큰 정도로 발현된다. 또한, CD137 발현은 수지상 세포, 모낭 수지상 세포, 자연 살해 세포, 과립구 및 염증 부위 혈관 벽 세포에서 발견된다. CD137의 최고 특징적 활성은 활성화된 T 세포에 대한 그의 공동자극 활성이다. CD137의 가교결합은 T 세포 증식, IL-2 분비 생존 및 세포용해 활성을 증강한다.

[0163] 분열원성 도메인은 T-세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 다른 분자의 전체 또는 일부를 포함할 수 있다. 상기 항체는 TCR 또는 CD28을 활성화할 수 있다. 상기 항체는 TCR, CD3 또는 CD28에 결합할 수 있다. 그와 같은 항체의 예에는 하기가 포함된다: OKT3, 15E8 및 TGN1412. 기타 적합한 항체에는 하기가 포함된다:

[0164] 항-CD28: CD28.2, 10F3

[0165] 항-CD3/TCR: UCHT1, YTH12.5, TR66.

[0166] 분열원성 도메인은 OKT3, 15E8, TGN1412, CD28.2, 10F3, UCHT1, YTH12.5 또는 TR66 유래의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0167] 분열원성 도메인은 OX40L 및 41 BBL과 같은 공동-자극 분자의 전체 또는 일부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 분열원성 도메인은 OX40L 또는 41 BBL 유래의 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0168] *형질도입 증강인자 스페이서 도메인*

[0169] 분열원성 형질도입 증강인자 및/또는 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 항원-결합 도메인을 막횡단 도메인과 연결하는 스페이서 서열을 포함할 수 있다. 유연성인 스페이서는 항원-결합 도메인이 서로 다른 방향으로 배향되어 결합을 촉진하는 것을 가능하게 한다.

[0170] 상기 스페이서 서열은 예를 들면 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 인간 CD8 줄기(stalk) 또는 마우스 CD8 줄기를 포함할 수 있다. 스페이서는 대안적으로는 IgG1 Fc 영역, IgG1 힌지 또는 CD8 줄기와 유사한 길이 및/또는 도메인 이격 특성을 가지는 대안적인 링커 서열을 포함할 수 있다. 인간 IgG1 스페이서는 Fc 결합 모티프가 제거되도록 변경될 수 있다.

[0171] *형질도입 증강인자 막횡단 도메인*

[0172] 막횡단 도메인은 멤브레인 전체에 걸치는 분열원성 형질도입 증강인자 및/또는 시토카인-기반 형질도입 증강인자의 서열이다. 막횡단 도메인은 소수성 알파 나선을 포함할 수 있다. 막횡단 도메인은 CD28로부터 유래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 인간 단백질로부터 유래한다.

[0173] 막횡단 도메인의 대안적인 선택사항은 GPI 앵커(anchor)와 같은 멤브레인-표적화 도메인이다. GPI 고정은 내형질 세망에서 이루어지는 번역-후 변형이다. 예비조립된 GPI 앵커 전구체가 C-말단 GPI 신호 서열을 보유하는 단백질로 전달된다. 프로세싱 동안, GPI 앵커가 GPI 신호 서열을 대체하고, 아미드 결합을 통하여 표적 단백질에 연결된다. GPI 앵커는 성숙한 단백질을 멤브레인에 대하여 표적화한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 태그화 단백질은 GPI 신호 서열을 포함한다.

[0174] *시토카인-기반 형질도입 증강인자*

[0175] 본 발명의 바이러스 벡터는 바이러스 외피에 시토카인-기반 형질도입 증강인자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 바이러스 벡터 생성 동안 숙주 세포로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 숙주 세포에 의해 생성되어, 세포 표면에서 발현된다. 신생 바이러스 벡터가 숙주 세포 멤브레인으로부터 출아될 때, 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 패키지화 세포-유래 지질 이중층의 일부로서 바이러스 외피에 통합될 수 있다.

[0176] 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 시토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함할 수 있다. 그것은 C가 시토카인 도메인이며, S가 임의적인 스페이서 도메인이고, TM이 막횡단 도메인인 C-S-TM 구조를 가질 수 있다. 상기 스페이서 도메인 및 막횡단 도메인은 상기에서 정의된 바와 같다.

[0177] *형질도입 증강인자 시토카인 도메인*

[0178] 시토카인 도메인은 IL2, IL7 및 IL15와 같은 T-세포 활성화 시토카인의 일부 또는 전체를 포함할 수 있다. 시토카인 도메인은 그것이 그의 구체적인 수용체에 결합하고 T-세포를 활성화하는 능력을 유지하는 한, 시토카인의 일부를 포함할 수 있다.

[0179] IL2는 T 세포에 의해 분비되어 T 세포 및 특정 B 세포의 성장 및 분화를 조절하는 인자들 중 1종이다. IL2는 반응성 T 세포의 증식을 유도하는 림포카인이다. 그것은 단일 글리코실화 폴리펩티드로 분비되며, 그의 활성에 신호 서열의 절단을 필요로 한다. 용액 NMR은 IL2의 구조가 2개의 더 짧은 나선 및 몇 개의 저조하게 한정되는 루프가 측접하는 4개 나선 (A-D로 지칭)의 다발을 포함함을 시사하고 있다. 나선 A의 잔기들, 그리고 나선 A와 B 사이의 루프 영역이 수용체 결합에 중요하다. IL2의 서열은 서열식별번호: 18로 알려져 있다.

[0180] MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLI SNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 18)

[0181] IL7은 B- 및 T-세포 계통 둘 다의 초기 림프계 세포에 대하여 성장 인자로 기능하는 시토카인이다. IL7의 서열은 서열식별번호: 19로 알려져 있다.

[0182] MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLL DSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFD LHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDL CFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKEH (SEQ ID NO: 19)

[0183] IL15는 IL2와 구조적 유사성을 가지는 시토카인이다. IL2와 마찬가지로, IL15는 IL2/IL15 수용체 베타 사슬 및 공통 감마 사슬로 구성되는 복합체에 결합하여, 그것을 통해 신호를 전달한다. IL15는 바이러스(들)에 의한 감염 후 단핵 포식세포 및 일부 다른 세포에 의해 분비된다. 이와 같은 시토카인은 그의 주된 역할이 바이러스 감염 세포를 사멸시키는 것인 선천 면역 시스템 세포인 자연 살해 세포의 세포 증식을 유도한다. IL15의 서열은 서열식별번호: 20으로 알려져 있다.

MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANW
VNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFI
NTS
(SEQ ID NO: 20)

[0184]

[0185] 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 하기 서열들 중 1종 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다:

[0186] 멤브레인-IL7:

MAHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMK
EIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLL
KVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLK
RLLQEIKTCWNKILMGTKEHSGGGSPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRV
CKCPRPVV
(SEQ ID NO: 21)

[0187]

[0188] 멤브레인-IL15:

MGLVRRGARAGPRMPRGWTALCLLSLLPSGFMAGIHVFILGCFSAGLPKTEA
NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLE
SGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTSSPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA
CDIYIWAPLAGTCGVLLLS LVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV (SEQ ID NO:
22)

[0189]

[0190] 변이체 서열이 필요한 특성, 즉 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 외피 단백질에 존재하는 경우 T 세포를 활성화하는 능력을 가지는 시토카인-기반 형질도입 증강인자라는 전제하에, 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 적어도 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 %의 서열 동일성을 가지는 서열식별번호: 21 또는 22로 나타낸 서열의 변이체를 포함할 수 있다.

[0191] *형질도입 증강인자의 예시적인 장점*

[0192] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 붙박이 형질도입 증강인자를 가지는 바이러스 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 T-세포를 자극하고 또한 유전자 삽입을 수행하는 둘 다의 능력을 가질 수 있다. 이는 하기를 포함한 1종 이상의 장점을 산출할 수 있다: (1) 1종의 구성요소만이 첨가될 것을 필요로 하기 때문에, T-세포 조작의 과정을 단순화함; (2) 바이러스가 불안정해서 제거될 필요가 없기 때문에, 비드의 제거 및 연관 수율 감소를 회피함; (3) 1종의 구성요소만이 제조될 것을 필요로 하기 때문에, T-세포 조작의 비용을 감소시킴; (4) 각 T-세포 조작 과정이 1종의 유전자 전달 벡터를 제조하는 것을 포함하며 동일한 생성물이 생성물에 "맞도록" 형질도입 증강인자에 의해서도 이루어질 수 있을 것이기 때문에, 더 큰 설계상의 유연성을 가능하게 함; (5) 제조 과정을 단축시킴: 가용성 항원/비드-기반 접근법에서는 통상적으로 분열원과 벡터가 1, 2 또는 때로는 3일까지 분리되어 순차적으로 제공되는데, 형질도입 증강 및 바이러스 진입이 동기화된 및 동시적인 것이기 때문에, 본 발명의 레트로바이러스 벡터에 의하면 그것이 회피될 수 있음; (6) 발현 및 기능성에 대하여 많은 서로 다른 융합 단백질들을 시험할 필요가 없기 때문에, 조작을 단순화함; (7) 1종을 초과하는 신호를 동시에 부가할 가능성을 가능하게 함; 및 (8) 별도의 각 신호/단백질 발현 및/또는 발현 수준 조절을 가능하게 함.

[0193] *형질도입 증강인자를 포함하는 바이러스 벡터의 예시적인 실시양태*

[0194] 일부 실시양태에서, 바이러스 외피는 1종 이상의 형질도입 증강인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 형질도입 증강인자는 T 세포 활성화 수용체, NK 세포 활성화 수용체 및/또는 공동-자극 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 형질도입 증강인자는 항-CD3scFv, CD86 및 CD137L 중 1종 이상을 포함한다. 일부 실

시양태에서, 형질도입 증강인자는 항-CD3 scFv, CD86 및 CD137L 모두를 포함한다.

[0195] 일부 실시양태에서, 형질도입 증강인자는 바이러스가 T 세포를 활성화하고 거기에 형질도입되는 것 모두를 하도록 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 캡시드에 통합되어 있는 분열원성 자극물 및/또는 시토카인 자극물을 포함한다. 이는 벡터, 분열원 및 시토카인을 별도로 첨가할 필요성을 제거한다. 일부 실시양태에서, 형질도입 증강인자는 생산자 또는 패키지화 세포에 포함되며 생산자/패키지화 세포 멤브레인으로부터 그것이 출아될 때 레트로바이러스에 통합되는 분열원성 막횡단 단백질 및/또는 시토카인-기반 막횡단 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질도입 증강인자는 바이러스 외피 글리코단백질의 일부이기보다는 생산자 세포상의 별도 세포 표면 분자로서 발현된다.

[0196] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 바이러스 외피를 가지는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 제공한다:

[0197] (i) 분열원성 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 분열원성 형질도입 증강인자; 및/또는

[0198] (ii) 시토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 시토카인-기반 형질도입 증강인자.

[0199] 일부 실시양태에서, 형질도입 증강인자는 바이러스 외피 글리코단백질의 일부가 아니다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터는 env 유전자에 의해 코딩되는 별도의 바이러스 외피 글리코단백질을 포함한다. 바이러스 외피 글리코단백질과 별도인 분자상에 분열원성 자극물 및/또는 시토카인 자극물이 제공되기 때문에, 바이러스 외피 글리코단백질의 완전성은 유지되며, 바이러스 역가에 대한 부정적인 영향은 존재하지 않는다.

[0200] 일부 실시양태에서는, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 가지는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0201] (i) 바이러스 외피 글리코단백질; 및

[0202] (ii) M이 분열원성 도메인이며; S가 임의적인 스페이서이고, TM이 막횡단 도메인인 인 M-S-TM의 구조를 가지는 분열원성 형질도입 증강인자; 및/또는

[0203] (iii) 시토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 시토카인-기반 형질도입 증강인자.

[0204] 일부 실시양태에서, 분열원성 형질도입 증강인자 및/또는 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 바이러스 외피 글리코단백질의 일부가 아니다. 일부 실시양태에서, 그것은 바이러스 외피에 별도의 단백질로 존재하며, 별도의 유전자에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 분열원성 형질도입 증강인자는 하기의 구조를 가진다: M이 분열원성 도메인이며; S가 임의적인 스페이서이고, TM이 막횡단 도메인인 M-S-TM.

[0205] 일부 실시양태에서, 분열원성 형질도입 증강인자는 활성화 T-세포 표면 항원에 결합한다. 일부 실시양태에서, 상기 항원은 CD3, CD28, CD134 또는 CD137이다. 분열원성 형질도입 증강인자는 그와 같은 활성화 T-세포 표면 항원의 작용제를 포함할 수도 있다.

[0206] 분열원성 형질도입 증강인자는 OKT3, 15E8, TGN1412와 같은 항체로부터의 결합 도메인; 또는 OX40L 또는 41 BBL과 같은 공동자극 분자를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 2종 이상의 분열원성 형질도입 증강인자를 바이러스 외피에 포함할 수 있다. 예를 들면, 바이러스 벡터는 CD3에 결합하는 제1 분열원성 형질도입 증강인자 및 CD28에 결합하는 제2 분열원성 형질도입 증강인자를 포함할 수 있다. 시토카인-기반 형질도입 증강인자는 예를 들면 IL2, IL7 및 IL15에서 선택되는 시토카인을 포함할 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서는, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 가지는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0208] (a) CD3에 결합하는 제1 분열원성 형질도입 증강인자; 및

[0209] (b) CD28에 결합하는 제2 분열원성 형질도입 증강인자.

[0210] 일부 실시양태에서는, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 가지는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0211] (a) CD3에 결합하는 제1 분열원성 형질도입 증강인자;

[0212] (b) CD28에 결합하는 제2 분열원성 형질도입 증강인자; 및

[0213] (c) IL2를 포함하는 시토카인-기반 형질도입 증강인자.

[0214] 일부 실시양태에서는, 하기를 포함하는 바이러스 외피를 가지는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 제공된다:

[0215] (a) CD3에 결합하는 제1 분열원성 형질도입 증강인자;

[0216] (b) CD28에 결합하는 제2 분열원성 형질도입 증강인자;

[0217] (c) IL7을 포함하는 시토카인-기반 형질도입 증강인자; 및

[0218] (d) IL15를 포함하는 시토카인-기반 형질도입 증강인자.

[0219] **T 세포 활성화인자 단백질**

[0220] 본 개시내용은 또한 T 세포 활성화인자 단백질 또는 T 세포 활성화인자 단백질 복합체를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 제공한다. 본원에서 언급될 때, "T 세포 활성화인자 단백질" 및 "T 세포 활성화인자 단백질 복합체"라는 용어는 호환가능하게 사용될 수 있으며, 단일 단백질 또는 별도 단백질들의 복합체를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 T 세포 활성화인자 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 T 세포에 형질도입시킴으로써, T 세포가 상기 단백질을 발현하도록 한다. T 세포 활성화인자 단백질은 이후 형질도입된 T 세포를 활성화하는 데에 참여할 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포 활성화인자 단백질은 약물 유도성 T 세포 활성화인자 단백질이다. 일부 실시양태에서, T 세포 활성화인자 단백질은 화학-유도 신호전달 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, T 세포 활성화인자 단백질은 리간드-유도 이량체화의 직접적인 결과로서 세포 내부에의 신호를 개시하는 조작된 복합체를 형성한다. T 세포 활성화인자 단백질은 동종이량체 (2개 동일 구성요소의 이량체화) 또는 이종이량체 (2종의 구별되는 구성요소의 이량체화) 중에 포함될 수 있다. T 세포 활성화인자 단백질 복합체는 본원에서 기술되는 바와 같은 합성 복합체일 수 있다. 관련 기술분야 통상의 기술자라면, T 세포 활성화인자 단백질 복합체의 구성요소 부분이 복합체의 통합에 유용한 천연 또는 합성 구성요소로 구성될 수 있다는 것을 알고 있을 것이다. 이에 따라, 본원에서 제공되는 예들은 제한하고자 하는 것이 아니다. 본원에서 실시될 수 있는 추가적인 T 세포 활성화인자 단백질들은 그의 개시내용이 전체적으로 본원에 개재되는 WO 2016/139463호 및 WO 2018/111834호에서 찾아볼 수 있다.

[0221] 일부 실시양태에서, T 세포 활성화인자 단백질 서열은 제1 및 제2 서열을 가질 수 있다. 제1 서열은 제1 세포외 결합 도메인 또는 그의 일부, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및 신호전달 도메인 또는 그의 일부를 포함할 수 있는 제1 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소를 코딩할 수 있다. 제2 서열은 제2 세포외 결합 도메인 또는 그의 일부, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및 신호전달 도메인 또는 그의 일부를 포함할 수 있는 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 및 제2 구성요소는 발현될 때 리간드의 존재하에서 그것이 이량체화되도록 배치될 수 있다.

[0222] 본원에서 사용될 때, "라파마이신 활성화 시토카인 수용체" 또는 "RACR"라는 용어는 라파마이신의 존재하에서 세포의 증식 및/또는 활성을 촉진하는 세포내 신호를 유도성으로 생성시키는 다중부분 수용체를 호환가능하게 지칭한다. RACR은 T 세포에서 라파마이신의 존재하에 IL-2R 세포내 도메인(들) 또는 그의 변이체를 통하여 IL2-유사 신호를 전달할 수 있다.

[0223] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 이종이량체성 2종의 구성요소 T 세포 활성화인자 단백질 복합체의 단백질 서열 또는 서열들을 제공한다. 일부 실시양태에서, 제1 구성요소는 IL2Rɣ 복합체이다. 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rɣ 복합체는 서열식별번호: 4에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

[0224] MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT
GMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP
DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS
MGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
PDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET (SEQ ID NO: 4)

[0225] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 복합체는 서열식별번호: 23에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT
GMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP
DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS
MGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
PDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET (SEQ ID NO: 23)

[0226]

[0227] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 복합체는 서열식별번호: 24에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT
GMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP
DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS
MGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
PDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET (SEQ ID NO: 24)

[0228]

[0229] 일부 실시양태에서, IL2Rɣ 복합체는 서열식별번호: 25에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT
GMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP
DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS
MGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
PDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET (SEQ ID NO: 25)

[0230]

[0231] 일부 실시양태에서, 제1 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0232] 일부 실시양태에서, 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소는 IL2Rβ 복합체이다. 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rβ 복합체는 서열식별번호: 5에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV (SEQ ID NO: 5)

[0233]

[0234] 일부 실시양태에서, IL2Rβ 복합체는 서열식별번호: 26에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV
(SEQ ID NO: 26)

[0235]

[0236] 일부 실시양태에서, IL2Rβ 복합체는 서열식별번호: 27에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV
(SEQ ID NO: 27)

[0237]

[0238] 일부 실시양태에서, IL2Rβ 복합체는 서열식별번호: 28에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV
(SEQ ID NO: 28)

[0239]

[0240] 일부 실시양태에서, 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소는 IL7Rα 복합체이다. 일부 실시양태에서, 상기 IL7Rα 복합체는 서열식별번호: 29에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV
(SEQ ID NO: 29)

[0241]

[0242] 일부 실시양태에서, 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0243] 일부 실시양태에서, 상기 단백질 서열은 링커(linker)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산, 예컨대 글리신, 또는 상기 언급된 숫자들 중 임의의 2종에 의해 한정되는 범위 내 수의 아미노산, 예컨대 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 글리신 스페이서는 적어도 3개의 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리신 스페이서는 서열식별번호: 30: GGGS (서열식별번호: 30), 서열식별번호: 31: GGGSGGG (서열식별번호: 31) 또는 서열식별번호: 32: GGG (서열식별번호: 32)에 제시되어 있는 서열을 포함한다. 실시양태는 서열식별번호: 30-32를 코딩하는 핵산 서열도 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 신호전달 도메인의 N-말단에 위치되며, 힌지 도메인은 막횡단 도메인의 N-말단에 위치되고, 링커는 힌지 도메인의 N-말단에 위치되며, 세포외 결합 도메인은 링커의 N-말단에 위치된다.

[0244] 일부 실시양태에서는, 동종이량체성 2종의 구성요소 T 세포 활성화인자 단백질 복합체의 단백질 서열 또는 서열들이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소는 IL2Rɣ 복합체이다. 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rɣ 복합체는 서열식별번호: 4에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYT
GMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP
DYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLGEGSNTSKENPFLFALEAVVISVGS
MGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQ
PDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET; SEQ ID
NO: 4

[0245]

[0246] 일부 실시양태에서, 상기 제1 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열도 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제1 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 단백질 서열은 서열식별번호: 4에 제시되어 있는 서열에 대하여 100 %, 99 %, 98 %, 95 %, 90 %, 85 % 또는 80 %의 서열 동일성을 포함하거나 또는 상기 언급된 백분율 중 임의의 2종에 의해 한정되는 범위 이내인 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다.

[0247] 일부 실시양태에서, 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소는 IL2Rβ 복합체 또는 IL2Rα 복합체이다. 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rβ 복합체는 서열식별번호: 5에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV
(SEQ ID NO: 5)

[0248]

[0249] 일부 실시양태에서, 상기 IL2Rα 복합체는 서열식별번호: 33에 제시되어 있는 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다.

MALPVTALLLPLALLLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKG
MFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVK
DLLQAWDLYYHVFRRISKGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTG
PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPL
EVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC
QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFS
PSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVD
FQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYL
SLQELQGQDPTHLV (SEQ ID NO: 33)

[0250]

[0251] 일부 실시양태에서, 상기 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열도 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제2 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소의 단백질 서열은 서열식별번호: 5 또는 서열식별번호: 33에 제시되어 있는 서열에 대하여 100 %, 99 %, 98 %, 95 %, 90 %, 85 % 또는 80 %의 서열 동일성을 포함하거나 또는 상기 언급된 백분율 중 임의의 2종에 의해 한정되는 범위 이내인 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다.

[0252] 일부 실시양태에서, 동종이량체화 2종의 구성요소 T 세포 활성화인자 단백질 복합체의 서열은 리간드 AP1903과의 동종이량체화를 위한 FKBP F36V 도메인을 포함한다.

[0253] 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1종의 T-세포 활성화인자 단백질은 제1 이량체화 도메인을 포함하는 제1 수용체 단백질 및 제2 이량체화 도메인을 포함하는 제2 수용체 단백질을 포함하며, 상기 제1 이량체화 도메인과 상기 제2 이량체화 도메인은 소정 분자에 반응하여 서로 특이적으로 결합한다. 대안적으로는 "리간드" 또는 "작용제"라는 용어로 지칭되는 T 세포 활성화인자 단백질에 의해 결합되는 상기 분자는 원하는 생물학적 효과를 가지는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 세포외 결합 도메인에 의해 인식되고 그것이 결합됨으로써, 리간드 및 2종의 결합 T 세포 활성화인자 단백질 복합체 구성요소를 포함하는 3부분(tripartite) 복합체를 형성한다. 리간드에는 비제한적으로 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 번역-후 변형된 단백질, 항체 등을 포함한 단백질성 분자; 소형 분자 (1000 달톤 미만), 무기 또는 유기 화합물; 및 비제한적으로 이중-가닥 또는 단일-가닥 DNA, 또는 이중-가닥 또는 단일-가닥 RNA (예컨대 안티센스, RNAi 등), 압타머는 물론, 삼중 나선 핵산 분자를 포함한 핵산 분자가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 리간드는 임의의 알려져 있는 생물체 (비제한적으로 동물 (예컨대 포유동물 (인간 및 비-인간 포유동물)), 식물, 세균, 진균 및 원생생물, 또는 바이러스 포함), 또는 합성 분자 라이브러리로부터 유래하거나 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리간드는 단백질, 항체, 소형 분자 또는 약물이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (라팔로그)이다. 일부 실시양태에서, 상기 라팔로그는 하기 라파마이신 대비 변형들 중 1종 이상을 가지는 라파마이신의 변이체를 포함한다: C7, C42 및/또는 C29에서의 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 대체; C13, C43 및/또는 C28

에서의 히드록시의 제거, 유도체화 또는 대체; C14, C24 및/또는 C30에서의 케톤의 환원, 제거 또는 유도체화; 5-원 프롤릴 고리에 의한 6-원 피페콜레이트 고리의 대체; 및 시클로헥실 고리상에서의 대안적인 치환 또는 치환된 시클로펜틸 고리에 의한 시클로헥실 고리의 대체. 이에 따라, 일부 실시양태에서, 라팔로그는 에베롤리무스, 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 조타롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16- (S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 소듐 마이코페르놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, 라파민, AP23573, 또는 AP1903, 또는 이들의 대사물, 유도체 및/또는 조합이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 IMID-클래스 약물 (예컨대 탈리도미드, 포말리디미드, 레날리도미드 또는 관련 유사체들)이다.

[0254] 일부 실시양태에서, 상기 분자는 FK1012, 타크롤리무스 (FK506), FKCsA, 라파마이신, 쿠메르마이신, 기베렐린, HaXS, TMP-HTag 및 ABT-737, 또는 이들의 기능성 유도체에서 선택된다.

[0255] **키메라 항원 수용체**

[0256] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "키메라 T 세포 수용체"라는 용어는 분자, 막횡단 도메인, 1종 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1종 이상의 공동-자극 도메인에 결합하는 항체 또는 기타 단백질 서열의 리간드 결합 도메인을 포함하는 합성으로 설계되는 수용체를 지칭한다. 리간드 결합 도메인은 스페이서 도메인을 통하여 T 세포 또는 다른 수용체의 1종 이상의 세포내 신호전달 도메인, 예컨대 공동자극 도메인에 연결된다. 키메라 수용체는 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 키메라 면역수용체 및 키메라 항원 수용체 (CAR)로도 지칭될 수 있다. 이러한 CAR은 면역 수용체 세포상에 임의적인 특이성을 이식할 수 있는 조작된 수용체이다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체용 스페이서는 원하는 CAR의 결합 특징을 달성하도록 (예컨대 특정 스페이서 중 아미노산의 길이용으로) 선택된다. 예를 들면 세포상에서 제시되는 가변적인 스페이서 길이를 가지는 CAR은 이후 CAR가 예정되는 분자에 결합하여 그와 상호작용하는 능력에 대하여 스크리닝된다.

[0257] 본원의 일부 실시양태에서, CAR은 1종 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-I (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이들의 일부로부터 유래한다.

[0258] 일부 실시양태에서, CAR은 1종 이상의 공동-자극 도메인을 포함한다. "공동-자극 도메인"은 예를 들면 TCR/CD3 복합체의 CD3 제타 사슬에 의해 제공되는 일차 신호에 더하여 비제한적으로 활성화, 증식, 분화, 시토카인 분비 등을 포함한 T 세포 반응을 매개하는 신호를 T 세포에 제공하는 신호전달 잔기를 지칭한다. 공동-자극 도메인에는 CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능-연관 항원-I (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 또는 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드의 전체 또는 일부가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 공동-자극 도메인은 다른 세포내 매개인자와 상호작용하여 활성화, 증식, 분화 및 시토카인 분비 등을 포함한 세포 반응을 매개하는 세포내 신호전달 도메인이다. 본원의 일부 실시양태에서, 공동-자극 도메인은 41bb 및 CD3제타를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 CD19에 대하여 특이적인 CAR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터 시스템은 CD20에 대하여 특이적인 CAR을 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 추가적으로 806 CAR (항-EGFR 806 - 41BB-CD3제타 CAR)를 포함한다.

[0259] 일부 실시양태에서, CAR은 이량체화 활성화된 수용체 개시 복합체 (DARIC)이다. DARIC은 각각 별도의 융합 단백질로 발현되나 세포 표면에서의 2종의 기능성 구성요소의 재결합을 위한 세포외 다량체화 메커니즘 (가교화 인자)을 포함하는 결합 구성요소 및 신호전달 구성요소를 제공한다 (그 전체가 의거 명시적으로 참조로 포함되는 U.S. 특허 출원 제2016/0311901호 참조). 중요한 것은 DARIC 시스템의 가교화 인자가 그 자체로는 유의성 있는 신호전달을 산출하지 않는 이종이량체성 수용체 복합체를 형성한다는 것이다. 기술되는 DARIC 복합체는 다른 DARIC 복합체에 의한 추가적인 공동-국소화 후에만 생리학적으로 관련된 신호를 개시한다. 따라서, 그것은 DARIC 복합체의 추가적인 다량체화 메카니즘 (예를 들면 DARIC 구성요소들 중 1종에 포함되는 결합 도메인에 의해 결합되는 리간드를 발현하는 종양 세포와의 접촉과 같은 것에 의함) 없이는 원하는 세포 유형의 선택적인 증식을 가능하게 하지 않는다.

[0260] 일부 실시양태에서, CAR의 항원-결합 부분은 항체의 항원-결합 부분 또는 항원-결합성 항체 유도체를 포함할 수 있다. 항체의 항원-결합 부분 또는 유도체는 Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, scFv, 디아바디, 선형 항체, 단일-사슬 항체, 미니바디 등일 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR의 항원-결합 부분은 DARPin 또는 센티린를 포함할 수 있다.

[0261] CAR은 질환 또는 장애와 연관되어 있는 분자에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR가 결합하거나 상호작

용하는 항원은 멤브레인, 비드 또는 지지체 (예컨대 웰)과 같은 기질 또는 결합제, 예컨대 지질 (예컨대 PLE), 합텐(hapten), 리간드 또는 항체, 또는 이들의 결합 단편상에 제시될 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 암 세포상에 제시되는 항원에 대하여 특이성을 가진다. 일부 실시양태에서, CAR은 바이러스 또는 세균과 같은 병원체에 대하여 특이성을 가진다. 한 가지 접근법에 의하면, 원하는 항원을 포함하는 기질이 상기 항원에 대하여 특이적인 CAR을 포함하는 다수의 세포와 접촉된 후, 기질 또는 결합제상에 제시된 항원에 대한 CAR을 포함하는 세포의 결합 농도 또는 양이 결정된다. 그와 같은 결합 평가는 어댑터 분자에 결합된 세포의 염색, 또는 형광 또는 형광 상실의 평가를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 가변적인 스페이서 길이와 같은 CAR 구조의 변형이 이와 같은 방식으로 평가될 수 있다. 일부 접근법에서는, 표적 세포도 제공됨으로써, 상기 방법은 표적 잔기 및 항원을 포함하는 어댑터 분자에 대하여 특이적인 CAR을 포함하는 T 세포와 같은 세포를 암 세포 또는 세균 세포와 같은 표적 세포 또는 표적 바이러스의 존재하에 접촉시키는 것, 그리고 어댑터 분자에 대한 CAR을 포함하는 세포의 결합을 평가하는 것 및/또는 표적 세포 또는 표적 바이러스에 대한 CAR을 포함하는 세포의 결합을 평가하는 것을 포함한다. CAR의 서로 다른 요소들의 변이는 예를 들면 특정 항원결정인자 또는 항원에 대한 더 강한 결합 친화성으로 이어질 수 있다.

[0262] 본원에서 기술되는 일부 실시양태에서, CAR은 종양 또는 암 세포를 표적으로 하는 지질 또는 펩티드에 대하여 특이적이며, 여기서 지질 또는 펩티드는 항원을 포함하고, CAR은 상기 항원과의 상호작용을 통하여 상기 지질에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 지질은 인지질 에테르이다. 본원에서 기술되는 일부 실시양태에서, CAR은 인지질 에테르에 대하여 특이적이며, 여기서 인지질 에테르는 항원을 포함하고, CAR은 상기 항원과의 상호작용을 통하여 상기 인지질 에테르에 특이적으로 결합한다.

[0263] 일부 실시양태에서, CAR은 항체 또는 그의 결합 단편에 고정된 항원에 대하여 특이적이며, 여기서 CAR은 상기 항원과의 상호작용을 통하여 상기 항체 또는 그의 결합 단편에 특이적으로 결합한다. 상기 항체 또는 그의 결합 단편에 접합될 수 있는 예시적인 항원에는 폴리(his) 태그, 스트렙-태그, FLAG-태그, VS-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, 바이오틴, 디곡시제닌, 디니트로페놀, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질, 오렌지색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 원적외선(far red) 형광 단백질 또는 플루오레세인 (예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC))이 포함된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 그의 결합 단편은 암 세포 또는 병원체 (예컨대 바이러스 또는 세균 병원체)상에 제시되는 항원 또는 리간드에 대하여 특이적이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 결합 단편은 종양 세포, 바이러스, 바람직하게는 만성 바이러스 (예컨대 간염 바이러스 예컨대 HBV 또는 HCV, 또는 HIV) 또는 세균 세포상에 제시되는 항원 또는 리간드에 대하여 특이적이다.

[0264] 일부 실시양태에서, CAR 핵산은 막횡단 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 막횡단 도메인은 멤브레인에서의 키메라 수용체의 고정을 제공한다.

[0265] 일부 실시양태에서는, 지질에 연결되는 CAR을 포함하며, 여기서 상기 지질은 항원을 포함하고, 상기 CAR은 상기 항원과의 상호작용을 통하여 상기 지질에 연결되는 복합체가 제공된다.

[0266] 일부 실시양태에서는, 항체 또는 그의 결합 단편에 연결되는 CAR을 포함하며, 여기서 상기 항체 또는 그의 결합 단편은 항원 (예컨대 폴리(his) 태그, 스트렙-태그, FLAG-태그, VS-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, 바이오틴, 디곡시제닌, 디니트로페놀, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질, 오렌지색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 원적외선(far red) 형광 단백질 또는 플루오레세인 (예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)))을 포함하고, 상기 CAR은 상기 항원과의 상호작용을 통하여 상기 항체 또는 그의 결합 단편에 연결되는 복합체가 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 그의 결합 단편은 또한 암 세포 또는 병원체 (예컨대 바이러스 또는 세균 병원체)상에 제시되는 항원 또는 리간드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 결합 단편은 종양 세포, 바이러스, 바람직하게는 만성 바이러스 (예컨대 간염 바이러스 예컨대 HBV 또는 HCV, 또는 HIV) 또는 세균 세포상에 제시되는 항원 또는 리간드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 상기 항원은 암 세포 또는 병원체 (예컨대 바이러스 또는 세균 세포)상의 항원에 대하여 특이적인 항체 또는 그의 결합 단편상에 제시되며, 세포 (예컨대 T 세포)의 표면상에 제시되는 CAR에 의해 상기 항원이 결합됨으로써, CAR을 가지는 세포가 암 세포 또는 병원체로 재유도되도록 한다.

[0267] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 CAR 또는 T 세포 활성화인자 단백질은 면역억제제 또는 항-증식 작용제에 대한 내성을 면역 세포에 부여한다. 일부 경우에서, 렌티바이러스 벡터는 면역억제제 또는 항-증식 작용제에 대한 내성을 형질도입된 세포에 부여함으로써 표적 세포의 선택적 증식을 촉진하는 것에 의해, 표적 세포의 선택적 증식을 촉진한다. 본 개시내용은 면역억제제 또는 항-증식 작용제에 대한 내성을 부여하는 핵산 서열들 중 어느 것을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 제공한다. 면역억제제 또는 항-증식 작용제의 예에는 비제한적으로

라파마이신 또는 그의 유도체, 라팔로그 또는 그의 유도체, 타크롤리무스 또는 그의 유도체, 시클로스포린 또는 그의 유도체, 메토트렉세이트 또는 그의 유도체, 및 마이코페놀레이트 모페틸 (MMF) 또는 그의 유도체가 포함된다. 다양한 내성 유전자들이 관련 기술분야에 알려져 있다. 라파마이신에 대한 내성은 mTOR 도메인에서 발견되며 FKBP-라파마이신 복합체의 표적인 것으로 알려져 있는 단백질 도메인 FRB를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 부여될 수 있다. 타크롤리무스에 대한 내성은 칼시뉴린 돌연변이 CNa22 또는 칼시뉴린 돌연변이 CNb30을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 부여될 수 있다. 시클로스포린에 대한 내성은 칼시뉴린 돌연변이 CNa12 또는 칼시뉴린 돌연변이 CNb30을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 부여될 수 있다. 이러한 칼시뉴린 돌연변이들에 대해서는 문헌 [Brewin et al. (2009) *Blood* 114:4792-803]에 기술되어 있다. 메토트렉세이트에 대한 내성은 다양한 돌연변이 형태의 디-히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)에 의해 제공될 수 있으며 (문헌 [Volpato et al. (2011) *J Mol Recognition* 24:188-198]), MMF에 대한 내성은 다양한 돌연변이 형태의 이노신 모노포스페이트 데히드로제나제 (IMPDH)에 의해 제공될 수 있다 (문헌 [Yam et al. (2006) *Mol Ther* 14:236-244]).

[0268] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 표적 항원은 CD3, CD28, CD134 및 CD137, 폴레이트 수용체, 4-1BB, PD1, CD45, CD8a, CD4, CD8, CD4, LAG3, CD3e, CD69, CD45RA, CD62L, CD45RO, CD62F, CD95, 5T4, 알파페토단백질 (AFP), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), BCMA, B-인간 융모막 고나도트로핀, CA-125, 암배아 항원 (CEA), 암배아 항원 (CEA), CD123, CD133, CD138, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD33, CD34, CD40, CD44, CD56, CLL-1, c-Met, CMV-특이적 항원, CS-1, CSPG4, CTLA-4, DLL3, 디시알로강글리오시드 GD2, 도관-상피 뮤신, EBV-특이적 항원, EGFR, EGFR 변이 III (EGFRvIII), ELF2M, 엔도글린, 에프린 B2, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 상피 세포 부착 분자 (EpCAM), 상피 종양 항원, ErbB2 (HER2/neu), 섬유모세포 연관 단백질 (fap), FLT3, 폴레이트 결합 단백질, GD2, GD3, 교종-연관 항원, 글리코스핑고지질, gp36, HBV-특이적 항원, HCV-특이적 항원, HER1-HER2, HER2-HER3 조합, HERV-K, 고분자량-흑색종 연관 항원 (FDVTW- MAA), HIV-1 외피 글리코단백질 gp41, HPV-특이적 항원, 인간 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제, IGFI 수용체, IGF-II, IL-1 1R알파, IL-13R-a2, 인플루엔자 바이러스-특이적 항원; CD38, 인슐린 성장 인자 (IGF1)-1, 장 카르복실 에스테라제, 카파 사슬, LAGA-1a, 람다 사슬, 라싸 바이러스-특이적 항원, 렉틴-반응성 AFP, 계통-특이적 또는 조직 특이적 항원, MAGE, MAGE-A1, 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, 종양-특이적 펩티드 항원결정인자를 제시하는 주 조직적합성 복합체 (MHC) 분자, M-CSF, 흑색종-연관 항원, 메소텔린, MN-CA IX, MUC- 1, mut hsp70-2, 돌연변이 p53, 돌연변이 ras, 호중구 엘라스타제, NKG2D, Nkp30, NY-ESO-1, p53, PAP, 프로스타제, 전립선 특이적 항원 (PSA), 전립선-암종 종양 항원-1 (PCTA-1), 전립선-특이적 항원 단백질, STEAP1, STEAP2, PSMA, RAGE-1, ROR1, RU1, RU2 (AS), 표면 부착 분자, 생존 및 텔로머라제, TAG-72, 피브로넥틴의 엑스트라 도메인 A (EDA) 및 엑스트라 도메인 B (EDB), 테나씬-C의 A1 도메인 (TnC A1), 갑상선글로불린, 종양 기질 항원, 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 (VEGFR2), HIV gp120, 또는 이들 표면 항원의 유도체, 변이체 또는 단편이다.

[0269] 면역억제제 또는 항-증식 작용제 (예컨대 면역억제 약물)는 통상적으로 ACT 전, 동안 및/또는 후에 사용된다. 일부 경우에서, 면역억제 약물의 사용은 치료 결과를 개선할 수 있다. 일부 경우에서, 면역억제 약물의 사용은 비제한적으로 급성 이식편-대-숙주 질환, 만성 이식편-대-숙주 질환 및 이식-후 림프증식성 질환과 같은 치료 부작용들을 감소시킬 수 있다. 비제한적으로 렌티바이러스 벡터가 면역억제제 약물에 대한 내성을 형질도입된 세포에 부여하는 본 개시내용의 방법을 포함하여, 본 개시내용은 본 개시내용의 질환 또는 이상 치료 또는 예방 방법들 중 어느 것과 함께인 면역억제 약물의 사용을 고려한다.

[0270] **폴리뉴클레오티드**

[0271] 본 개시내용은 또한 개시되는 형질도입 증강인자, T 세포 활성화인자 단백질, 어댑터 분자 및 CAR을 코딩하는 핵산 및 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 상기 핵산은 상기 언급된 단백질들 중 어느 것을 코딩하는 다수의 서열을 포함하는 구성체의 형태일 수 있다. 본원에서 사용될 때, "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 및 "핵산"이라는 용어들은 서로 동의어인 것으로 의도된다.

[0272] 통상의 기술자라면, 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서, 수많은 서로 다른 폴리뉴클레오티드 및 핵산들이 동일한 폴리펩티드를 코딩할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 또한, 통상의 기술자라면, 일상적인 기술을 사용함으로써, 폴리펩티드가 발현될 임의의 구체적인 숙주 생물체의 코돈 용법을 반영하여 본원에서 기술되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 폴리펩티드 서열에 영향을 주지 않는 뉴클레오티드 치환을 수행할 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0273] 핵산들은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 그것은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 그것은 합성 또는 변형 뉴클레오티드를 그 안에 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수도 있다. 올리고뉴클레오티드에 대한 수많은 서로 다른 유형의 변형들이 관련 기술분야에 알려져 있다. 여기에는 메틸포스포네이트 및 포스포로티오에이트 백본, 분자 3' 및/또는 5' 말단에서의 아크리딘 또는 폴리리신 사슬의 첨가가 포함된다. 본원에서 기술되는 바와 같은 사용 목적을 위하여, 폴리뉴클레오티드는 관련 기술분야에서 가용한 어떠한 방법에 의해서도 변형될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 그와 같은 변형은 해당 폴리뉴클레오티드의 생체내 활성 또는 수명을 증강하기 위하여 수행될 수 있다.

[0274] 뉴클레오티드 서열과 관련한 "변이체", "상동체" 또는 "유도체"라는 용어는 서열에서의 또는 서열로의 1개 (또는 그 초과) 핵산의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 또는 첨가가 포함된다. 상기 핵산은 분열원성 형질도입 증강인자를 코딩하는 1종 이상의 서열 및/또는 시토카인-기반 형질도입 증강인자를 코딩하는 1종 이상의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다. 절단 부위는 자가-절단성이어서, 폴리펩티드가 생성될 때 임의의 외부 절단 활성에 대한 필요성 없이 그것이 즉시 수용체 구성요소 및 신호전달 구성요소로 절단될 수 있다.

[0275] 족구병 바이러스 (FMDV) 2a 자가-절단 펩티드 및 다양한 변이체 및 2A-유사 펩티드들을 포함하여, 다양한 자가-절단 부위들이 알려져 있다.

[0276] 공동-발현 서열은 내부 리보솜 진입 서열 (IRES)일 수 있다. 공동-발현 서열은 내부 프로모터일 수 있다.

[0277] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 그에 의해 형질도입된 면역 세포에 항혈관생성 작용제에 대한 내성을 부여하는 단백질을 코딩한다.

[0278] **바이러스 입자 태그화 단백질**

[0279] 바이러스 벡터의 바이러스 외피는 포획 잔기에 결합하는 결합 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 태그화 단백질을 포함할 수도 있다.

[0280] 상기 태그화 단백질은 하기를 포함할 수 있다: 포획 잔기에 결합하는 결합 도메인; 스페이서; 및 막횡단 도메인.

[0281] 태그화 단백질은 포획 잔기에 대한 태그화 단백질의 결합을 통하여 세포 상청액으로부터의 바이러스 벡터의 정제를 용이하게 한다. '결합 도메인'은 표적물, 예를 들면 포획 잔기를 인식하여 거기에 특이적으로 결합할 수 있는 실체, 예를 들면 항원결정인자를 지칭한다. 결합 도메인은 포획 잔기에 특이적으로 결합할 수 있는 1개 이상의 항원결정인자를 포함할 수 있다. 예를 들면, 결합 도메인은 포획 잔기에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 항원결정인자를 포함할 수 있다. 결합 도메인이 1개를 초과하는 항원결정인자를 포함하는 경우, 각 항원결정인자는 본원에서 기술되는 바와 같이 링커 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0282] 결합 도메인에 비해 더 높은 포획 잔기에 대한 결합 친화성을 가지는 실체의 첨가시, 결합 도메인은 포획 잔기로부터 방출될 수 있다.

[0283] 결합 도메인은 1개 이상의 스트렙타비딘-결합 항원결정인자(들)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 결합 도메인은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 스트렙타비딘-결합 항원결정인자를 포함할 수 있다.

[0284] 스트렙타비딘은 세균인 스트렙토마이세스 아비디니이(Streptomyces avidinii)로부터 정제되는 52.8 kDa 단백질이다. 스트렙타비딘 동종-사량체는 바이오틴 (비타민 B7 또는 비타민 H)에 대하여 매우 높은 친화성을 가진다. 스트렙타비딘에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며, 유기 용매, 변성제, 단백질분해 효소 및 극한 온도 및 pH에 대한 스트렙타비딘-바이오틴 복합체의 내성으로 인하여, 분자 생물학 및 바이오-나노기술에서 광범위하게 사용되고 있다. 강한 스트렙타비딘-바이오틴 결합은 다양한 생체분자들을 서로 또는 고체 지지체상에 결합시키는 데에 사용될 수 있다. 스트렙타비딘-바이오틴 상호작용을 파괴하는 데에는 가혹 조건이 필요한데, 이는 정제되는 해당 단백질을 변성시킬 수 있다.

[0285] 결합 도메인은 예를 들면 바이오틴 모방체일 수 있다. '바이오틴 모방체'는 스트렙타비딘에 특이적으로 결합하는 - 예를 들면 6 내지 20, 6 내지 18, 8 내지 18 또는 8 내지 15개 아미노산의 - 짧은 펩티드 서열을 지칭한다. 상기한 바와 같이, 바이오틴/스트렙타비딘 상호작용의 친화성은 매우 높다. 이에 따라, 결합 도메인이 바이오틴 자체에 비해 스트렙타비딘에 대하여 더 낮은 친화성을 가지는 바이오틴 모방체를 포함할 수 있다는 것이 본 발명의 장점이다.

[0286] 구체적으로, 바이오틴 모방체는 바이오틴에 비해 더 낮은 결합 친화성으로 스트렙타비딘에 결합할 수 있으며, 그에 따라 바이오틴은 스트렙타비딘-포획된 레트로바이러스 벡터를 용리하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, 바이오틴 모방체는 1 nM 내지 100 uM의 Kd로 스트렙타비딘에 결합할 수 있다.

[0287] 바이오틴 모방체는 하기의 군에서 선택될 수 있다: 스트렙-태그 II, 측접cc스트렙태그(Flankedccstreptag) 및 cc스트렙태그(ccstreptag). 결합 도메인은 1개를 초과하는 바이오틴 모방체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 결합 도메인은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 바이오틴 모방체를 포함할 수 있다. 결합 도메인이 1개를 초과하는 바이오틴 모방체를 포함하는 경우, 각 모방체는 동일하거나 서로 다른 모방체일 수 있다.

[0288] 본 개시내용은 정제될 수 있는 바이러스 입자 및 그의 정제 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서는, 바이러스 벡터의 바이러스 외피가 포획 잔기에 결합하는 결합 도메인; 스페이서; 및 막횡단 도메인을 포함하는 태그화 단백질을 포함할 수도 있으며, 상기 태그화 단백질은 포획 잔기에 대한 태그화 단백질의 결합을 통하여 세포 상청액으로부터의 바이러스 벡터의 정제를 용이하게 한다.

[0289] 태그화 단백질의 결합 도메인은 1종 이상의 스트렙타비딘-결합 항원결정인자(들)를 포함할 수 있다. 상기 스트렙타비딘-결합 항원결정인자(들)는 바이오틴 모방체, 예컨대 바이오틴에 비해 더 낮은 친화성으로 스트렙타비딘에 결합함으로써 패키지화 세포에 의해 생성되는 스트렙타비딘-포획 레트로바이러스 벡터를 용리하는 데에 바이오틴이 사용될 수 있도록 하는 바이오틴 모방체일 수 있다. 적합한 바이오틴 모방체의 예에는 하기가 포함된다: 스트렙-태그 II, 측접cc스트렙태그 및 cc스트렙태그. 본 발명 제1 측면의 바이러스 벡터는 T-세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수도 있다. 상기 바이러스 벡터는 바이러스-유사 입자 (VLP)일 수도 있다.

[0290] **생산/패키지화 세포주**

[0291] 본 개시내용은 본 개시내용에 따른 바이러스 입자의 생성을 위한 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 숙주 세포는 세포 표면에 분열원성 형질도입 증강인자 및/또는 시토카인-기반 형질도입 증강인자를 발현한다. 숙주 세포는 전기 실시양태들에 따른 바이러스 벡터의 생산을 위한 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 바이러스 입자의 정제에 유용한 태그화 단백질을 포함할 수 있다.

[0292] 숙주 세포는 패키지화 세포로서, 하기 유전자들 중 1종 이상을 포함할 수 있다: gag, pol, env 및 rev. 레트로바이러스 벡터의 패키지화 세포는 gag, pol 및 env 유전자를 포함할 수 있다. 렌티바이러스 벡터의 패키지화 세포는 gag, pol, env 및 rev 유전자를 포함할 수 있다.

[0293] 숙주 세포는 생산자 세포로서, gag, pol, env 및 임의적으로 rev 유전자, 그리고 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 유전자 치료법에서 사용하기 위한 통상적인 재조합 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에서는, gag-pol 및 env 단백질 코딩 영역 중 1종 이상의 적어도 일부가 바이러스로부터 제거되고 패키지화 세포에 의해 제공될 수 있다. 이는 바이러스 벡터를 복제-결함이 되도록 하는데, 바이러스가 그의 게놈을 숙주 게놈에 통합시킬 수는 있지만, 구조 단백질의 결핍으로 인하여 변형된 바이러스 게놈이 자체적으로 증식할 수는 없기 때문이다.

[0294] 다량의 바이러스 벡터를 증식시켜 단리하는 데에, 즉 표적 세포의 형질도입용으로 적합한 역가의 레트로바이러스 벡터를 제조하는 데에는 패키지화 세포가 사용된다.

[0295] 일부 경우에서, 증식 및 단리는 레트로바이러스 gagpol 및 env (및 렌티바이러스의 경우 rev) 유전자의 단리, 그리고 패키지화 세포주를 생성시키기 위한 숙주 세포에의 그의 별도의 도입을 필요로 할 수 있다. 패키지화 세포주는 레트로바이러스 DNA를 패키지화하는 데에 필요한 단백질들을 생성시키기는 하지만, psi 영역의 결핍으로 인하여 그것이 캡시드화를 초래할 수는 없다. 그러나, psi 영역을 보유하는 재조합 벡터가 패키지화 세포주에 도입되는 경우, 헬퍼 단백질들이 psi-양성 재조합 벡터를 패키지화함으로써, 재조합 바이러스 모액을 생성시킬 수 있다.

[0296] 가용한 패키지화 주들의 개요는 문헌 [Coffin, J.M., et al. (1997) *Retroviruses* 449]에 제시되어 있다.

[0297] gag, pol 및 env (및 렌티바이러스 벡터의 경우 rev) 바이러스 코딩 영역들이 독립적으로 패키지화 세포주에 형질감염되는 별도의 발현 플라스미드상에 보유됨으로써, 야생형 바이러스 생성에 3종의 재조합 사례를 필요로 하는 패키지화 세포들도 개발되어 있다.

[0298] 일시적 형질감염은 안정한 벡터-생성 세포주를 생성시키는 데에 필요한 오랜 시간을 회피하므로, 벡터 또는 레트로바이러스 패키지화 구성요소가 세포에 대하여 독성인 경우에 사용된다. 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터

를 생성시키는 데에 통상적으로 사용되는 구성요소에는 Gag/Pol 단백질을 코딩하는 플라스미드, Env 단백질을 코딩하는 플라스미드 (및 렌티바이러스의 경우 rev 단백질) 및 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터 게놈이 포함된다. 벡터 생성은 기타 필요한 구성요소들을 포함하는 세포에의 이러한 구성요소들 중 1종 이상의 일시적 형질감염을 포함한다. 본 발명의 패키지화 세포는 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터 입자를 생성시킬 수 있는 임의의 포유동물 세포 유형일 수 있다. 패키지화 세포는 293T-세포, 또는 현탁액 중에서 성장하고 혈청 없이 성장하도록 적합화된 293T-세포의 변이체일 수 있다.

[0299] 패키지화 세포는 하기를 사용한 일시적 형질감염에 의해 구성될 수 있다:

[0300] a) 전달 벡터

[0301] b) gagpol 발현 벡터

[0302] c) env 발현 벡터.

[0303] 상기 env 유전자는 의사형화된 레트로바이러스 벡터를 산출하는 이종유래의 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 env 유전자는 RD114 또는 그의 변이체들 중 1종, VSV-G, 기번-유인원 백혈병 바이러스 (GALV), 양향성 외피 또는 홍역 외피 또는 비비 레트로바이러스 외피 글리코단백질로부터의 것일 수 있다.

[0304] 렌티바이러스 벡터의 경우, rev 벡터에 의한 일시적 형질감염도 수행된다.

[0305] 본 개시내용은 전기 실시양태들에 따른 바이러스 입자들을 발현하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 세포 표면에 1종 이상의 형질도입 증강인자를 발현한다. 일부 실시양태에서, 패키지화 세포에 의해 생성되는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 전기 실시양태들에서 기술된 바와 같도록, 본 발명은 세포 표면에 하기를 발현하는 숙주 세포를 제공한다:

[0306] (a) 분열원성 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 분열원성 형질도입 증강인자; 및/또는

[0307] (b) 시토카인 도메인 및 막횡단 도메인을 포함하는 시토카인-기반 형질도입 증강인자.

[0308] 일부 실시양태에서, 패키지화 세포에 의해 생성되는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터가 전기 부문에서 기술된 특징들을 가지도록, 숙주 세포는 포획 잔기에 결합하는 결합 도메인; 및 막횡단 도메인을 포함하며, 포획 잔기에의 태그화 단백질의 결합을 통하여 세포 상청액으로부터의 바이러스 벡터의 정제를 용이하게 하는 태그화 단백질을 세포 표면에 발현할 수도 있다.

[0309] 상기 태그화 단백질은 결합 도메인과 막횡단 도메인 사이에 스페이서를 포함할 수도 있다.

[0310] 숙주 세포라는 용어는 패키지화 세포 또는 생산자 세포를 기술하는 데에 사용될 수 있다. 패키지화 세포는 하기 유전자들 중 1종 이상을 포함할 수 있다: gag, pol, env 및/또는 rev. 생산자 세포는 gag, pol, env 및 임의적으로 rev 유전자를 포함하며, 또한 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 게놈을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 분열원성 및/또는 시토카인 형질도입 증강인자를 안정하게 발현하는 임의의 적합한 세포주일 수 있다. 그것은 전달 벡터, gagpol, env (및 렌티바이러스의 경우 rev)에 의해 일시적으로 형질감염됨으로써, 복제 부적격인 레트로바이러스/렌티바이러스 벡터를 생성시킬 수 있다.

[0311] 본 개시내용은 1종 이상의 형질도입 증강인자를 코딩하는 핵산을 세포에 형질도입하거나 형질감염시키는 단계를 포함하는 상기에 따른 숙주 세포의 제조 방법도 제공한다. 역시 제공되는 것은 본 발명의 제2 측면에 따른 세포에서 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 게놈을 발현시키는 단계를 포함하는 전기 실시양태들에 따른 바이러스 벡터의 제조 방법이다.

[0312] **유전자이전 면역 세포**

[0313] 본 개시내용은 면역 세포를 전기 실시양태들 중 어느 것에 따른 바이러스 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 활성화된 유전자이전 면역 세포의 제조 방법을 제공한다. 상기 면역 세포는 생체내 또는 생체외에서 형질도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 벡터는 생체외에서 숙주 세포를 단리하고 조작할 어떠한 필요성도 없이 생체내에서 면역 세포가 형질도입되도록, 살아있는 대상체에 투여된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 생체외에서 조작된 다음, 그를 필요로 하는 대상체로 복귀된다.

[0314] 상기 면역 세포는 일반적으로 포유동물 세포로서, 통상적으로는 인간 세포, 더욱 통상적으로는 일차 인간 세포, 예컨대 동종이계 또는 자가 공여자 세포이다. 세포는 생물학적 샘플, 예컨대 대상체로부터 수득되거나 그로부터 유래하는 것과 같은 샘플로부터 단리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포가 단리되는 대상체는 질환 또는

이상을 가지고 있거나 세포 치료법을 필요로 하는 대상체, 또는 세포 치료법이 투여될 대상체이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 세포가 단리, 처리 및/또는 조작되는 입양 세포 치료법과 같은 특정 치료 개재를 필요로 하는 인간이다. 일부 실시양태에서, 상기 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프 기관으로부터 유래하며, 선천성 또는 적응성 면역 시스템의 세포, 예컨대 골수 세포 또는 림프구를 포함한 림프 세포, 통상적으로 T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 면역 시스템의 세포이다. 다른 예시적인 세포로는 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)를 포함한 다능성 및 만능 줄기 세포와 같은 줄기 세포들이 포함된다. 상기 세포는 통상적으로 대상체로부터 바로 단리되고/거나 대상체로부터 단리되어 냉동된 것들과 같은 일차 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포에는 T 세포 또는 기타 세포 유형의 1종 이상의 하위세트, 예컨대 전체 T 세포 군집, CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 이들의 하위 군집, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 잠재력, 증식, 재순환, 국소화 및/또는 영속 능력, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정 기관 또는 구획의 존재, 마커 또는 시토카인 분비 프로파일 및/또는 분화 정도에 의해 한정되는 것들이 포함된다.

[0315] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위-유형 및 하위군집으로는 미접촉 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 기억 T 세포 및 이들의 하위-유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T (TSCM), 중심 기억 T (TCM), 이펙터 기억 T (TEM) 또는 말단 분화 이펙터 기억 T 세포, 종양-침윤 림프구 (TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-연관 불변 T (MAIT) 세포, 자연 발생 및 적응성 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 소포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[0316] 본원의 일부 실시양태에서, 제공되는 세포는 세포독성 T 림프구이다. "세포독성 T 림프구" (CTL)에는 예를 들면 그의 표면상에 CD8을 발현하는 T 림프구 (예컨대 CD8+ T 세포)가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 그와 같은 세포는 바람직하게는 항원을 경험한 바 있는 "기억" T 세포 (TM 세포)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 전구체 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 상기 전구체 T 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 미접촉 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군에서 선택되는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 미접촉 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군에서 선택되는 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다.

[0317] 상기 방법에서 사용될 수 있는 적합한 조작 세포 군집에는 T 세포와 같이 세포독성 활성을 가지는 임의의 면역 세포가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. T 세포의 예시적인 하위-군집에는 CD3+CD8+ T 세포, CD3+CD4+ T 세포 및 NKT 세포를 포함하여 CD3+를 발현하는 것들이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0318] 본 개시내용의 벡터 시스템에 사용되는 세포는 세포독성 T 세포 (다양하게 세포독성 T 림프구, CTL, T 살해 세포, 세포용해성 T 세포, CD8+ T 세포 및 살해 T 세포로도 알려져 있음), 자연 살해 (NK) 세포, 및 림포카인-활성화 살해 (LAK) 세포에서 선택되는 세포독성 림프구이다. 활성화시, 이러한 세포독성 림프구들 각각은 표적 종양 세포의 파괴를 촉발한다.

[0319] "자연 살해" NK 세포는 선천성 면역 시스템의 주요 구성요소에 상당하는 세포독성 림프구이다. NK 세포는 종양 형성 및 바이러스에 의해 감염된 세포에 반응하여, 감염된 세포에서 세포자멸사 (세포 사멸)를 유도한다.

[0320] 본 개시내용의 벡터 시스템 형질도입에 사용되는 NK 세포는 문헌에 기술되어 있는 바와 같은 NK 세포들은 물론, 임의의 공급원 유래의 1종 이상의 마커를 발현하는 NK 세포들을 포함할 수 있다.

[0321] 일부 실시양태에서, NK 세포는 CD3- CD56+ 세포로 한정된다.

[0322] 일부 실시양태에서, NK 세포는 CD7+ CD127- NKp46+ T-bet+ Eomes+ 세포로 한정된다.

[0323] 일부 실시양태에서, NK 세포는 CD3- CD56dim CD16+ 세포로 한정된다.

[0324] 일부 실시양태에서, NK 세포는 CD3- CD56bright CD16- 세포로 한정된다.

[0325] 일부 실시양태에서, NK 세포는 비제한적으로 인간 살해 이모노글로불린-유사 수용체 (KIR), 마우스 Ly49 계열 수용체, CD94-NKG2 이종이량체성 수용체, NKG2D, 자연 세포독성 수용체 (NCR) 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 세포 표면 수용체를 포함한다.

[0326] 일부 실시양태에서, T 세포 또는 NK 세포는 동종이계 공여자 세포이다.

[0327] 일부 실시양태에서, T 세포 또는 NK 세포는 자가 공여자 세포이다.

[0328] 본원에서 사용될 때, 유전자이전 T 세포 또는 형질도입된 T 세포, 또는 이들의 용도에 대한 임의의 언급은 본원에서 개시되는 임의의 다른 면역 세포 유형에도 적용될 수 있다.

[0329] 본 개시내용은 또한 1종 이상의 외인성 핵산 분자를 포함하는 유전자이전 면역 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 유전자이전 면역 세포는 본 개시내용의 벡터 시스템을 코딩하는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자이전 면역 세포는 형질도입 증강인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자이전 면역 세포는 T 세포 활성화인자 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유전자이전 면역 세포는 본 개시내용의 벡터 시스템을 코딩하는 적어도 2종의 폴리뉴클레오티드 및 T 세포 활성화인자 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0330] **개시 조성물을 사용한 대상체의 치료 방법**

[0331] 본 개시내용은 본원에서 개시되는 조성물, 치료 조성물, 세포, 벡터 및 폴리뉴클레오티드를 사용한 그를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 개시되는 바이러스 입자 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 암의 치료 및/또는 암 세포의 사멸 방법을 제공한다.

[0332] 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 방법은 전기 실시양태들 중 어느 것에 따른 렌티바이러스 입자 치료 유효량을 투여하는 것에 의해 대상체에서 암을 치료하고/거나 암 세포를 사멸시키는 데에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 개시되는 방법은 벡터 시스템을 투여하는 것에 의해 암을 치료하고/거나 암 세포를 사멸시키는 데에 사용될 수 있다.

[0333] 본 개시내용은 또한 전기 실시양태들 중 어느 것의 시스템을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 암의 치료 및/또는 암 세포의 사멸 방법을 제공한다.

[0334] **투여 양식 및 제약 조성물**

[0335] 개시되는 바이러스 입자는 원하는 것이 국소 치료인지 또는 전신성 치료인지에 따라 수많은 방식으로 투여될 수 있다.

[0336] 본원에서 기술되는 조성물 또는 실시양태는 공지의 기술에 따른 제약용 캐리어 중 투여용으로 제제화될 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st Ed. 2005)]을 참조한다. 제약 제제의 제조에서, 조성물은 통상적으로 특히 허용되는 캐리어와 혼합된다. 물론, 상기 캐리어는 제제 중 임의의 다른 성분들과 상용성이라는 의미에서 허용가능해야 하며, 대상체에게 유해하지 않아야 한다. 캐리어는 고체 또는 액체, 또는 둘 다일 수 있으며, 바람직하게는 단위-투여 제제, 예를 들면 중량 기준 0.01 % 또는 0.5 % 내지 95 % 또는 99 %의 활성 화합물을 함유할 수 있는 정제로서 화합물을 사용하여 제제화된다. 임의적으로는 1종 이상의 보조 성분들을 포함한 성분들을 혼합하는 것을 포함하는 잘-알려져 있는 약학 기술들 중 어느 것에 의해 제조될 수 있는 1종 이상의 실시양태가 본원에서 개시되는 제제화에 포함될 수 있다.

[0337] 또한, 본 개시내용에 따른 조성물 중 당, 캐리어, 부형제 또는 희석제와 같이 "제약상 허용되는" 성분은 (i) 조성물이 그의 의도되는 목적에 적합하지 않게 되도록 하지 않으면서 그것이 본 개시내용의 조성물과 조합될 수 있다는 점에서 다른 조성물 중 성분들과 상용성이며, (ii) 과도한 부정적인 부작용 (예컨대 독성, 자극 및 알레르기 반응) 없이 본원에서 제공되는 바와 같은 대상체와 사용하기에 적합한 성분이다. 조성물에 의해 제공되는 이점을 그의 위험성이 능가하는 경우, 부작용은 "과도한" 것이다. 제약상 허용되는 성분의 비-제한적인 예에는 표준 제약용 캐리어들 중 어느 것, 예컨대 식염수 용액, 물, 에멀션 예컨대 오일/물 에멀션, 마이크로에멀션 및 다양한 유형의 습윤제가 포함된다.

[0338] 일반적으로, 투여는 국소, 비경구 또는 장내의 것일 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 통상적으로 비경구 투여에 적합하다. 본원에서 사용될 때, 제약 조성물의 "비경구 투여"에는 그에 따라 일반적으로 혈류, 근육 또는 내부 장기에의 직접적인 투여로 이어지는, 대상체 조직의 물리적 파괴 및 조직 중 파괴부를 통한 제약 조성물의 투여를 특징으로 하는 임의의 경로의 투여가 포함된다. 이에 따라, 비경구 투여에는 조성물의 주사, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직-침투성 비-외과적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한 제약 조성물의 투여가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 비제한적으로 피하, 복막내, 근육내, 줄기내 (intrastemal), 정맥내, 동맥내, 수막강내, 뇌실내, 요도내, 두개내, 종양내, 윤활막내 주사 또는 주입; 및 신장 투석 주입 기술을 포함한 비경구 투여가 고려된다. 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물의 비경구 투여는 정맥내 투여를 포함한다.

[0339] 비경구 투여용으로 적합한 제약 조성물의 제제는 통상적으로 보통 멸균수 또는 멸균 등장 식염수와 같은 제약상

허용되는 캐리어와 조합된 활성 성분을 포함한다. 그와 같은 제제는 일시(bolus) 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 주사가능 제제는 앰풀, 또는 보존제를 함유하는 다회-투여분 용기와 같은 단위 투약 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제제에는 현탁액, 용액, 오일 또는 수성 비히클 중 에멀션, 페이스트 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그와 같은 제제는 또한 비제한적으로 현탁제, 안정화제 또는 분산제를 포함한 1종 이상의 추가적인 성분을 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제제의 일 실시양태에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전의 적합한 비히클 (예컨대 멸균 무-발열원수)을 사용한 재구성을 위한 건조 (즉 분말 또는 과립) 형태로 제공된다. 비경구 제제에는 또한 염, 탄수화물 및 완충제 (바람직하게는 3 내지 9의 pH로의 것)와 같은 부형제들을 함유할 수 있는 수성 용액도 포함되지만, 일부 적용분야의 경우, 그것은 더욱 적합하게는 멸균 비-수성 용액, 또는 멸균 무-발열원수와 같은 적합한 비히클과 함께 사용될 건조된 형태로 제제화될 수 있다. 예시적인 비경구 투여 형태에는 멸균 수성 용액, 예를 들면 수성 프로필렌 글리콜 또는 덱스트로스 용액 중 용액 또는 현탁액이 포함된다. 그와 같은 투약 형태는 원할 경우 적합하게 완충될 수 있다. 기타 유용한 비경구-투여가능 제제에는 미세결정질 형태로, 또는 리포좀 조제물 중에 활성 성분을 포함하는 것들이 포함된다. 비경구 투여용 제제는 즉시 및/또는 변형 방출용으로 제제화될 수 있다. 변형 방출 제제에는 지연-, 지속-, 펄스형-, 조절-, 표적화 및 프로그래밍 방출이 포함된다.

[0340] 본 발명의 조성물은 또한 제약 조성물에서 통상적으로 발견되는 기타 보조 성분들을 함유할 수 있다. 이에 따라, 예를 들면, 조성물은 예컨대 항가려움약, 수렴제, 국소 마취제 또는 항-염증 작용제와 같은 추가적인 상용성 제약-활성 물질을 함유할 수 있거나, 또는 염료, 향미제, 보존제, 항산화제, 불투명화제, 증점제 및 안정화제와 같이 본 발명 조성물의 다양한 투약 형태를 물리적으로 제제화하는 데에 유용한 추가적인 물질들을 함유할 수 있다. 그러나, 그와 같은 물질들은 첨가되었을 때 본 발명 조성물 중 성분들의 생물학적 활성을 과도하게 방해하지 않아야 한다. 제제는 멸균된 후, 원할 경우 제제 중 핵산(들)과 유해하게 상호작용하지 않는 보조제들, 예컨대 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 에멀션화제, 삼투압에 영향을 주기 위한 염, 완충제, 착색제, 향미 및/또는 방향 물질 등과 혼합될 수 있다.

[0341] 본 발명의 바이러스 입자 조성물은 치료 유효량 또는 예방 유효량과 같이 질환 또는 이상을 치료하거나 예방하는 데에 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 치료 대상체의 주기적인 평가에 의해 치료 또는 예방 효능이 모니터링된다. 조건에 따라 수일 또는 그 이상에 걸친 반복 투여 동안, 원하는 질환 증상의 억제가 이루어질 때까지 치료는 반복된다. 그러나, 다른 투약 처방계획이 유용할 수도 있으며, 채택될 수 있다. 원하는 투약량은 조성물의 단일 일시 투여, 조성물의 다수 일시 투여, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0342] 바이러스 입자의 투여 맥락에서, 바이러스 입자의 양 및 해당 입자의 투여 시간은 본 발명 교시의 이점이 있는 통상 기술자의 권한에 속하게 된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물의 치료 유효량의 투여는 예를 들면 해당 치료를 받고 있는 환자에게 치료상의 이점을 제공하기에 충분한 수의 바이러스 입자 단일 주사와 같은 단일 투여에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 해당 조성물의 투여를 감독하는 의료 종사자에 의해 결정될 수 있는 바와 같이 상대적으로 짧거나 상대적으로 연장된 시간 기간 중 어느 하나에 걸친 렌티바이러스 벡터 조성물의 다수 연속 투여가 대상체에게 제공된다. 예를 들면, 포유동물에게 투여되는 감염성 입자의 수는 치료되는 구체적 질환 또는 장애의 치료법을 달성하는 데에 필요할 수 있는 바와 같이 단일 투여량, 또는 2회 이상 투여로 분할된 것 중 어느 하나로 제공되는 약 10^{7}, 10^{8}, 10^{9}, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}개 또는 그 이상 바이러스 입자/ml 수준의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서는, 원하는 특정 치료법 처방계획의 효과를 달성하기 위하여, 단독, 또는 1종 이상의 다른 치료 약물과의 조합 중 어느 하나로서 2종 이상의 서로 다른 바이러스 벡터 조성물이 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 유전자이전 면역 세포와의 조합으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아직 형질도입되지 않은 면역 세포와의 조합으로서 투여된다. "조합으로서"라는 구는 동시, 또는 짧은 시간 기간 이내, 예컨대 1주, 1일, 12시간, 6시간, 1시간, 30분, 10분, 5분 또는 1분 이내인 다른 시간을 포함할 수 있다.

[0343] 본원에서 언급되는 모든 공개 및 특허들은 각 개별 공개 또는 특허가 참조로 포함되는 것으로 구체적이고도 개별적으로 표시된 것처럼 그 전체가 의거 참조로 포함된다. 충돌의 경우, 그 중 임의의 정의를 포함한 본 출원이 우선하게 된다. 그러나, 본원에서 인용되는 임의의 참고문헌, 논문, 공개, 특허, 특허 공개 및 특허 출원에 대한 언급이 세계 어느 나라에서 그것이 합법적인 선행 기술을 구성하거나 통상적인 일반 지식의 일부를 형성한다는 승인 또는 임의의 형태의 시사는 아니며, 그것으로 받아들여져서도 안 된다.

[0344] 본원에서 사용되는 부문 표제는 단지 편성 목적의 것으로서, 기술되는 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안

된다.

[0345] 예시적인 실시양태들을 예시하고 기술하기는 하였지만, 본 발명의 기술사상 및 영역에서 벗어나지 않고도 다양한 변화들이 그 안에서 이루어질 수 있다는 것은 알고 있을 것이다.

[0346] **[실시예]**

[0347] 하기 실시예들은 본원에서 기술되는 조성물 및 방법이 어떻게 사용, 제조 및 평가될 수 있는지에 대한 상세한 설명을 관련 기술분야 통상의 기술자에게 제공하기 위하여 제시되는 것으로서, 순수하게 본 발명을 예시하고자 하는 것이며, 본 발명으로 간주되는 것의 영역을 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0348] **실시예 1: 렌티바이러스 입자 제조**

[0349] 4개의 T175 플라스크에 5 % DMEM 배지 중 27 x 10^6개의 HEK293T 세포를 시딩하였다. 표 2에 따라 SF 배지 (첨가제가 없는 DMEM)에의 표 1에 따른 플라스미드의 첨가에 의해 형질감염 혼합물을 제조한 후, 이어서 혼합물에 폴리에틸렌이민 (PEI)을 첨가하고, 보르텍스에 의해 혼합한 후, 실온 (RT)에서 20분 동안 인큐베이팅하였다. 다음에, 형질감염 혼합물을 T175 플라스크 당 25 ml (총 100 ml)의 새로운 5 % DMEM에 첨가하였다. 다음에, 시딩 배지를 293T 세포로부터 흡인하고, 형질감염 배지를 첨가하였다. 2일의 인큐베이션 후, 상청액을 수확하고, 25 ml를 다시 세포에 첨가하였다. 다음날, 상청액을 수확하고, 0.45 마이크로미터 필터를 통해 여과한 후, 4 ℃에서 105분 동안 25,400 rpm으로 원심분리하고, 450 μl의 PBS 중에 재현탁하였다.

[0350] <표 1>

[0351]

플라스미드	진스크립트 로트	우모야 ID	농도	4x T175에 필요한 총 ul
pRRL-MND-인간-Frb-RACCRb-CD19_CAR-VTw	U005HFD240-12		1ug/ul	112
pRRL-MND-인간-Frb-RACCRg-CD20_CAR-VTw	U005HFD240-16		1ug/ul	112
pUM-MDLg-pRRE	U9159FE040-1	89	1ug/ul	56
pUM-RSV-REV	U9159FE040-2	85	1ug/ul	56
p57M-MND-코쿠스-wPRE-BGHpolyA	U9159FE040-2	33	1ug/ul	56

[0352] <표 2>

[0353]

	CF10	4x T175
sq cm	6320	700
전달 1	1000ug	112
전달 2	1000ug	112
reqpol	500ug	56
rev	500ug	56
env	500ug	56
sf 배지	90ml	10ml
PEI	7.5ml	1176

[0354] 렌티바이러스 입자 역가 측정을 위하여, 293T 세포를 12 웰 플레이트에 1 x 10^5개 세포/웰의 농도로 시딩하였다. 다음날, 세포를 계수하고, 기술된 바와 같은 혼합물을 사용하여 형질도입시켰다. 2A 자가-처리 펩티드의 %에 대해 분석된 상청액 부피에는 하기가 포함되었다: 도 5A에 나타낸 바와 같은 200 μl, 100 μl, 50 μl, 20 μl, 10 μl 및 5 μl. 2A 펩티드의 %에 대해 분석된 농축 상청액 부피에는 하기가 포함되었다: 도 5B에 나타낸 바와 같은 1 μl, 0.5 μl, 0.2 μl, 0.1 μl, 0.05 μl 및 0.02 μl.

[0355] 렌티바이러스 입자 역가 형질도입 3일 후, CD20-His, His-PE, CD19-FITC 및 2A 각각을 사용하여 30분 동안 세포를 염색하였다. 다음에, 유동 세포측정법에 의해 세포를 분석함으로써, 생성된 렌티바이러스 역가를 측정하였다. 상청액 샘플에서 렌티바이러스 역가는 3.65 x 10^5 TU/ml (도 5A)이었으며, 농축된 샘플에서 렌티바이러스 역가는 1.12 x 10^8 TU/ml (도 5B)이었다.

[0356] **실시예 2: 이중 벡터 시스템 세포 형질도입**

[0357] 본 실시예는 일차 인간 T 세포에서의 CD19 및 CD20 스플릿(split) RACR 시스템의 발현을 입증한다.

[0358] 프로토콜 1일차에, 일차 CD3+ T-세포 (~1천 5백만개 세포, 블러드웍스(Bloodworks) 공여자 3251BW)를 해동하여, 10 % FBS, 페니실린, 스트렙토마이신 및 50 IU/ml의 huIL2를 포함하는 RPMI-1640 배지 (이하 "완전 RPMI")에

위치시켰다.

[0359] 2일차에, 항-CD3 항-CD28 써모피셔 다이나비드(Thermofisher Dynabead)를 사용하여 T 세포를 비드 자극 (1:1) 하였다.

[0360] 4일차에, 비드 활성화된 T 세포에 감염 다중도 (MOI) 12.5의 상기한 바와 같은 렌티바이러스 조제물을 형질도입하였다. 형질도입되지 않은 T 세포 (MOI 0) 분취량을 대조로서 남겨두었다.

[0361] 6일차에, 형질도입된 T 세포를 필요에 따라 분할하고, 자극 조건의 RPMI 중에서 대략 0.5 x 10^6개 세포/ml로 유지하였다.

[0362] 7일차에, 세포를 0.5 x 10^6 세포/ml로 희석하고, 하기 2종의 처리 조건으로 구획하였다:

[0363] 조건 1: 완전 RPMI 중 10 nM 라파마이신

[0364] 조건 2: IL2를 포함하는 완전 RPMI (라파마이신 없음)

[0365] 14일차에, 해당 각 배지 중 50 %로 세포를 희석하였다.

[0366] 20일차에, T 세포를 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 CD19 및 CD20 CAR 둘 다의 발현에 대해 분석하였다 (도 6A 및 6B). 유동 세포측정법 분석은 하기 3종의 샘플로부터의 200K 세포/샘플 (대략 200 ul/샘플)을 포함하였다:

[0367] 1) 0 MOI

[0368] 2) 12.5 MOI

[0369] 3) 12.5 MOI + 라파마이신

[0370] 라파마이신으로 처리되지 않은 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포와 비교하였을 때 (5.87 %), 라파마이신 첨가 후, 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포는 CD19 및 CD20 CAR 둘 다의 발현 증강을 나타내었다 (42.6 %).

[0371] 염색 절차

[0372] 하기의 형광단들을 유동 세포측정법 분석에 사용하였다:

[0373] a. CD19-FITC (표면 항원)

[0374] b. CD20-PE 접합체 (표면 항원)

[0375] c. DAPI (생/사멸)

[0376] 세포를 회전 침강시키고, PBS 중에서 1회 가-세척한(pseudo-washed) 다음, PBS 중에서 세척하였다. 표면 항원 염색을 위하여, 상기와 같은 염색 시약들을 포함하는 MACS/0.5 % BSA ("FACS") 중에 세포를 현탁하였다. 다음에, 세포를 FACS 중에서 가-세척한 다음, FACS로 세척한 후, 플루오로 픽스(Fluoro Fix) 고정액 (바이오레전드(Biolegend) 사) 중에 재-현탁하였다. 채널들 (보라색, 청색, 황색, 적색)을 사용하는 시토플렉스(Cytoflex) S (베크만 쿨터(Beckman Coulter) 사)를 사용하여 유동 세포측정법 분석을 수행하였다. 샘플 3 (12.5 MOI + 라파마이신)으로부터의 세포를 사용하여, 단일 염색 및 형광 마이너스 원(Fluorescence Minus One) 대조 (FMO 대조)를 수행하였다.

[0377] **실시예 3: 이중 CAR T 세포가 표적 세포를 사멸시킴**

[0378] CD19+ 및/또는 CD20+ 표적 세포를 사멸시키는 CD19/CD20 이중 CAR T 세포 노출의 능력을 평가하기 위하여, 표 3에 따라 공동-배양 플레이트를 구성하였다.

[0379] <표 3>

이펙터	표적	이펙터	표적
MOI 0	없음	MOI 12.5R	없음
MOI 0	RAJI (CD19+CD20)	MOI 12.5R	RAJI (CD19+CD20)
MOI 0	RAJI 19 KO (CD20 단독)	MOI 12.5R	RAJI 19 KO (CD20 단독)
MOI 0	K562 (항원 표적 없음)	MOI 12.5R	K562 (항원 표적 없음)
MOI 0	K562 KI (CD19 단독)	MOI 12.5R	K562 KI (CD19 단독)
	RAJI 단독		K562 단독
	RAJI 19 KO 단독		K562 KI 단독

[0380]

[0381] 96 웰 비-처리 u-저부 플레이트에서 10 % FBS 및 페니실린/스트렙타비딘을 포함하는 RPMI 배지 중에 37 ℃ 및 5 % CO_2로 200,000개의 형질도입된 T 세포를 40,000개의 표적 세포와 공동-배양하였다. 대조로서, 표적 세포인 RAJI, RAJI 10KO, K562 및 K562 KI를 단독으로 배양하였다. 세포들을 60시간 동안 공동-배양하였다.

[0382] 60시간 후, T 세포를 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 표적 세포 제거 분석에 대하여 분석하였다 (도 7 및 8).

[0383] 하기의 형광단들을 유동 세포측정법 분석에 사용하였다:

[0384] a. 항-CD3-FITC (CAR T 세포)

[0385] b. 항-CD19-APC (CD19를 발현하는 Raji 세포 및 K562 KI 세포)

[0386] c. CD20-APC-Cy7 (Raji 세포)

[0387] 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포는 CD19 양성/CD20 음성 종양 세포는 박멸한 반면 (도 7C-7D), CD19 음성/CD20 음성 종양은 이중 벡터 시스템 CAR에 의해 영향을 받지 않고 유지되었다 (도 7A-7B). 이와 같은 데이터는 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포상에서 발현되는 CD19 CAR가 기능성이며, 강력한 종양 제거를 야기한다는 것을 확인해 준다.

[0388] 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포는 CD19 음성/CD20 양성 종양 세포를 박멸하였다 (도 8A-8B). 이와 같은 데이터는 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포상에서 발현되는 CD20 CAR가 기능성이며, 강력한 종양 제거를 야기한다는 것을 확인해 준다.

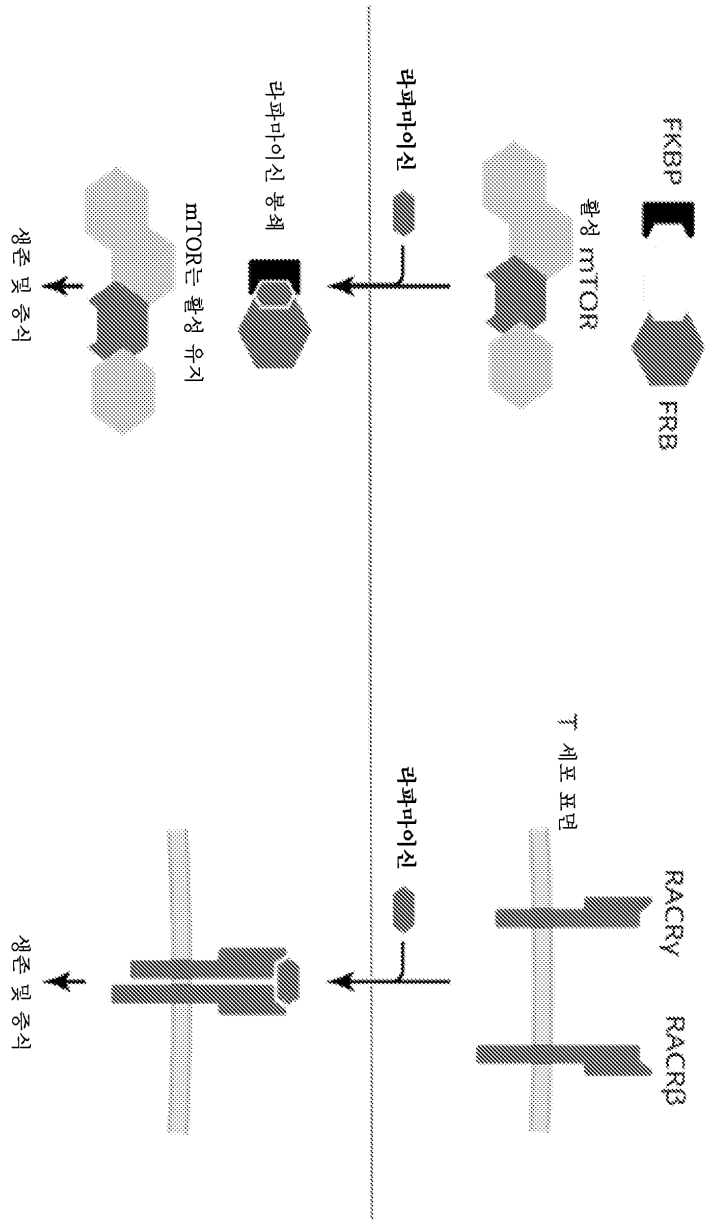
[0389] INFγ (도 9), IL-2 (도 10), TNFα (도 11) 및 IL-13 (도 12)에 대한 시토카인 분석을 수행하였다. 시토카인 생성은 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포에서의 항원 자극에 반응하여 증가되었다. 표적 세포 단독 및 비-형질도입된 세포 (CAR가 결핍되어 있는 세포)는 시토카인을 생성시키지 않았다.

[0390] 이중 CAR T 세포 증강에서의 라파마이신 선택의 효과를 평가하기 위하여, 12.5 MOI + 라파마이신 샘플 (샘플 3)을 유동 세포측정법에 의해 상기한 바와 같은 FITC-CD19 항원 및 PE-CD20 항원을 사용하여 두 CAR의 표면 발현에 대해 분석하였다. 자극-전 (도 13A), 항원을 발현하지 않는 K562 세포와의 공동-배양 후 (도 13B), 및 CD19를 발현하는 K562 세포와의 공동-배양 후에 (도 13C), CD19 및 CD20 CAR 둘 다의 발현을 분석하였다. 자극-전 T 세포 (43.0 %)와 비교하였을 때, 라파마이신 선택은 CD19 및 CD20 CAR 둘 다를 발현하는 T 세포의 증강 (64.5 %)을 초래하였다.

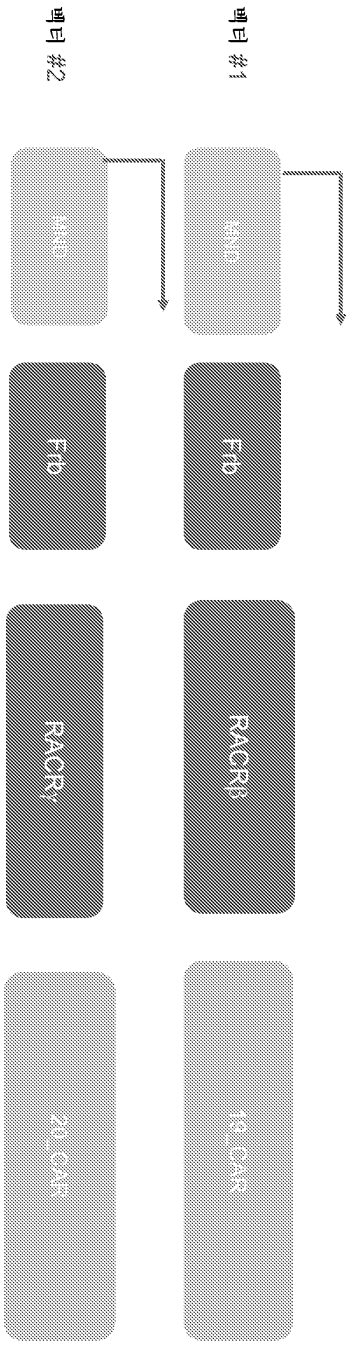
[0391] 표적 세포 공동-배양에 반응하는 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포의 증식을 분석하였다 (도 14). 1 x 10^6 개의 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포를 일정하게 유지하면서, 총 부피 3 ml/웰의 6 웰 편평-저 플레이트에서 10 nM의 라파마이신을 포함하는 완전 RPMI 배지 중에 가변 비의 RAJI 표적 세포와 함께 플레이팅하였다. 세포를 10:1, 5:1 또는 2:1 (형질도입된 이펙터 T 세포: RAJI 표적 세포) 비로 RAJI 표적 세포 단독과 함께 플레이팅하였다. 세포들을 7일 동안 공동-배양하고, 이어서 유동 세포측정법에 의해 상기한 바와 같은 FITC-CD19 항원 및 PE-CD20 항원을 사용하여 두 CAR의 표면 발현에 대해 분석하였다. 비아셀(viaCell)을 사용하여 세포 계수를 수행하였다. 이중 벡터 시스템 형질도입된 T 세포는 CD19 및 CD20 표면 항원을 포함하는 표적 종양 세포의 존재에 반응하여 증식하는 것으로 나타났다 (도 14).

도면

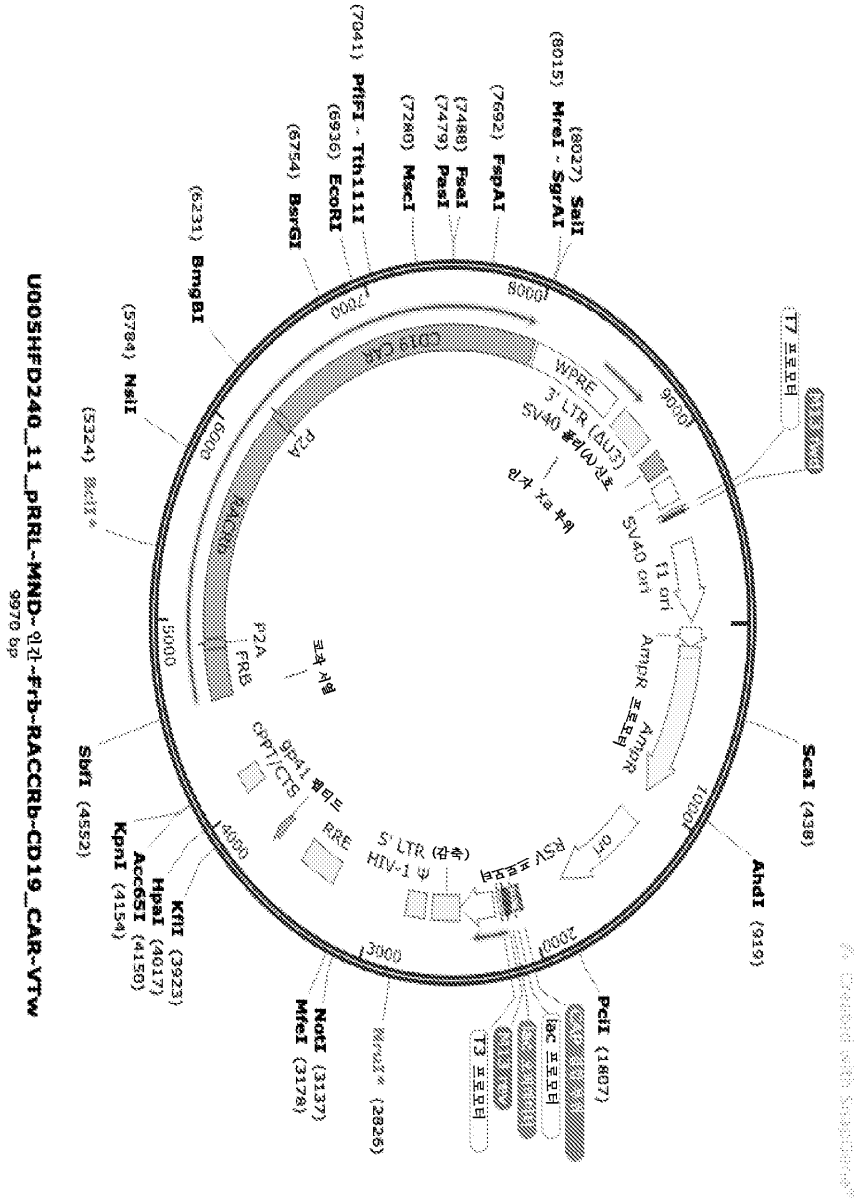
도면1


FKBP
FRB
활성 mTOR
라파마이신
라파마이신 복합체
mTOR는 활성 유지
생존 및 증식
T 세포 표면
RACRγ
RACRβ
라파마이신
생존 및 증식

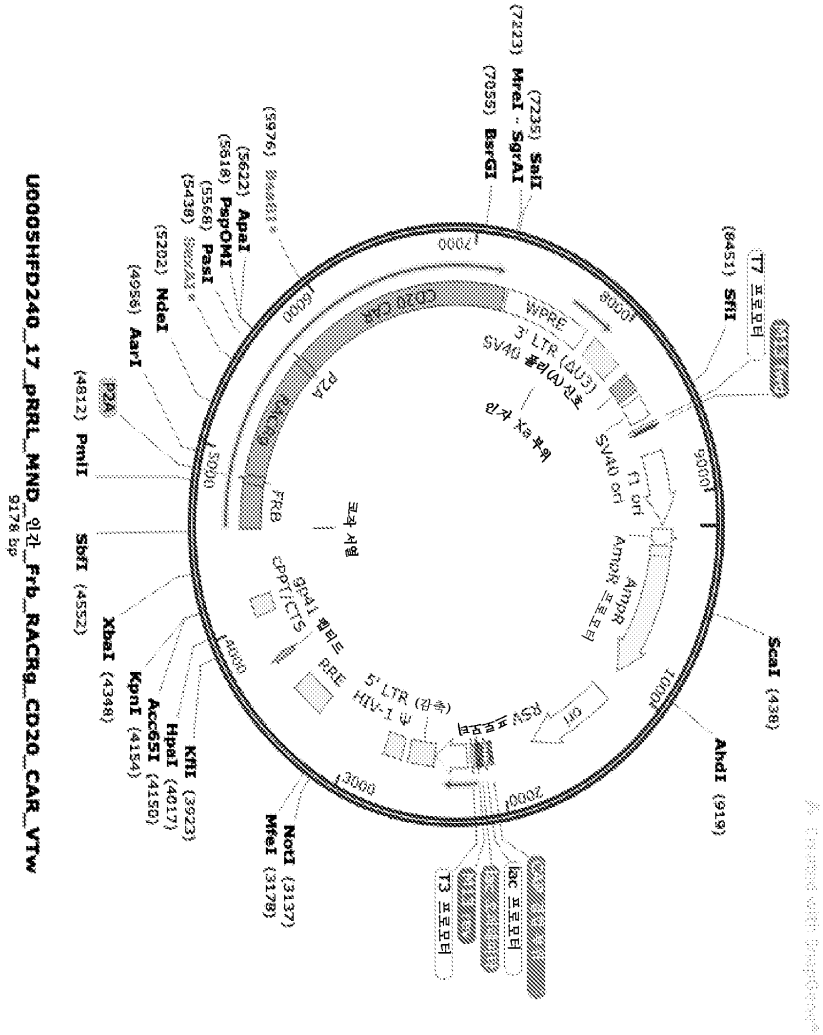
도면2



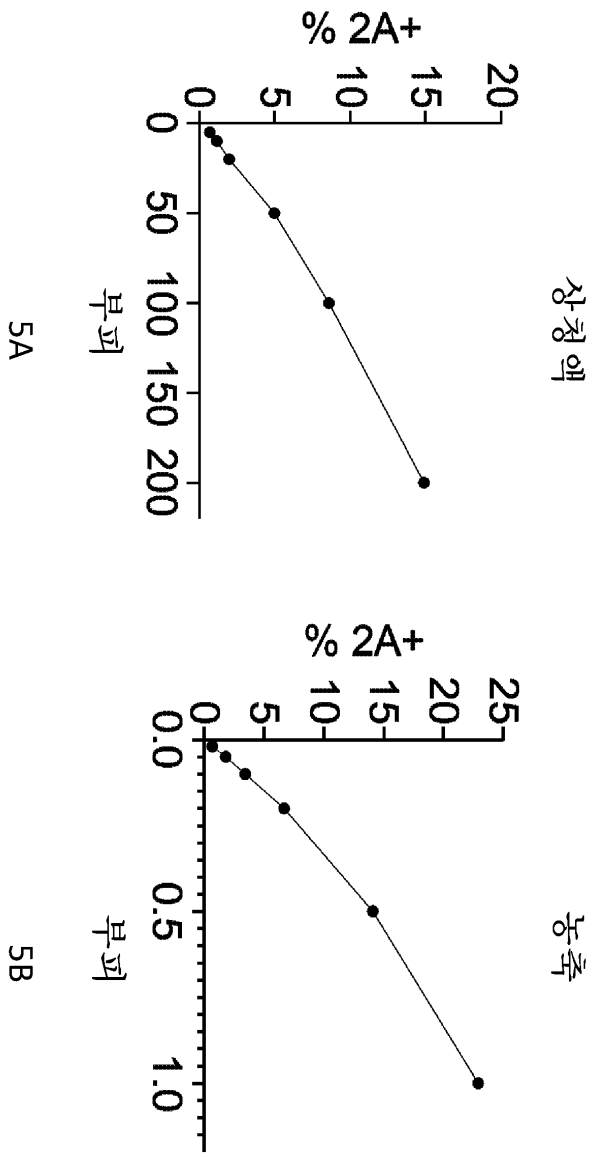
도면3


U005HFD240_11_pRRL-MND-인간-Frb-RACCRb-CD19_CAR-VTw
9970 bp
SalI (8027)
MreI - SgrAI (8015)
FspAI (7692)
FseI (7488)
PasI (7479)
MscI (7280)
PflFI - Tth111I (7041)
EcoRI (6936)
BsrGI (6754)
BmgBI (6231)
NsiI (5784)
(5324)
SbfI (4552)
KpnI (4154)
Acc65I (4150)
HpaI (4017)
KflI (3923)
MfeI (3178)
NotI (3137)
(2826)
PciI (1807)
AhdI (919)
ScaI (438)
T7 프로모터
WPRE
3' LTR (ΔU3)
SV40 폴리(A)신호
원격 지표 부위
SV40 ori
f1 ori
AmpR 프로모터
AmpR
ori
RSV 프로모터
5' LTR (감축)
HIV-1 ψ
RRE
pUC ori
lac 프로모터
T3 프로모터
크로 시험
P2A
FRB
FKBP
CD19 CAR
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000

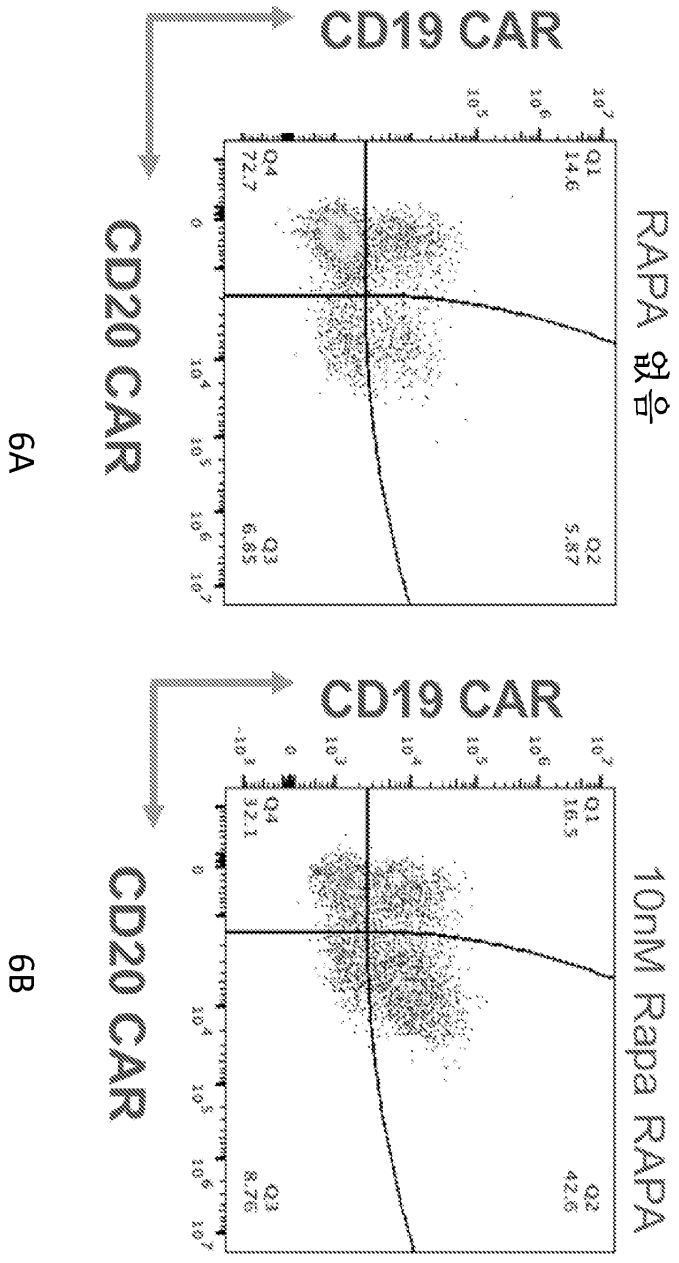
도면4


U0005HFD240_17_pRRL_MND_인간_Frb_RACRg_CD20_CAR_VTw
9178 bp
SfiI (8451)
ScaI (438)
AhdI (919)
NotI (3137)
MfeI (3178)
KflI (3923)
HpaI (4017)
Acc65I (4150)
KpnI (4154)
XbaI (4348)
SbfI (4552)
PmlI (4812)
AarI (4958)
NdeI (5202)
PspOMI (5518)
ApaI (5622)
BsrGI (7055)
MreI - SgrAI (7223)
SalI (7235)
T7 프로모터
T3 프로모터
lac 프로모터
Amp 프로모터
SV40 ori
f1 ori
SV40 폴리(A)신호
3' LTR (ΔU3)
WPRE
5' LTR (U5)
HIV-1 ψ
RSV 프로모터
RRE
cPPT/CTS
FRb
P2A
CD20 CAR
인간 Ig 유력
크라 시열

도면5


% 2A+
0
5
10
15
20
0
50
100
150
200
부피
상청액
5A
% 2A+
0
5
10
15
20
25
0.0
0.5
1.0
부피
농축
5B

도면6


CD19 CAR
CD20 CAR
RAPA 없음
Q4 72.7
Q1 14.6
Q3 6.65
Q2 5.87
6A
CD19 CAR
CD20 CAR
10nM Rapa RAPA
Q4 32.1
Q1 16.5
Q3 8.76
Q2 42.6
6B

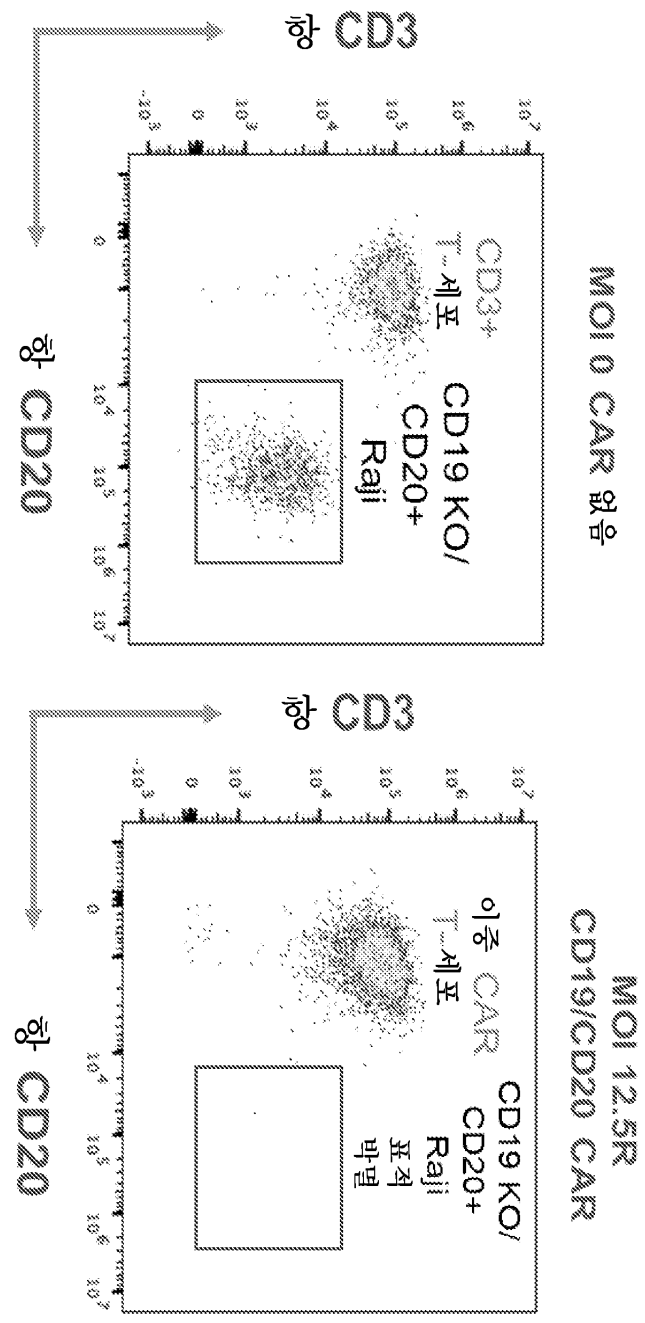
도면7i

CD19-/CD20-
CAR 없음
K562
표적
500K
1.0M
1.5M
2.0M
0
500K
2.0M
7A
이중 적제:
CD19/CD20 CAR
500K
1.0M
1.5M
2.0M
0
500K
2.0M
7B

도면7ii

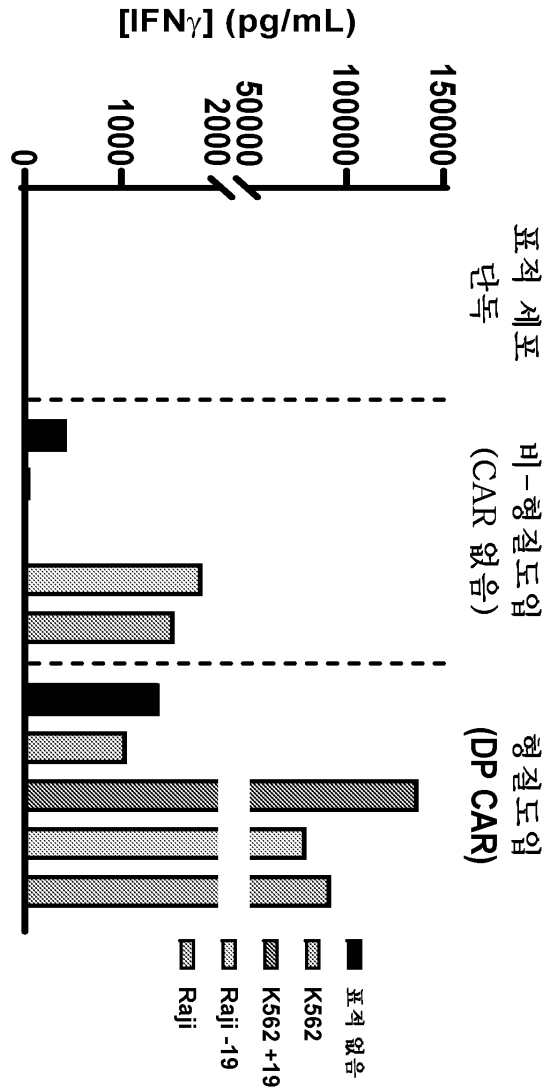
7C 7D

도면8

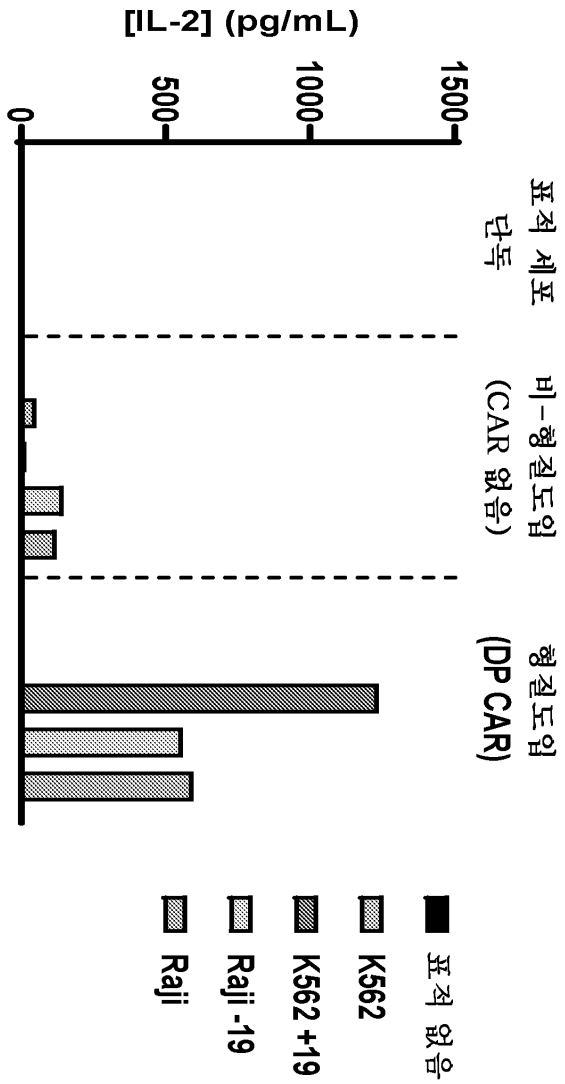

MOI 0 CAR 없음
항 CD3
항 CD20
CD3+
T-세포
CD19 KO/
CD20+
Raji
MOI 12.5R
CD19/CD20 CAR
이중 CAR
T-세포
CD19 KO/
CD20+
Raji
표적
박멸

8A 8B

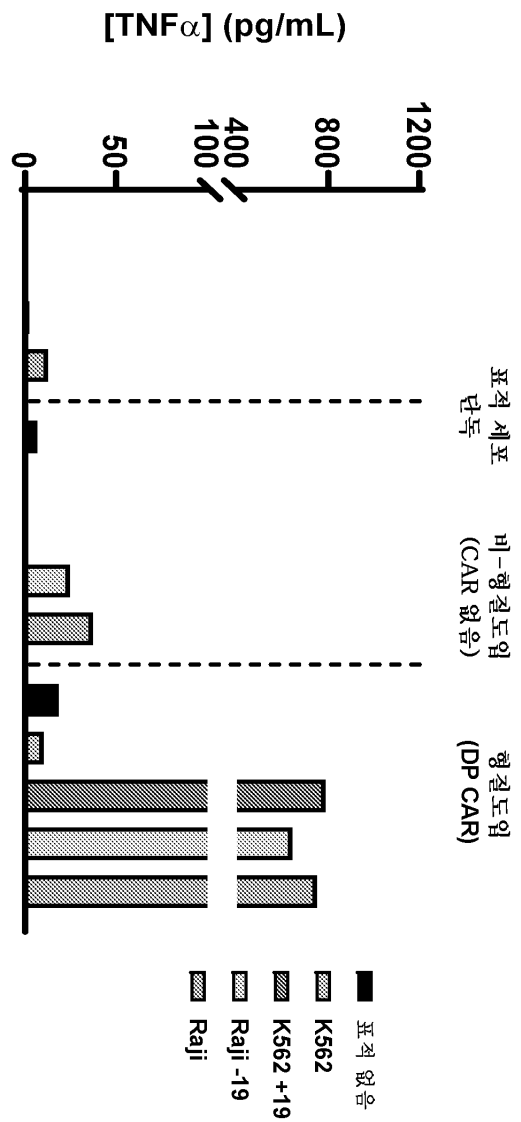
도면9


[IFNγ] (pg/mL)
0
1000
2000
50000
100000
150000
표적 세포 단독
비-형질도입 (CAR 없음)
형질도입 (DP CAR)
표적 없음
K562
K562 +19
Raji -19
Raji

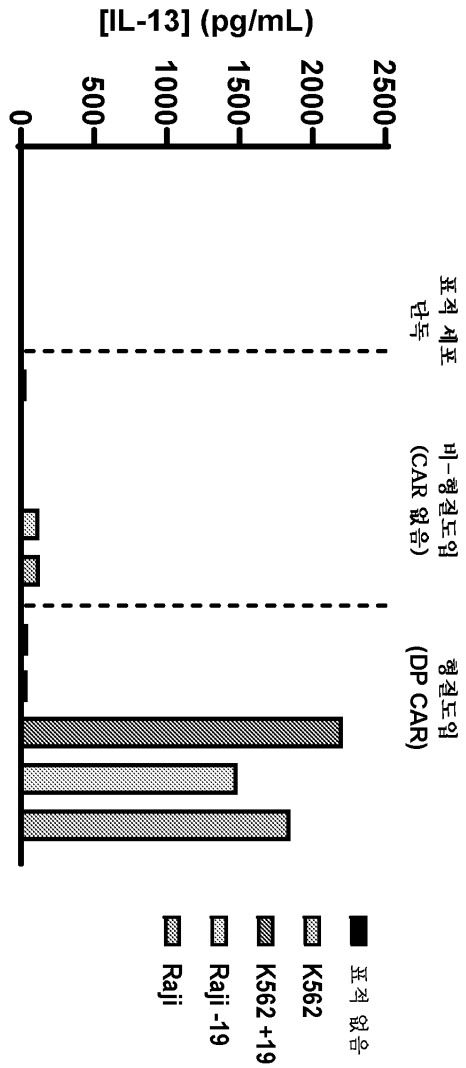
도면10


[IL-2] (pg/mL)
0
500
1000
1500
표적 세포
단독
비-형질도입
(CAR 없음)
형질도입
(DP CAR)
표적 없음
K562
K562 +19
Raji -19
Raji

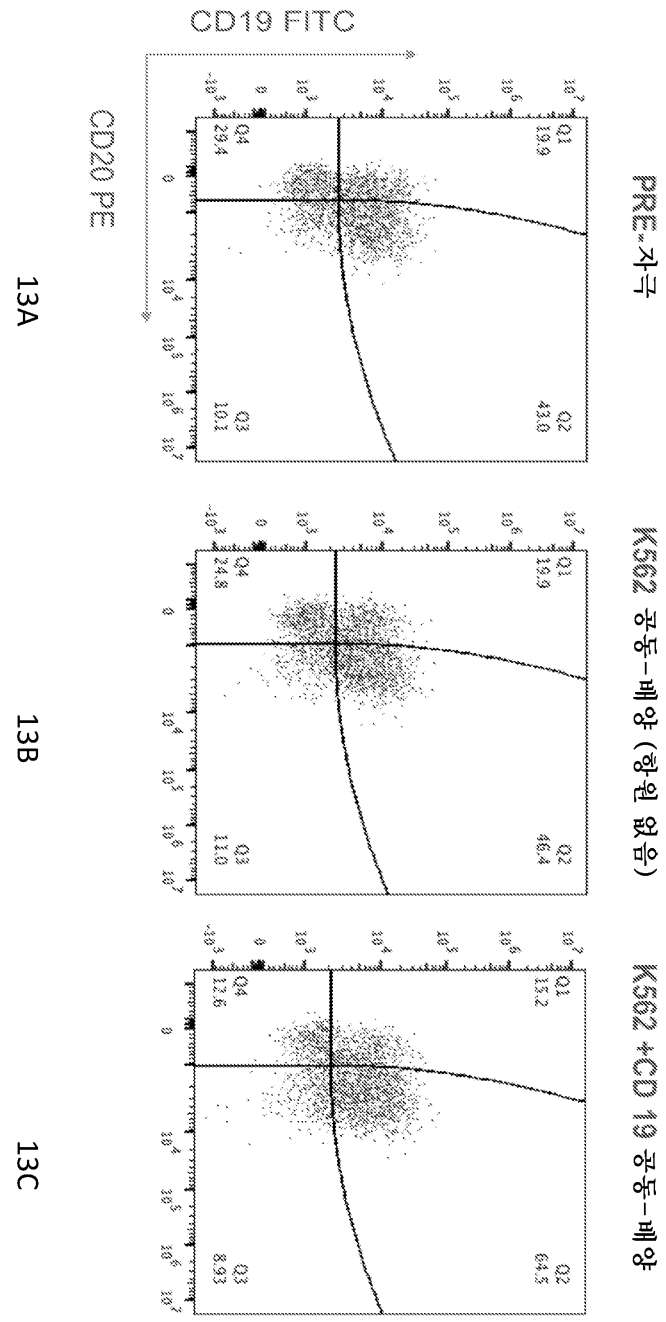
도면11


[TNFα] (pg/mL)
0
50
100
400
800
1200
표적 세포 단독
비-형질도입 (CAR 없음)
형질도입 (DP CAR)
표적 없음
K562
K562 +19
Raji -19
Raji

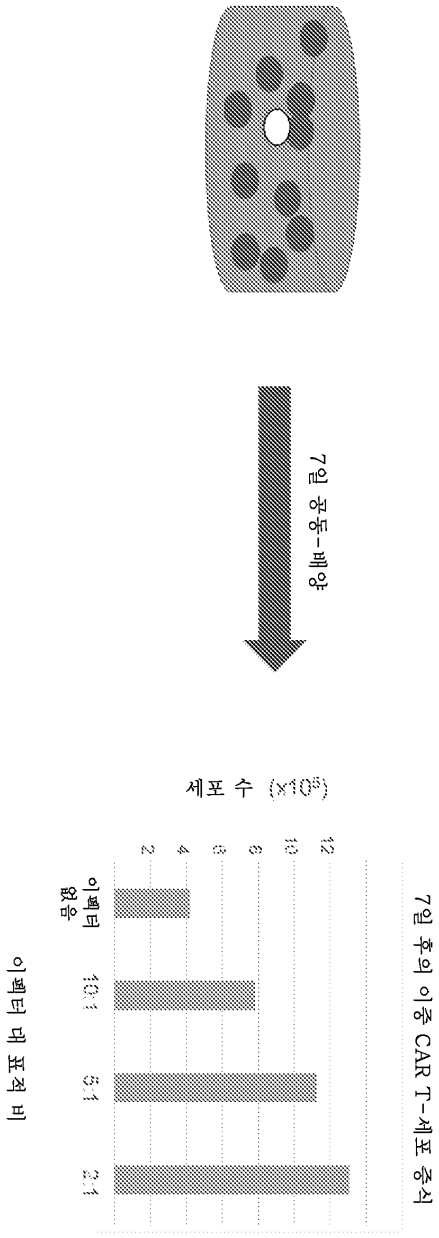
도면12


[IL-13] (pg/mL)
0
500
1000
1500
2000
2500
표적 세포 단독
비-형질도입 (CAR 없음)
형질도입 (DP CAR)
표적 없음
K562
K562 +19
Raji -19
Raji

도면13


CD19 FITC
CD20 PE
PRE-자극
K562 공동-배양 (항원 없음)
K562 +CD 19 공동-배양
13A
13B
13C

도면14



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Umoja Biopharma, Inc.

Scharenberg, Ansdrew

Beitz, Laurie

<120> VECTOR SYSTEM FOR DELIVERY OF MULTIPLE POLYNUCLEOTIDES AND USES THEREOF

<130> UMOJ-008/01WO

<150> US 63/116,611

<151> 2020-11-20

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB domain

<400> 1

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 Thr Gln Ala Trp Asp Leu
65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys
85 90

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FRB domain

<400> 2

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

85 90

<210> 3

<211> 353

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MND Promoter

<400

> 3

Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Gly Ala

1 5 10 15

Gly Ala Ala Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Ala Cys Ala

20 25 30

Gly Gly Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ala Gly

35 40 45

Cys Ala Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly Cys

50 55 60

Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly

65 70 75 80

Thr Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Thr Ala

85 90 95

Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Ala Cys Ala Gly Gly Ala Thr Ala

100 105 110

Thr Cys Thr Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr

115 120 125

Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly

130 135 140

Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Thr Gly Gly Thr
145 150 155 160
Cys Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Cys
165 170 175
Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Thr
180 185 190

Ala Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Ala Thr Gly
195 200 205
Thr Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Cys Ala
210 215 220
Ala Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Thr Gly Ala Cys Cys
225 230 235 240
Cys Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala
245 250 255

Cys Thr Ala Ala Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly Thr Thr Cys Gly
260 265 270
Cys Thr Thr Cys Thr Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Thr Cys
275 280 285
Gly Cys Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Cys
290 295 300
Cys Gly Ala Gly Cys Thr Cys Thr Ala Thr Ala Thr Ala Ala Gly Cys
305 310 315 320

Ala Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Thr Thr Thr Ala Gly Thr Gly Ala
325 330 335
Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Ala Thr Cys Gly Cys Thr Ala Gly
340 345 350
Cys

<210> 4
<211> 251
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rgamma complex

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2Rbeta cmplex
<400> 5
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

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

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

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

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
180 185 190
Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg

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

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

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

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

420 425

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FKBP domain

<400> 6

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro
1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp
20 25 30

Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
100 105

<210> 7

<400> 7

000

<210> 8

<400> 8

000

<210> 9

<400> 9

000

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<400> 11

000

<210> 12

<400> 12

000

<210> 13

<400> 13

000

<210> 14

<400> 14

000

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<400

> 16

000

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2

<400> 18

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 19

<211> 177

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL7

<400> 19

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

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

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95

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

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

<210> 20
<211> 162
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-15
<400> 20
Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1 5 10 15
Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

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

85 90 95
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
100 105 110

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

145 150 155 160
Thr Ser

<210> 21
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> membrane IL7
<400> 21
Met Ala His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15
Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30
Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu

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

100 105 110
Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125
Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160
Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu

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

225 230 235 240
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
245 250 255
His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
260 265 270

<210> 22
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> membrane IL-15
<400> 22

Met Gly Leu Val Arg Arg Gly Ala Arg Ala Gly Pro Arg Met Pro Arg
1 5 10 15

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

65 70 75 80

Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
85 90 95

Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
100 105 110

Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser
115 120 125

Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
130 135 140

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
145 150 155 160

Met Phe Ile Asn Thr Ser Ser Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala
165 170 175

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser
180 185 190

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr
195 200 205

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
210 215 220

Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
225 230 235 240

Asn His Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val
245 250 255

<210> 23

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rgamma complex

<400> 23

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

1 5 10 15

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

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

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

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

<210> 24

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rgamma complex

<400> 24

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

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

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

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

245 250

<210> 25

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Rgamma complex

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

245 250

<210> 26

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Ebeta complex

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly

115 120 125

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn

130 135 140

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr

145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly

165 170 175

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro

210 215 220

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425

<210> 27

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IL2Rbeta complex

<400> 27

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly

115 120 125

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

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

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

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
325 330 335
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
340 345 350
Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
355 360 365
Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg

370 375 380

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

<210> 28
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL2Rbeta complex
<400> 28
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30
Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
35 40 45
Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
50 55 60
Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met
65 70 75 80
Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
100 105 110
Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
115 120 125
Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn

130 135 140

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

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

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

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425

<210> 29

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL7Ralpha complex

<400> 29

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly

115 120 125

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn

130 135 140

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr

145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly

165 170 175

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro

210 215 220

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine spacer

<400> 30

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine spacer

<400> 31

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 32

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> glycine spacer

<400> 32

Gly Gly Gly

1

<210> 33

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2Ralpha complex

<400> 33

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
20 25 30

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

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

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

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425